

Université de Montréal

**Caractérisation des processus de désensibilisation  
homologue et hétérologue du récepteur A  
des peptides natriurétiques**

par  
**Yann Fortin**

Département de pharmacologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de M. Sc.  
en Pharmacologie

Mars, 2005

© Yann Fortin, 2005



W

4

U58

2005

v.122

**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

Ce mémoire intitulé :

**Caractérisation des processus de désensibilisation homologue et  
hétérologue du récepteur A des peptides natriurétiques**

présenté par :

**Yann Fortin**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

**Martin G. Sirois**  
président-rapporteur

**André De Léan**  
directeur de recherche

**Guy Rousseau**  
membre du jury

## Résumé

Le récepteur A des peptides natriurétiques (NPR-A) est un récepteur à un seul passage transmembranaire qui communique les effets hypotensif et anti-hypertrophique des peptides natriurétiques par la production de GMPc. En conditions pathologiques tel que l'insuffisance cardiaque, ces effets sont atténués par des mécanismes de désensibilisation homologue et hétérologue. La désensibilisation induite par l'agoniste résulte de la déphosphorylation de la portion cytosolique du NPR-A consécutive d'une réduction de l'activité de la kinase du récepteur. La désensibilisation induite par les hormones hypertensives dépend quant à elle de l'activation de la protéine kinase C (PKC) et/ou d'une élévation du niveau de calcium cytosolique. Les mécanismes par lesquels la PKC et plus particulièrement le  $\text{Ca}^{2+}$  engendrent la désensibilisation du NPR-A sont inconnus. Le rôle du GMPc dans la désensibilisation homologue et la voie de désensibilisation par le  $\text{Ca}^{2+}$  ont donc été étudiés. Les résultats présentés dans ce mémoire montrent que, contrairement à l'activation du NPR-A par son agoniste, la stimulation des guanylates cyclases solubles des cellules LLC-PK1 par du sodium nitroprusside entraîne aussi une hausse de GMPc mais n'induit pas la désensibilisation du récepteur. Le GMPc seul ne mène donc pas à la désensibilisation homologue du NPR-A. De plus, l'élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique n'est pas requise dans le processus de désensibilisation homologue car BAPTA-AM, un chélateur de  $\text{Ca}^{2+}$  qui inhibe la désensibilisation du NPR-A causée par l'ionomycine, ne bloque pas la désensibilisation produite par l'agoniste. Par ailleurs, le peptide inhibiteur de la calcineurine prévient la désensibilisation du NPR-A liée au  $\text{Ca}^{2+}$  suggérant ainsi que cette phosphatase activée par le  $\text{Ca}^{2+}$  joue un rôle essentiel dans ce processus. En résumé, le présent mémoire démontre que le GMPc seul n'est pas responsable de la désensibilisation homologue du NPR-A alors que le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique n'y est pas impliqué. Les résultats proposent par contre un rôle pour la calcineurine dans la désensibilisation hétérologue du NPR-A dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Mots clés :** transduction du signal, hypertrophie cardiaque, hypertension, calcium cytosolique, calcineurine, cellules LLC-PK1

## Abstract

The natriuretic peptide receptor-A (NPR-A) is a single-spanned transmembrane receptor that mediates hypotensive and antihypertrophic effects of natriuretic peptides through the production of cGMP. In pathological conditions such as heart failure, these effects are attenuated by homologous and heterologous desensitization mechanisms. Agonist-induced desensitization results from the dephosphorylation of the cytosolic portion of the receptor resulting from the attenuation of receptor kinase activity. Pressor hormones-induced desensitization however is dependent on protein kinase C (PKC) stimulation and/or cytosolic calcium elevation. Mechanisms by which PKC and more particularly  $\text{Ca}^{2+}$  promote NPR-A desensitization are not known. The role of cGMP in the homologous desensitization pathway and of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent desensitization pathway were therefore studied. The results presented in this master thesis are showing that, in contrast with the activation of NPR-A by its agonist, activation of soluble guanylyl cyclases of LLC-PK1 cells by sodium nitroprusside also leads to a production of cGMP but without altering NPR-A activation. Consequently, cGMP does not appear to mediate homologous desensitization of NPR-A. In addition, cytosolic calcium increase is not required in the homologous desensitization pathway since the calcium chelator BAPTA-AM, which inhibits ionomycin-induced NPR-A desensitization, does not block natriuretic peptide-induced desensitization. Also, a cell-permeable calcineurin inhibitory peptide blocks the NPR-A guanylyl cyclase desensitization induced by ionomycin, suggesting an essential role for that  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated phosphatase in NPR-A desensitization. In summary, the present report demonstrates that cGMP does not cause NPR-A homologous desensitization while  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolic elevation is not involved. Our results also indicate a role for calcineurin in calcium-dependent NPR-A heterologous desensitization.

**Keywords:** natriuretic peptide receptors, desensitization, signal transduction, cardiac hypertrophy, hypertension, cytosolic calcium, calcineurin, LLC-PK1 cells

## Table des matières

|   |           |
|---|-----------|
| LISTE DES TABLEAUX.....                               | vii       |
| LISTE DES FIGURES.....                                | viii      |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS.....                           | ix        |
| REMERCIEMENTS.....                                    | xi        |
| <b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....</b>                 | <b>1</b>  |
| <b>1.1 Les peptides natriurétiques.....</b>           | <b>2</b>  |
| <b>1.1.1 Le peptide natriurétique de type A .....</b> | <b>3</b>  |
| A) Expression tissulaire.....                         | 3         |
| B) Expression génique.....                            | 5         |
| C) Biosynthèse.....                                   | 5         |
| D) Structure.....                                     | 6         |
| E) Régulation.....                                    | 7         |
| F) Effets physiologiques.....                         | 7         |
| G) Pathologie et thérapeutique.....                   | 11        |
| <b>1.1.2 Le peptide natriurétique de type B.....</b>  | <b>13</b> |
| A) Expression tissulaire.....                         | 13        |
| B) Expression génique.....                            | 13        |
| C) Biosynthèse.....                                   | 14        |
| D) Structure.....                                     | 14        |
| E) Régulation.....                                    | 15        |
| F) Effets physiologiques.....                         | 15        |
| G) Pathologie et thérapeutique.....                   | 16        |
| <b>1.1.3 Le peptide natriurétique de type C.....</b>  | <b>17</b> |
| A) Expression tissulaire.....                         | 17        |
| B) Expression génique.....                            | 17        |
| C) Biosynthèse.....                                   | 17        |
| D) Structure.....                                     | 18        |
| E) Régulation.....                                    | 18        |

|   |           |
|---|-----------|
| F) Effets physiologiques.....                                   | 18        |
| G) Pathologie et thérapeutique.....                             | 19        |
| <b>1.2 Les récepteurs des peptides natriurétiques.....</b>      | <b>21</b> |
| <b>1.2.1 Le récepteur A des peptides natriurétiques.....</b>    | <b>21</b> |
| A) Expression tissulaire.....                                   | 21        |
| B) Expression génique.....                                      | 22        |
| C) Structure.....   | 23        |
| D) Signalisation.....   | 29        |
| E) Régulation.....  | 32        |
| <b>1.2.2 Le récepteur B des peptides natriurétiques.....</b>    | <b>33</b> |
| A) Expression tissulaire et génique.....                        | 33        |
| B) Structure.....   | 33        |
| C) Signalisation et régulation.....                             | 34        |
| <b>1.2.3 Le récepteur C des peptides natriurétiques.....</b>    | <b>35</b> |
| A) Expression tissulaire et génique.....                        | 35        |
| B) Structure et fonctions.....                                  | 35        |
| <b>1.3 Les processus de désensibilisation des NPR-A/B .....</b> | <b>38</b> |
| <b>1.3.1 La désensibilisation homologue.....</b>                | <b>38</b> |
| <b>1.3.2 La désensibilisation hétérologue.....</b>              | <b>39</b> |
| <b>CHAPITRE 2 : OBJECTIF ET MÉTHODOLOGIE.....</b>               | <b>41</b> |
| <b>CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....</b>                              | <b>43</b> |
| <b>CHAPITRE 4 : DISCUSSION ET CONCLUSION.....</b>               | <b>75</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>                                       | <b>83</b> |

## Liste des tableaux

### **Tableau I : Interactions entre les résidus du complexe**

**agoniste (pBNP1) – NPR-A (Jossart C et coll., 2005)(70).....24**

## Liste des figures

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figure 1 : Structure et séquence des peptides natriurétiques humains.....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>Figure 2 : Maturation de l'ANP. (Forssmann WG et coll., 1998) (19).....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>Figure 3 : Effets physiologiques de l'ANP.....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>Figure 4 : Structure générale et spécificité des récepteurs des peptides<br/>natriurétiques. (Potter LR et Hunter T, 2001) (61).....</b>  | <b>20</b> |
| <b>Figure 5 : Organisation structurale du gène du NPR-A.<br/>(Garg R et coll., 2002) (60).....</b>   | <b>22</b> |
| <b>Figure 6 : Possibilités de structure du domaine extracellulaire du NPR-A<br/>dédiuées de la cristallisation. (Van der Akker F et coll., 2000<br/>et 2001, De Léan A et coll., 2003) (63, 66, 67).....</b> | <b>25</b> |
| <b>Figure 7 : Structure déduite de la cristallisation du domaine extracellulaire<br/>du NPR-A avec et sans l'ANP lié. (Ogawa H et coll., 2004) (69).....</b>   | <b>25</b> |
| <b>Figure 8 : Modèle du domaine extracellulaire du NPR-A en absence<br/>ou présence du peptide. (Jossart C et coll., 2005) (70).....</b>   | <b>26</b> |
| <b>Figure 9 : Rotation de la structure quaternaire du domaine extracellulaire<br/>du NPR-A induite par l'ANP. (Ogawa H et coll., 2004) (69).....</b>   | <b>28</b> |
| <b>Figure 10: Transduction du signal.....</b>  | <b>31</b> |
| <b>Figure 11 : Structure tridimensionnelle du domaine extracellulaire du<br/>NPR-C déduite de la cristallisation. (He XL et coll., 2001) (87).....</b>   | <b>37</b> |

## Liste des abréviations

|               |  |
|---------------|--|
| <b>aa</b>     | acides aminés                              |
| <b>ADN</b>    | acide désoxyribonucléique                  |
| <b>AMPc</b>   | adénosine monophosphate cyclique           |
| <b>Ang II</b> | angiotensine II                            |
| <b>ANP</b>    | peptide natriurétique de type A            |
| <b>ARNm</b>   | acide ribonucléique messenger              |
| <b>ATP</b>    | adénosine triphosphate                     |
| <b>BNP</b>    | peptide natriurétique de type B            |
| <b>CaMKII</b> | calmoduline kinase II                      |
| <b>CIP</b>    | peptide auto-inhibiteur de la calcineurine |
| <b>CNP</b>    | peptide natriurétique de type C            |
| <b>DNP</b>    | peptide natriurétique <i>Dendroaspis</i>   |
| <b>ECD</b>    | domaine extracellulaire                    |
| <b>GC</b>     | guanylate cyclase                          |
| <b>GCp</b>    | guanylate cyclase particulaire             |
| <b>GCs</b>    | guanylate cyclase soluble                  |
| <b>GMPc</b>   | guanosine monophosphate cyclique           |
| <b>GRE</b>    | glucocorticoïdes response element          |
| <b>GTP</b>    | guanosine triphosphate                     |
| <b>HRE</b>    | hypoxia response element                   |
| <b>IBMX</b>   | 3-isobutyle-1-méthylxanthine               |
| <b>IP3</b>    | inositol trisphosphate                     |
| <b>kb</b>     | kilobase                                   |
| <b>kDa</b>    | kilodalton                                 |
| <b>KHD</b>    | domaine d'homologie aux kinases            |
| <b>MAPK</b>   | mitogen-activated protein kinase           |
| <b>NEP</b>    | endopeptidase neutre                       |
| <b>NF-Y</b>   | nuclear factor Y                           |

|              |   |
|--------------|---|
| <b>NO</b>    | monoxyde d'azote                        |
| <b>NPR-A</b> | récepteur A des peptides natriurétiques |
| <b>NPR-B</b> | récepteur B des peptides natriurétiques |
| <b>NPR-C</b> | récepteur C des peptides natriurétiques |
| <b>pb</b>    | paire de base                           |
| <b>PDE</b>   | phosphodiesterase                       |
| <b>PKC</b>   | protéine kinase C                       |
| <b>PKG</b>   | protéine kinase dépendante du GMPc      |
| <b>PLC</b>   | phospholipase C                         |
| <b>RIA</b>   | essai radio-immunologique               |
| <b>SRE</b>   | serum response element                  |
| <b>SNP</b>   | sodium nitroprusside                    |
| <b>SSRE</b>  | shear stress response element           |

## Remerciements

J'aimerais remercier tous ceux qui m'ont non seulement supporté tout le long de mes études mais qui m'ont aussi influencé d'une quelconque façon et qui m'ont aidé à faire de moi ce que je suis aujourd'hui. Famille et amis, je vous dois beaucoup.

Je voudrais aussi remercier mes collègues de travail pour leurs conseils, pour le divertissement et pour les débats et discussions dans le but de refaire le monde. Merci à Simon, Christian, Julie, Marie et surtout Normand pour leur appui.

Je ne saurais oublier le Dr André De Léan, mon directeur de recherche, pour m'avoir guidé habilement tout le long du parcours. Son enseignement m'a permis de développer non seulement des compétences pour la recherche mais aussi une façon de réfléchir au monde qui nous entoure.

**CHAPITRE 1 :**  
**INTRODUCTION**

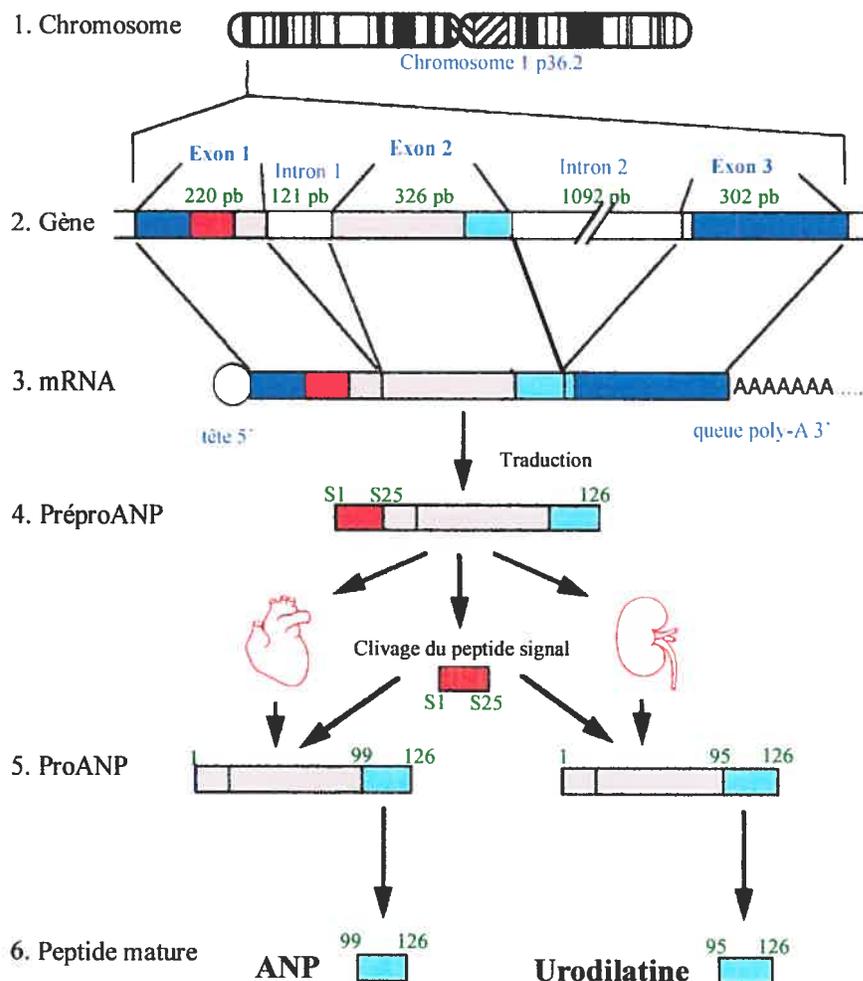
## 1.1 Les peptides natriurétiques

Les premiers indices de l'existence des peptides natriurétiques datent déjà de près de 50 ans. C'est en 1956 que des études de microscopie électronique montrèrent la présence de granules de sécrétion dans les cellules du muscle lisse auriculaire (1) pendant qu'une autre équipe découvrait que la distension par un ballon de l'oreille gauche d'un chien amenait une augmentation du débit urinaire (2). Le lien ne fut toutefois établi que 25 ans plus tard par les travaux de DeBold et ses collègues où l'injection chez le rat d'extraits provenant de myocytes auriculaires induisait une forte réponse diurétique et natriurétique (3). Le peptide natriurétique auriculaire (ANP) fut purifié et caractérisé en 1983 (4). La famille s'agrandit vers la fin de cette décennie avec la découverte dans le cerveau de porc de deux autres peptides aux propriétés biologiques semblables : le «brain natriuretic peptide» (BNP) et, pour suivre l'ordre alphabétique, le peptide natriurétique de type C (CNP) (5, 6). De nos jours, par respect pour le fait qu'ils soient exprimés par divers tissus, ces peptides natriurétiques prennent le nom de type A, B et C.

À ces principaux membres, s'ajoutent quatre peptides natriurétiques moins connus. Le peptide natriurétique *Dendroaspis* (DNP) a été découvert dans le venin de serpent (7) et se retrouve dans le plasma et le myocarde de l'oreille chez l'humain (8) où il induit des actions natriurétiques (9) en plus de la dilatation des artères coronariennes suite à la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) (10). La guanyline et l'uroguanyline sont quant à elles produites principalement dans la muqueuse gastro-intestinale où elles joueraient un rôle paracrine dans la régulation de l'absorption de l'eau et du sel en activant la guanylate cyclase C (11). Finalement, l'urodilatine résulte d'un clivage alternatif de l'ANP dans le tubule distal du rein et induit une inhibition GMPc-dépendante de la réabsorption du sodium en liant des récepteurs de la paroi luminale du tube collecteur (12).

Seuls les trois principaux peptides natriurétiques (**Figure 1**) seront abordés plus en détails dans cette section.





**FIGURE 2 : Maturation de l'ANP.** Le gène de l'ANP est transcrit en ARNm dont la traduction amène la production de la préprohormone. Le peptide signal est ensuite clivé pour libérer le ProANP qui sera emmagasiné dans les granules de sécrétion. Le peptide mature est détaché lors de la sécrétion. Dans le rein, l'urodilatine est synthétisée suite à un clivage différent du ProANP. (Forssmann WG et coll., 1998) (19).

## B) Expression génique

Le gène codant pour l'ANP a entre autre été identifié chez la souris, le rat et l'humain avec un important degré d'homologie (15, 16). Chez l'homme, il est localisé sur le chromosome 1 et est composé de trois exons et deux introns en plus d'une région régulatrice en 5' (**Figure 2**). Des sites de liaison induisant l'expression et correspondant à AP1, CRE, PEA2, KE-2 et SP1 ont été trouvés chez le rat à l'intérieur d'une région à 700 pb du site de démarrage de la transcription alors que la séquence de 2.4 kb en amont serait responsable de la spécificité tissulaire de transcription (17). Le promoteur présente aussi des éléments de réponse au sérum (SER), à Nkx-2.5 et à l'hypoxie (HRE) tandis qu'on retrouve un élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) à l'intérieur de l'intron 2 (18). Les facteurs de transcription GATA-4 et -5 activent la transcription du gène de l'ANP alors que la 1,25-dihydroxyvitamine D3 réprime son expression en recrutant le co-activateur GRIP1.

## C) Biosynthèse

Le gène code pour une préprohormone de 149 à 153 acides aminés dépendamment de l'espèce (19) (**Figure 2**). Le peptide signal amino-terminal (23 aa chez le chien, 25 chez l'humain et le cheval) est coupé par protéolyse pour laisser une prohormone de 126 (porc et chien) ou 128 (humain, bovin, mouton, lapin, rat et souris) aa. C'est la forme proANP<sub>1-126</sub> (quelquefois désignée  $\gamma$ -ANP) qui est principalement emmagasinée dans les granules de sécrétion des myocytes auriculaires où la carboxypeptidase E retirerait les deux arginines supplémentaires, s'il y a lieu. La ProANP<sub>1-126</sub> humaine partage une forte homologie avec les propeptides des autres mammifères (entre 74 et 86%) particulièrement en ce qui a trait aux 45 résidus carboxy-terminaux (93%) (19). Lors de la sécrétion, ProANP<sub>1-126</sub> est d'ailleurs clivée par corin, une sérine-protéase cardiaque transmembranaire, pour libérer la portion C-terminale et biologiquement active de 28 aa appelée ANP<sub>99-126</sub> (ou  $\alpha$ -ANP) (20). Le site de clivage, arginine<sub>98</sub> et sérine<sub>99</sub>, est conservé chez toutes les espèces étudiées jusqu'à présent. Des fragments de la portion N-terminale (ANP<sub>1-98</sub>) se retrouvent aussi dans le plasma et pourraient avoir des effets physiologiques comparables à la

forme mature (21). ProANP<sub>1-30</sub> est connu comme étant le «Long Acting Sodium Stimulator», Pro ANP<sub>31-67</sub> est le «Vessel Dilator» alors que ProANP<sub>79-98</sub> est le «Kaliuretic Stimulator». Certains mettent toutefois ces effets en doute en arrivant avec des résultats négatifs (22). Occasionnellement, un processus de clivage différent dans le rein humain libère l'urodilatine (ANP<sub>95-126</sub>). Les mécanismes et l'enzyme impliqués sont présentement inconnus mais les quatre acides aminés supplémentaires semblent rendre l'urodilatine mieux protégée que l'ANP contre la dégradation par l'endoprotéase rénale 24.11 (19). Autre phénomène peut-être unique à l'humain est la production de  $\beta$ -ANP, un dimère anti-parallèle de l'ANP<sub>99-126</sub> présent dans le tissu auriculaire et qui circule dans le sang surtout lors de l'insuffisance cardiaque (23). Les effets natriurétique et diurétique induits chez le rat suite à l'injection de ce dimère se propagent plus lentement mais durent deux fois plus longtemps que ceux induits par l' $\alpha$ -ANP (24); possiblement parce que le peptide doit retourner à la conformation monomérique.

#### D) Structure

La forme circulante majeure qu'on appelle ANP est en effet l'ANP<sub>99-126</sub>. Au sein des 28 aa qui composent ce peptide se trouve une structure en boucle nécessaire à la liaison (**Figure 1**). La boucle est formée par 17 aa et fermée par un pont disulfure reliant les cystéines 105 et 121. Les queues N- et C-terminales sont quant à elles constituées de six et cinq résidus, respectivement (25). Cette structure est très conservée. La séquence de 28 aa est d'ailleurs identique chez l'humain, le bovin, le chien et le porc alors qu'un seul acide aminé diffère d'avec le rat, la souris et le lapin (26). Raccourcir ou allonger la queue N-terminale a très peu d'impact sur l'activité biologique de l'ANP et n'altère que très légèrement son affinité pour son récepteur. À l'opposé, dès qu'on réduit la portion carboxy-terminale ou que l'on rajoute les arginines 127 et 128, l'effet physiologique et l'affinité sont fortement diminués (27, 28). La portion C-terminale semble donc des plus importantes pour moduler l'affinité et l'activité de l'ANP contrairement au segment amino-terminal qui est relativement moins essentiel.

### E) Régulation

Beaucoup de facteurs peuvent stimuler la transcription et la sécrétion de ce peptide. Bien qu'on ait longtemps pensé que la pression auriculaire était responsable de la libération de l'ANP, c'est en fait l'étirement des myocytes de l'oreillette causé par une surcharge cardiaque qui est le principal stimulus de sa sécrétion (25). Plusieurs facteurs incluant la norépinéphrine, l'acétylcholine, l'angiotensine II, l'endothéline-1, l'arginine vasopressine, les glucocorticoïdes, les prostaglandines, les catécholamines, l'hypoxie et l'exercice stimulent aussi la transcription et la sécrétion de l'ANP alors que l'adrénomédulline inhibe sa biosynthèse (17, 29).

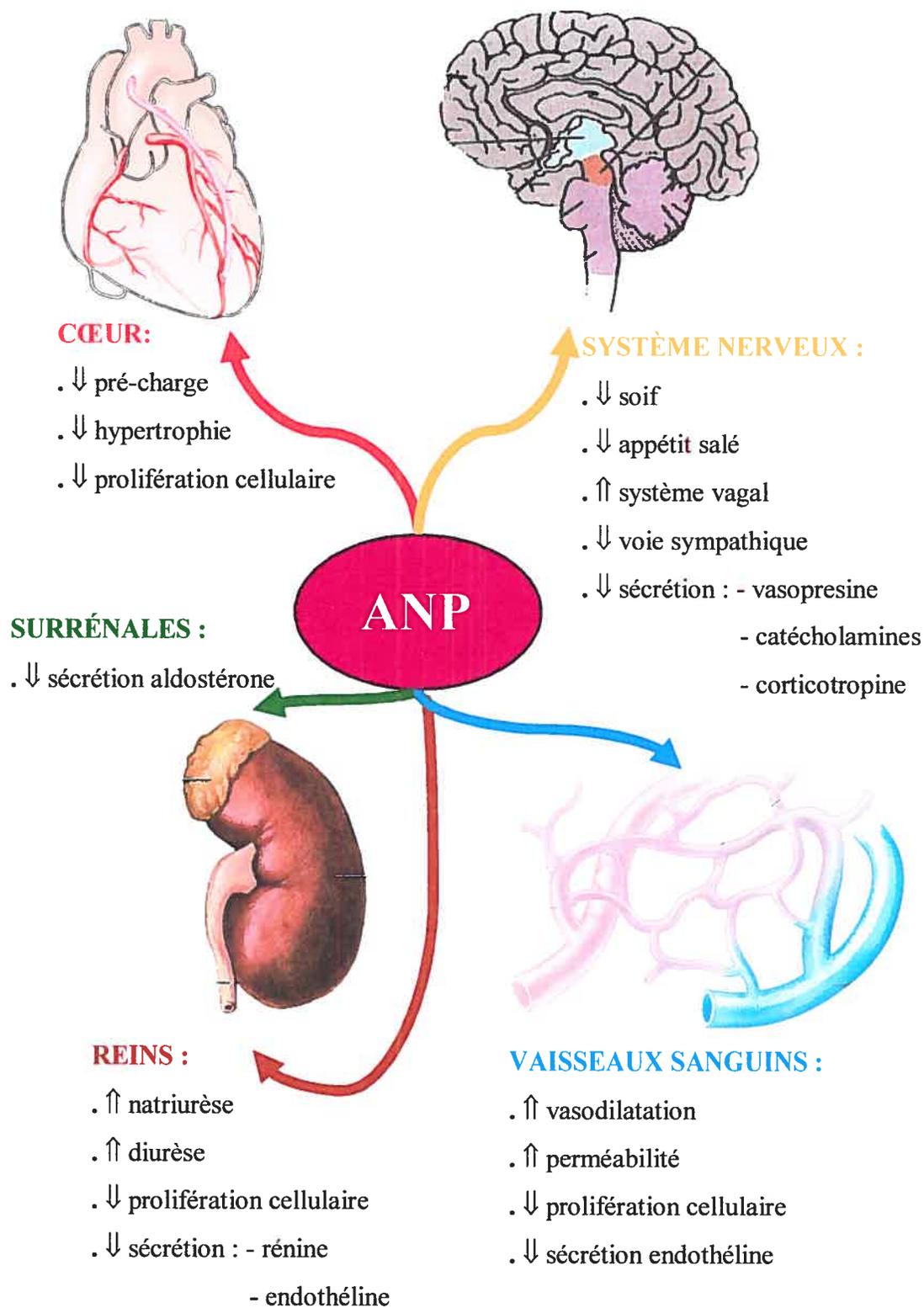
Une fois en circulation, l'ANP peut être éliminé de trois façons (30). L'endopeptidase neutre (NEP) est l'enzyme qui dégrade les peptides natriurétiques. Il s'agit d'une métalloendopeptidase renfermant un atome de zinc en son centre et que l'on retrouve principalement dans le tubule proximal mais aussi dans les poumons, l'intestin, les vésicules séminales, les neutrophiles et tout au long de l'endothélium vasculaire. La deuxième voie d'élimination de l'ANP est par l'internalisation avec le récepteur de clairance des peptides natriurétiques (NPR-C, voir section 1.2.3). L'ANP se retrouve alors éventuellement dans les lysosomes pour y subir une dégradation enzymatique. Finalement, l'ANP peut être excrété dans l'urine. Bien que cette dernière voie de dégradation soit normalement négligeable, elle prend de l'ampleur lorsque les deux autres voies sont inhibées.

### F) Effets physiologiques

Suite à leur libération, les peptides natriurétiques voyagent jusqu'à leurs cibles qu'elles soient voisines ou éloignées. Ils s'y lient à des récepteurs membranaires spécifiques (voir Chapitre 2) dont ils induisent alors l'activation. C'est ainsi qu'est produit le second messager du système, le guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Ce dernier peut ensuite réguler diverses classes de protéines telles que des phosphodiésterases, qui vont dégrader le GMPc et/ou l'AMPc, et des canaux ioniques (13). Les principaux médiateurs intracellulaires de la signalisation du GMPc sont cependant les protéines kinases dépendantes du GMPc (PKG) (13). L'isoforme de type I (PKGI) est cytosolique et existe sous deux variantes,  $\alpha$  et  $\beta$ , découlant d'un

épissage différent à partir du même gène. PKG1 $\alpha$  est détectée essentiellement dans les myocytes cardiaques, le tissu vasculaire, le cervelet, les poumons, les reins et les surrénales tandis que PKG1 $\beta$  est majoritairement confinée aux muscles lisses utérins (29). Provenant d'un gène différent, PKGII est quant à elle liée à la membrane par myristylation et est présente dans la muqueuse intestinale, les reins, les poumons, le cerveau et les os (13). PKG I est reconnue pour réguler plusieurs gènes. Sa possible translocation au noyau est toutefois source de controverse et nous ne savons donc pas si elle joue un rôle direct dans la régulation de la transcription ou si d'autres facteurs cytoplasmiques servent d'intermédiaires (13). Au niveau du cytosol, plusieurs protéines sont activées par l'une ou l'autre des PKG et quelques fois par les deux.

Les divers effecteurs de la cascade signalétique du GMPc amènent une variété de réponses selon le tissu cible rejoint par l'ANP (**Figure 3**). Globalement, l'ANP réduit le volume sanguin à court terme en séquestrant le plasma et à moyen terme en promouvant la natriurèse et la diurèse ainsi qu'en antagonisant le système rénine-angiotensine-aldostérone à plusieurs niveaux (31). Tous ces effets ont pour but de contrôler l'homéostasie pression-volume et de protéger le cœur contre toute surcharge. L'ANP est aussi plus nouvellement reconnu comme un facteur antimitotique et lipolytique (32). Des marqueurs polymorphiques de mutations dans le gène de l'ANP sont en outre associés à un plus grand risque d'attaque cardiaque indépendamment des facteurs de risque plus conventionnels (17). De plus, l'ablation du gène de l'ANP chez la souris entraîne une hypertrophie cardiaque indépendante de la pression et une hypertension sensible au sel (17). À l'opposé, une surexpression de l'ANP dans des souris transgéniques réduit la pression et la masse cardiaque de façon chronique (33). Ces souris sont par ailleurs résistantes envers le développement d'une hypertension pulmonaire en réponse à des conditions hypoxiques (34).



**FIGURE 3 : Effets physiologiques de l'ANP.**

Les reins sont le siège des principales actions natriurétiques et diurétiques de l'ANP. Le peptide y induit la dilatation des artérioles afférentes et la constriction des artérioles efférentes ce qui a pour effet d'augmenter la pression à l'intérieur des capillaires des glomérules (34). Cette hausse de pression cause alors une élévation de la filtration glomérulaire. De plus, une accumulation de GMPc dans les cellules du mésenchyme rend celles-ci plus détendues accroissant ainsi la surface effective pour la filtration. Le GMPc favorise d'autant l'excrétion urinaire du sodium en stimulant le transporteur Na/H du tubule proximal (35). L'ANP induit en parallèle une augmentation de la pression tout au long de la circulation post-glomérulaire défavorisant ainsi la réabsorption d'eau. La réabsorption de sodium est également inhibée par l'ANP au niveau du tubule collecteur. Le cerveau a également un rôle à jouer dans la natriurèse et la diurèse. L'ANP y induit en effet une inhibition de la soif et de l'appétit salé (34).

Non seulement l'ANP favorise-t-il l'excrétion urinaire du sel et de l'eau, mais il inhibe aussi les hormones stimulant les actions inverses. Au niveau du cerveau, de l'hypophyse, des reins et des glandes surrénales, l'ANP bloque effectivement la sécrétion de l'arginine vasopressine, de la corticotropine, des catécholamines, de la rénine, de l'angiotensine II, de l'aldostérone et de l'endothéline-1 (34). Certaines de ces hormones, en plus d'induire la rétention de sel et d'eau, stimulent aussi la vasoconstriction des vaisseaux sanguins. Or, un autre effet de l'ANP est plutôt de générer la vasodilatation en occasionnant la relaxation du muscle lisse vasculaire.

En fait, cette réduction de la résistance périphérique vasculaire ne se produit qu'en présence de très fortes concentrations d'ANP dans la circulation (31). La réduction de la pression sanguine dépendante de l'ANP est surtout la conséquence d'une élévation de la perméabilité de l'endothélium vasculaire des capillaires (36). Ce phénomène entraîne alors un déplacement du fluide intravasculaire vers le compartiment extravasculaire réduisant ainsi le volume sanguin. En diminuant de ce fait le retour veineux, l'ANP amoindrit la précharge et, par conséquent, le débit cardiaque et non pas carrément la résistance périphérique (31, 36).

La diminution de la précharge entraîne normalement un réflexe tachycardique et vasoconstrictif qui est cependant contré par le fait que l'ANP abaisse le seuil d'activation du système vagal afférent (34). Le réflexe bradycardique dépendant de l'activation des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> des nerfs vagues afférents est en outre accru en présence d'ANP (31). La voie sympathique du système nerveux autonome va quant à elle être inhibée par l'ANP. Cela pourrait être occasionné soit par l'atténuation des barorécepteurs, soit par le blocage de la libération des catécholamines par les terminaisons nerveuses ou encore par la répression de l'activation sympathique au niveau du cerveau (34).

Au-delà de ces effets physiologiques modulant directement la pression sanguine, l'ANP s'avère être un agent antimitotique important. Ce peptide inhibe effectivement la prolifération des fibroblastes, des cellules musculaires lisses vasculaires, des cellules endothéliales et des cellules du mésenchyme rénal (36). L'ANP bloque aussi la production de matrice extracellulaire par les cellules du muscle lisse vasculaire et la synthèse de collagène par les fibroblastes cardiaques. Les voies de signalisation communiquant l'inhibition de la croissance cellulaire par l'ANP sont mal définies. Il est toutefois connu que l'ANP bloque l'activité de certaines protéines kinases mitogène-activées (MAPK) en plus d'empêcher l'activation de régulateurs de protéines de signalisation des protéines G (13). Ces événements peuvent résulter de l'induction de l'expression de MKP-1, une phosphatase des MAPK, ou de la phosphorylation directe par PKG. En somme, il est donc possible que l'ANP puisse moduler la croissance cellulaire lors de pathologies telles que l'athérosclérose, l'hypertension et la resténose post-angioplastique (34).

#### G) Pathologie et thérapeutique

Les effets natriurétique et hypotensif de l'ANP ont d'ailleurs amené plusieurs groupes à tester l'efficacité de ce peptide pour traiter des troubles d'hypertension, d'insuffisance rénale et d'insuffisance cardiaque ou encore en chirurgie cardiaque (37, 30). Il a été montré que des patients souffrant d'hypertension essentielle voient leur pression sanguine diminuer et leur natriurèse augmenter. Des effets bénéfiques ont aussi été notés chez des malades affligés d'insuffisance cardiaque où la natriurèse

et la diurèse étaient accrues alors que les niveaux de rénine et d'aldostérone ainsi que la pression auriculaire et capillaire pulmonaire étaient réduits (38). Au Japon, l'ANP recombinant a même été utilisé pour traiter l'insuffisance cardiaque (33). Son utilisation comme traitement à long terme est toutefois limitée en raison des problèmes d'administration du peptide.

Une alternative est d'accroître les niveaux d'ANP en circulation en inhibant l'endopeptidase neutre. Le médicament candoxatrilat offre justement cette possibilité. Son utilisation augmente la concentration d'ANP en circulation de même que la natriurèse (34). Chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque, le candoxatrilat amène aussi une réduction de la pression auriculaire par une inhibition de l'activité neurohormonale. Paradoxalement, une étude a montré que de fortes doses de ce médicament induisent plutôt une vasoconstriction accompagnée d'une hausse de la résistance vasculaire systémique (34). Ceci est attribuable au fait que l'inhibition de la NEP altère aussi la dégradation de l'angiotensine II. Les inhibiteurs de NEP sont par conséquent donnés en combinaison avec des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (30). Une telle combinaison a pour effet de réduire la pression sanguine et l'hypertrophie cardiaque chez les rats hypertendus (38) en plus d'avoir des conséquences bénéfiques chez certains malades atteints d'hypertension ou d'insuffisance cardiaque (34, 17). Un composé nommé omapatrilat présente même cette double fonctionnalité lorsque employé en dosage élevé et s'avère plus efficace qu'un simple inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine pour traiter l'hypertension et l'insuffisance cardiaque (37). Dans les cas avancés et sévères de cette dernière maladie, où les niveaux circulants d'ANP sont déjà très élevés, cette thérapie est toutefois inefficace (17). Cela s'explique par les divers mécanismes de désensibilisation qui rendent les récepteurs des peptides natriurétiques insensibles à l'ANP (voir section 1.3).

### 1.1.2 Le peptide natriurétique de type B

#### A) Expression tissulaire

La découverte de l'ANP conduisit inévitablement à la recherche d'autres peptides aux propriétés natriurétiques. C'est ainsi que le BNP fut isolé en 1988 en provenance du cerveau de porc (5). Tout comme pour l'ANP, c'est dans le cœur qu'est fort majoritairement synthétisé le BNP à la différence qu'il y est moins présent que l'ANP (13). Une autre distinction vient du fait que la production de BNP par les ventricules ne diminue pas chez l'adulte alors que ceux-ci sécrètent beaucoup moins d'ANP que lors du développement morphogénique (13). Les ventricules adultes expriment donc plus de BNP que d'ANP et sont considérés comme la source principale de sa sécrétion (39). Il ne faut toutefois pas mettre de côté les oreillettes, qui produisent un niveau de BNP relativement élevé; au point où la concentration d'ARNm de BNP y est supérieure. Certains oublient toutefois de ramener cette donnée en fonction du poids total (les ventricules étant plus gros que les oreillettes) et concluent que les oreillettes produisent plus de BNP que les ventricules (13, 26). Il est à noter que, lors de l'insuffisance cardiaque, l'expression dans les ventricules est vigoureusement accrue au point où les niveaux de BNP en circulation dépassent ceux de l'ANP (13, 25). Outre le cœur, d'autres organes tels que le cerveau, le rein et les surrénales expriment aussi le BNP (19).

#### B) Expression génique

Le gène du BNP se trouve lui aussi sur le chromosome 1 humain, à 8 kb de celui de l'ANP, et est constitué de deux exons et d'un intron (18). Sa particularité est de présenter, du côté 3', un motif ATTTA répété plusieurs fois (33). On croit que cette séquence singulière, qu'on retrouve habituellement dans les gènes des interférons et des lymphokines, déstabilise les ARNm. Ceux-ci ont par conséquent une demi-vie plus faible. Le signal induit par un tel type de protéine s'arrête donc rapidement suite à la perte de stimuli (14, 33). En 5', on remarque deux éléments GATA reconnus pour être impliqués dans la spécificité cellulaire de transcription de même que des sites de liaison pour AP-1 et NF- $\kappa$ B et des structures semblables aux éléments de réponse à M-CAT, au stress de déchirement (SSRE) et SER (40, 18).

### C) Biosynthèse

Tout comme pour l'ANP, le gène du BNP code pour une préprohormone qui est ici longue de 134 aa chez l'homme (25). Le clivage du peptide signal par une endoprotéase libère la prohormone de 108 aa qui est ensuite coupée en deux fragments libérés dans le plasma : une portion amino-terminale de fonction inconnue (41) et l'extrémité C-terminale de 32 aa qui est la forme biologiquement active appelée BNP. Cette dernière est la conformation sous laquelle le peptide est emmagasiné contrairement à l'ANP qui est stocké sous sa forme prohormone et dissocié lors de sa sécrétion (25).

### D) Structure

La structure génétique et peptidique du BNP est peu conservée et varie beaucoup d'une espèce à l'autre. Chez la souris, par exemple, le gène est divisé en trois exons et deux introns et code pour une préprohormone de 121 aa (40). Le processus de biosynthèse du peptide est le même que chez l'humain mais il mène à la libération d'un BNP de 45 résidus, tout comme chez le rat, alors que le BNP de porc s'étend quant à lui sur 26 aa (40). Le site de clivage pour libérer l'hormone est aussi très différent d'une espèce à l'autre même s'il semble toujours faire suite à une arginine. Le site de clivage du BNP humain est cependant très apparenté à celui de l'ANP humain (26).

Malgré les divergences en séquence, le BNP comporte toujours une boucle fermée par un pont disulfure reliant deux cystéines (**Figure 1**). La boucle du BNP humain est hautement homologue à celle de l'ANP alors que les prolongements N- et C-terminaux, respectivement de 9 et 6 aa dans le cas du BNP, sont très distincts (33). Alors que la boucle est essentielle à la liaison, l'appendice carboxy-terminal du BNP affecte son activité tandis que c'est surtout la queue amino-terminale qui varie entre les espèces.

### E) Régulation

Tout comme pour l'ANP, la sécrétion du BNP peut être induite par une grande variété de stimuli physiques, physiologiques, pathologiques et chimiques. Il semblerait encore une fois que ça soit l'étirement des cavités causé par une surcharge du volume cardiaque qui en soit le principal promoteur (25). La différence la plus notable se perçoit en conditions pathologiques alors qu'il y a plus de BNP que d'ANP en circulation dans le plasma sanguin. Il est possible qu'une augmentation de production par les ventricules lors de l'insuffisance cardiaque soit responsable d'une concentration circulante plus importante de BNP que d'ANP. (13). Une autre explication viendrait du fait que l'activité alpha-adrénergique soit accrue lors d'une insuffisance cardiaque. Or, la phényléphrine favorise la stabilisation de l'ARNm du BNP mais pas de celui de l'ANP (13). Quant à son élimination, le BNP passe par les mêmes voies que l'ANP en ayant toutefois moins d'affinité pour la NEP et le NPR-C (30). Cela explique donc sa plus longue demi-vie en circulation.

### F) Effets physiologiques

Tout comme pour l'ANP, la principale fonction du BNP est de protéger le système cardiovasculaire contre toute surcharge volumique. Nous savons qu'il peut lier le même récepteur membranaire que l'ANP pour induire la production de GMPC. Le BNP a donc sensiblement les mêmes répercussions que l'ANP chez l'humain normal (**Figure 3**). Il génère ainsi lui aussi la natriurèse, la diurèse, l'inhibition de la sécrétion de rénine et d'aldostérone, la vasodilatation, le déplacement du fluide intravasculaire vers le compartiment extravasculaire en plus d'inhiber l'activité sympathique tout en aidant au déclenchement du système vagal (17, 25, 31). Le BNP peut également protéger le système cardiovasculaire contre l'hypertrophie de par ses effets antimitotiques d'inhibition de la croissance cellulaire et de la synthèse d'ADN (17). Le BNP est aussi un facteur favorisant la lipolyse dans les adipocytes humains (32). Contrairement à l'ANP, le BNP ne modifie toutefois pas la filtration glomérulaire rénale malgré qu'il soit aussi efficace pour provoquer la natriurèse et la diurèse (25). De plus, la délétion du gène du BNP chez la souris ne conduit pas automatiquement à l'hypertension et à l'hypertrophie (42). Ces souris développent

cependant des lésions fibreuses particulièrement suite à une surcharge de pression. Le BNP agirait donc dans le cœur comme un facteur anti-fibrolytique.

#### G) Pathologie et thérapeutique

Plusieurs pathologies amènent en circulation des niveaux de BNP plus élevés que l'ANP. En fait, sa sécrétion est souvent en corrélation avec le degré de dysfonction liée à la maladie. Le dosage du BNP est par conséquent communément utilisé pour évaluer la gravité de l'insuffisance cardiaque ainsi que des dysfonctions et hypertrophie ventriculaires gauche (35). Le BNP a aussi été testé pour traiter l'insuffisance cardiaque. Son administration chez des patients qui en sont atteints accroît la natriurèse tout en réduisant la précharge et la résistance vasculaire systémique sans induire le réflexe tachycardique qui lui est normalement attaché (43). Une forme synthétique de BNP a en outre été conçue. Le nesiritide est bien toléré et améliore les conditions hémodynamique et diurétique des patients souffrant d'insuffisance cardiaque. Il peut toutefois entraîner une hypotension et la bradycardie chez certains individus (37). Encore une fois, son utilisation, de même que celle des inhibiteurs de NEP, est limitée; de fortes concentrations de BNP devenant inefficaces dans les cas de pathologies avancées. Le recours au nesiritide est cependant recommandé pour traiter à court terme les insuffisants cardiaques décompensés (43). D'autre part, les peptides natriurétiques, et plus particulièrement le BNP, sont utiles pour bloquer l'hypertrophie cardiaque chez les personnes atteintes de diabète mellitus. En présence de concentrations élevées de glucose chez ceux-ci, l'action antihypertrophique des bradykinines via le monoxyde d'azote et les guanylates cyclases solubles est inhibée alors que celle dépendant des guanylates cyclases membranaires activées par les peptides natriurétiques est conservée (31).

### 1.1.3 Le peptide natriurétique de type C

#### A) Expression tissulaire

Le CNP a lui aussi été décelé dans le cerveau de porc et ce, par la même équipe à qui l'on doit la découverte du BNP (6). Bien que le CNP soit fortement exprimé par le système nerveux central, c'est l'endothélium vasculaire qui en est la principale source de sécrétion (29). D'autres tissus tels que les reins, l'hypophyse, les organes reproducteurs, l'intestin, les macrophages et les os produisent également du CNP (14). Le cœur ne synthétise quant à lui que peu de CNP qui est d'ailleurs presque inexistant dans le plasma (29).

#### B) Expression génique

Alors que les gènes codant pour l'ANP et le BNP sont situés à proximité sur le chromosome 1, chez l'humain, le CNP est localisé sur le chromosome 2 (18). Cette observation, ajoutée aux faits que la séquence du CNP est la plus conservée de ces peptides à travers les espèces animales et que seul le CNP est présent chez les vertébrés primaires, suggère que le CNP serait le prototype ancestral des peptides natriurétiques (44). L'ANP et le BNP seraient apparus par duplication génétique. Le gène humain du CNP contient un élément riche en GC qui lie le facteur de transcription TSF1 requis pour l'expression constitutive et régulée du gène (18).

#### C) Biosynthèse

Le gène du CNP est constitué de deux exons séparés par un intron et code encore une fois pour une préprohormone (18). Le peptide signal de 23 résidus est coupé de celle-ci pour donner une prohormone de 103 aa (25). Cette dernière peut être clivée à deux endroits pour libérer soit le segment carboxy-terminal de 53 aa soit un peptide de 22 aa correspondant à l'extrémité C-terminale du précédent. Le CNP-22 est plus abondant et plus biologiquement actif que le CNP-53 (18). C'est donc le CNP-22 qu'on désigne généralement par CNP. La séquence de ce peptide est identique chez l'humain, le porc et le rat alors que celle du CNP-53 est la même chez le rat et le porc avec deux substitutions par rapport à l'humain (26).

#### D) Structure

La structure globale du CNP s'apparente à celles des autres peptides natriurétiques de par sa boucle fermée par un pont disulfure reliant deux cystéines (**Figure 1**). Il s'en écarte toutefois de par son absence de prolongement C-terminal. L'analyse de son gène montre qu'un codon arrêt suit la dernière cystéine et qu'il s'agit donc de la structure telle que synthétisée et non pas le produit d'une transformation post-traductionnelle (25). Il est à noter que la boucle est une région considérablement préservée et que les trois principaux peptides natriurétiques ont en commun 11 des 17 résidus qui la composent. Cette portion en boucle est d'ailleurs la structure minimale requise pour l'activité du CNP. Le pont disulfure et la séquence Leu<sup>9</sup>-Lys<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup> sont essentiels pour la liaison et l'effet physiologique du CNP (45). À l'opposé, des modifications au prolongement N-terminal n'ont aucune conséquence pas plus que l'ajout d'une queue carboxy-terminale.

#### E) Régulation

Contrairement aux deux autres, le CNP n'est pas vraiment produit par le cœur et il est presque absent de la circulation plasmatique. Il appert qu'il exercerait plutôt des actions autocrine et paracrine (13). Sa sécrétion serait induite par des médiateurs vasoactifs tels que les cytokines, le lipopolysaccharide, le facteur de nécrose tumorale, l'interleukine-1 et même l'ANP et le BNP (46). L'endothéline-1, par contre, inhibe la production de CNP. Le CNP est lui aussi éliminé par les mêmes voies qu'emprunte la dégradation de l'ANP en étant cependant le peptide ayant la plus grande affinité pour la NEP (30). Son affinité pour le NPR-C est moyenne c'est-à-dire supérieure à celle du BNP mais inférieure à celle de l'ANP.

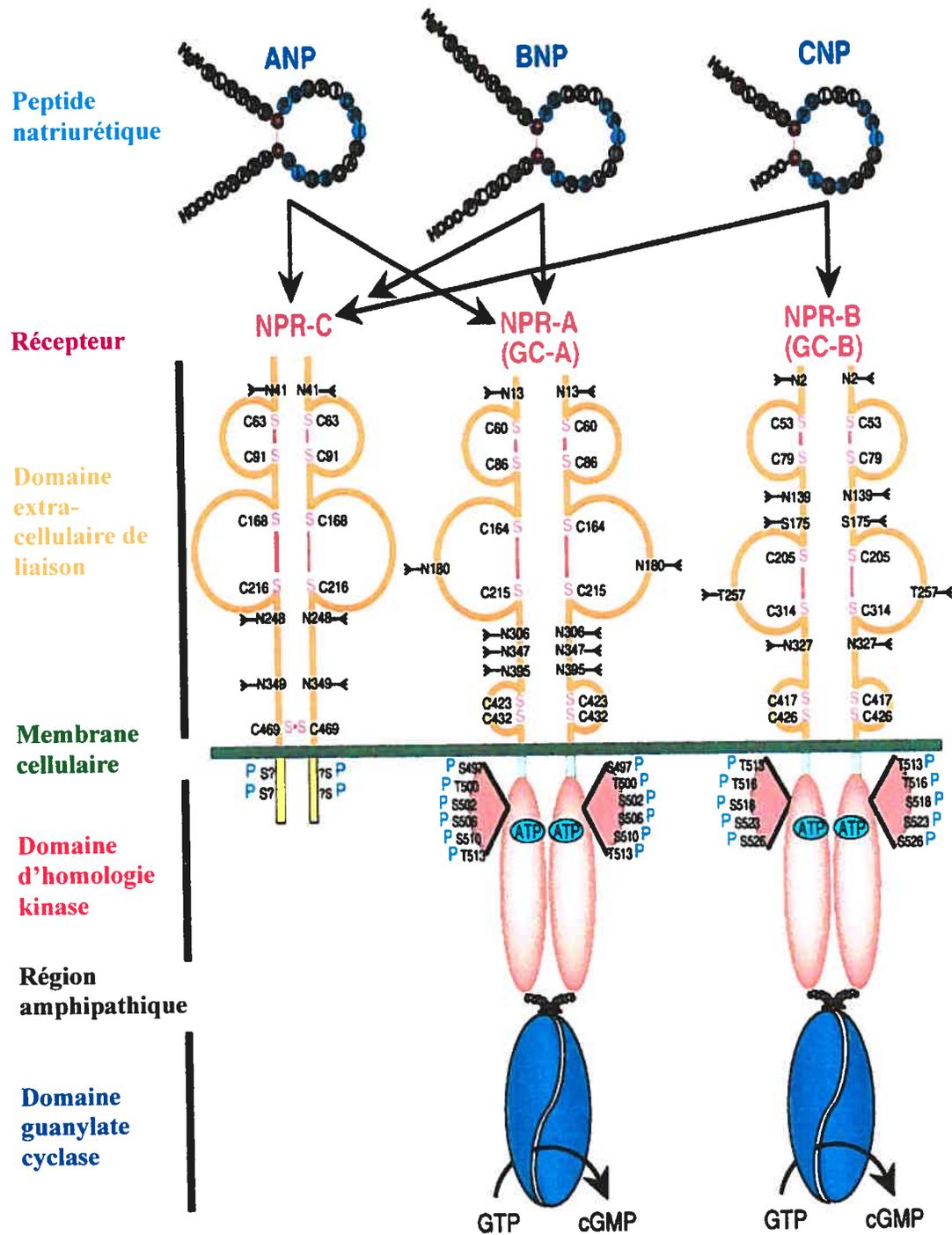
#### F) Effets physiologiques

Même si on le classe dans la famille des peptides natriurétiques en raison de certaines homologies structurales et fonctionnelles avec l'ANP et le BNP, le CNP n'a ni actions natriurétiques ni diurétiques (46). Si certains ont noté ces effets en présence de très fortes concentrations de CNP, c'est probablement en raison d'une augmentation des niveaux plasmatiques d'ANP et de BNP engendrée par une

compétition avec le CNP pour les voies de dégradation (46). De plus, le CNP est pratiquement absent de la circulation ce qui laisse croire qu'il serait essentiellement un facteur autocrine/paracrine. Le CNP est en outre un puissant agent vasodilatateur agissant plus sur les veines que sur les artères (46). Il réduit ainsi le retour veineux en plus de la pression artérielle en association avec une diminution du débit cardiaque. En commun avec l'ANP et le BNP, le CNP va aussi inhiber la transmission sympathique ainsi que la prolifération des fibroblastes et des cellules du muscle lisse vasculaire (46). Il peut également bloquer la synthèse de la rénine, de l'aldostérone et de l'arginine vasopressine (46, 34). Fait particulier, le CNP semblerait agir négativement sur l'enzyme de conversion de l'angiotensine puisqu'il empêche l'effet vasoconstricteur de l'angiotensine I mais pas de l'angiotensine II (46). Autre particularité propre au CNP, il favorise l'ossification endochondrale (47). Le CNP accroît en effet la prolifération des chondrocytes et la production de matrice cartilagineuse (48). Les souris n'exprimant pas le gène du CNP souffrent d'ailleurs de nanisme sévère en raison d'une ossification endochondrale dérégulée (49). Leur phénotype squelettique est semblable à celui des patients souffrant d'achondroplasie, la forme génétique la plus courante de nanisme chez l'être humain. Cela suggère une possible application thérapeutique du CNP pour traiter certaines formes de dysplasies squelettiques.

#### G) Pathologie et thérapeutique

Les niveaux plasmatiques du CNP ne sont augmentés ni par l'hypertension ni par l'insuffisance cardiaque mais ils le sont par le choc septique (46). Ce dernier est caractérisé par une réaction inflammatoire qui accroît l'expression du facteur- $\alpha$  de nécrose tumorale et du lipopolysaccharide. Or, ce sont deux facteurs induisant la sécrétion de CNP. Cela pourrait expliquer que le choc septique se distingue aussi par une vasodilatation périphérique et une hypotension envenimée (46). Par ailleurs, le CNP est le peptide natriurétique ayant l'activité anti-athérosclérose la plus significative (30). Il semble effectivement prévenir la progression des plaques athérosclérotiques dépendante des LDL-oxydés. Les effets antimitotiques du CNP permettent aussi de réduire la resténose reliée à l'angioplastie (36).



**FIGURE 4 : Structure générale et spécificité des récepteurs des peptides natriurétiques.** Les sites de glycosilation sont identifiés par N###, les ponts disulfures par S-S et les sites de phosphorylation par PX###. (Potter LR et Hunter T, 2001) (61).

## 1.2 Les récepteurs des peptides natriurétiques

Que leurs effets soient endocrines ou paracrines, les peptides natriurétiques stimulent la réponse cellulaire par l'intermédiaire du GMPc, le second messager intracellulaire du système. Ce dernier est produit par des guanylates cyclases intégrées à des récepteurs transmembranaires qui lient les peptides natriurétiques du côté extracellulaire. Le premier récepteur de ce type à avoir été cloné est le récepteur A des peptides natriurétiques (NPR-A), aussi appelé guanylate cyclase A (50). Ce récepteur lie préférentiellement l'ANP, presque autant mais un peu moins le BNP, et pratiquement pas le CNP (51). Le récepteur spécifique au CNP est plutôt le récepteur B des peptides natriurétiques (NPR-B) (52, 53), ou guanylate cyclase B, qui a une affinité quasi négligeable pour l'ANP et le BNP (51). Les peptides natriurétiques peuvent aussi s'ancrer sur un troisième récepteur qui ne comporte toutefois pas de domaine guanylate cyclase (54). Bien que certaines fonctions signalétiques lui soient reconnues, le récepteur C des peptides natriurétiques est davantage considéré comme une voie d'élimination des peptides natriurétiques. Les trois peptides peuvent effectivement se fixer sur le NPR-C (ANP>CNP>BNP) qui, par internalisation, les entraînera dans les lysosomes où ils seront dégradés (51, 55). Il existe bien d'autres guanylates cyclases membranaires, tels que la guanylate cyclase C qui est activée par les guanyline et uroguanyline (56), mais seuls les trois NPRs (**Figure 4**) seront vus en détails au cours de la présente section.

### 1.2.1 Le récepteur A des peptides natriurétiques

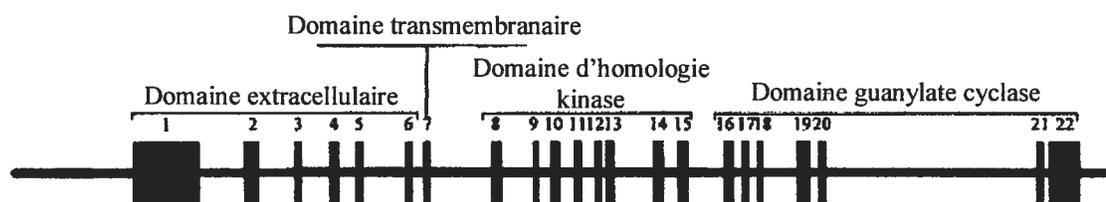
#### A) Expression tissulaire

Le NPR-A est évidemment exprimé dans les types cellulaires où agissent l'ANP et le BNP. On retrouve ainsi le NPR-A dans les reins, les surrénales, le cœur, les cellules du muscle lisse et de l'endothélium vasculaire, les poumons, les adipocytes, les testicules, l'intestin ainsi que dans les systèmes nerveux central et périphérique (56, 57). Des défauts au niveau de son expression, consécutifs de mutation dans le promoteur du gène du NPR-A, sont associés à des problèmes d'hypertension essentielle et d'hypertrophie ventriculaire (57). De plus, le retrait du

gène du NPR-A chez la souris cause l'hypertension, la fibrose, l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque en plus d'être bien souvent létal (58). La surexpression transgénique du NPR-A tant chez la souris de type sauvage que NPR-A  $-/-$  réduit quant à elle la taille des myocytes cardiaques sans abaisser la pression sanguine (59). Le NPR-A régule donc négativement la croissance des myocytes indépendamment de la pression sanguine.

### B) Expression génique

Le gène du NPR-A de rat mesure 17,5 kb et comprend 22 exons séparés par 21 introns (36) (**Figure 5**). Son promoteur ne contient pas de boîte TATA mais plutôt une boîte CCAAT aux positions -141 à -136 (36). Le facteur nucléaire Y (NF-Y) interagirait avec cette séquence. On retrouve aussi dans ce promoteur trois sites potentiels de liaison à SP1. NF-Y et SP1 agiraient de façon synergique sur la transcription du gène. Des mutations dans la boîte CCAAT ou dans les sites potentiels de liaison à SP1 abolissent complètement l'activité du promoteur (36). On sait qu'en absence de boîte TATA, un élément positionné au site de démarrage de la transcription et appelé l'initiateur peut déterminer l'emplacement du début de la transcription mais nécessite la stimulation par SP1 (60). Tous ces éléments sont communs au gène du NPR-A de la souris et de l'humain (60). Plusieurs autres domaines de liaison de facteurs de transcription ont aussi été identifiés dans le promoteur de 1,98 kb chez la souris soit : CREB, HFH-3, AML-1 $\alpha$ , AP-4, SRY, Nkx-2.5, LyF-1, p300, GATA 1 et 2, HNF-3 $\beta$ , c/EBP  $\alpha$  et  $\beta$  et USF (60). Le site du démarrage de la transcription y est situé à 362 pb en aval du codon de départ alors qu'il est à 370 pb chez le rat et à 88 pb chez l'humain.



**FIGURE 5 : Organisation structurale du gène du NPR-A.** Les boîtes représentent les positions et la dimension des exons. (Garg R et coll., 2002) (60)

### C) Structure

Le gène du NPR-A code pour une protéine de 130 kDa comportant un domaine extracellulaire d'environ 450 aa, une région hydrophobe transmembranaire de 21 aa et un domaine intracellulaire de 566 aa (61) (**Figure 4**). À l'état de base, le récepteur existe sous la forme d'un dimère présentant des interactions de part et d'autre de la membrane plasmique. Il s'agit d'un dimère lâche non relié de manière covalente. Sans exhiber de pont disulfure intermoléculaire, le domaine extracellulaire arbore trois ponts intramoléculaires entre les cystéines 60 et 86, 164 et 215 ainsi que 423 et 432 (61). Cette portion N-terminale est aussi pourvue de cinq sites de glycosylation aux asparagines 13 (riche en mannose), 180 (complexe), 306 (complexe), 347 (complexe) et 395 (riche en mannose et hybride) (62). Cette glycosylation semble requise pour obtenir le bon repliement et/ou le transport du NPR-A à la membrane mais n'apparaît pas être impliquée dans la liaison du peptide. Une déglycosylation enzymatique ou une mutation de ces sites réduisent en effet l'habilité du récepteur pour la production de GMPc sans toutefois modifier son affinité pour l'ANP (61, 62).

Le domaine extracellulaire du NPR-A (ECD) de rat a été cristallisé en absence de ligand au tournant du millénaire (63). Les auteurs en avaient déduit une forme en V pour le dimère avec une stœchiométrie récepteur:peptide de 2:2 (**Figure 6**). Cela était en accord avec certains travaux (64) mais en contradiction avec d'autres (65). Les mêmes auteurs revinrent par la suite sur leur conclusion en suggérant qu'une conformation en A avec un seul site de liaison était aussi possible (66) (**Figure 6**). La controverse dura quelques années jusqu'à ce que des études de dimérisation avec des agents de co-liaison montrèrent que le NPR-A adopte plutôt une forme en A comportant un seul site de liaison (67). La mutation en cystéine d'un tryptophane du lobe amino-terminal (en position 74) a produit un NPR-A mutant constitutivement dimérique covalent. L'ANP ne pouvait cependant ni lier ni activer ce dimère. De plus, l'ANP empêchait la formation du pont disulfure qui réunissait le dimère de façon covalente. Le tout redevenait par contre fonctionnel en ajoutant des agents alkylants bifonctionnels qui permettaient de conserver le dimère covalent mais en espaçant l'interaction entre les cystéines 74. Il y a donc une interface dynamique au

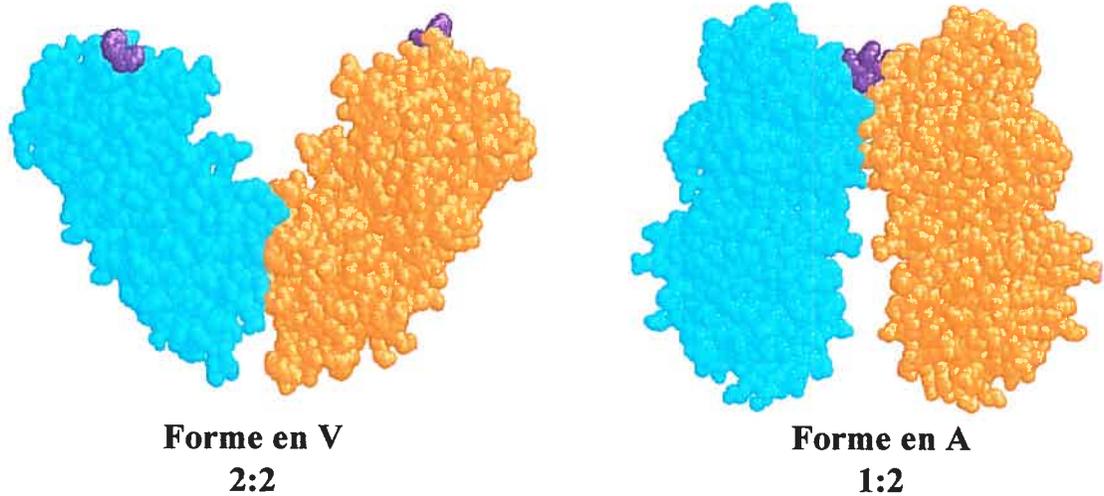
niveau du lobe N-terminal et l'ANP viendrait stabiliser le dimère lâche dans une conformation plus restreignante. Ces résultats furent confirmés par des études de mutagenèse dirigée et par la cristallisation du ECD de rat lié à un ANP tronqué (ANP<sub>7-27</sub>) (68, 69) (Figure 7).

**Tableau I : Interactions entre les résidus du complexe agoniste (pBNP1) – NPR-A.** (Jossart C et coll., 2005) (70).

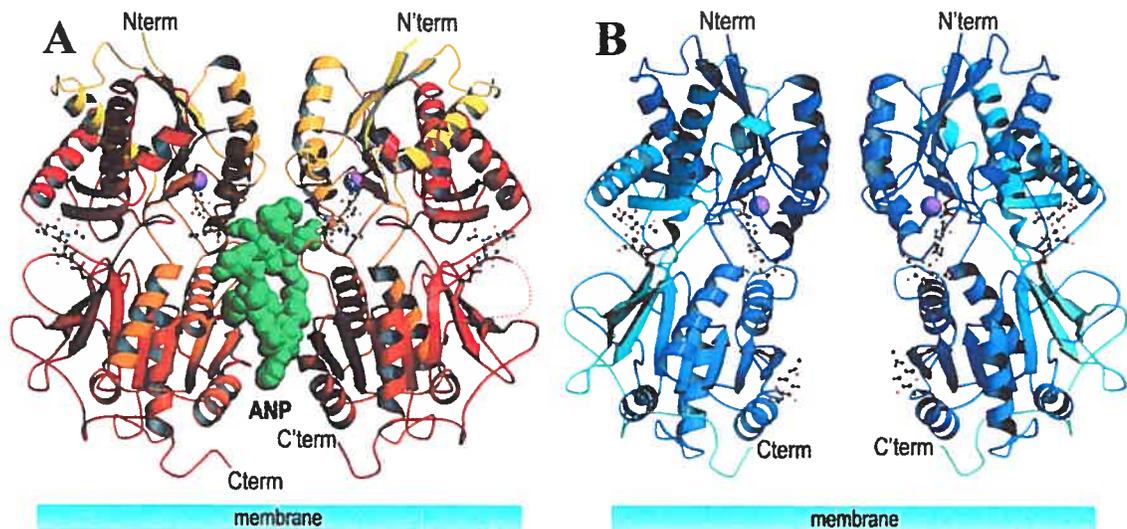
| pBNP1             | Site A   | Site B  |
|-------------------|--|---|
| Ser <sup>1</sup>  | R176 <sup>2ab</sup> , D177 <sup>ab</sup> , N180 <sup>ab</sup>  |   |
| Leu <sup>2</sup>  | R176 <sup>b</sup>  |   |
| Arg <sup>3</sup>  | F172 <sup>b</sup> , M173 <sup>b</sup> , R176 <sup>b</sup> , D177 <sup>2a</sup>   |   |
| Arg <sup>4</sup>  |  | F188 <sup>b</sup> , D192 <sup>a</sup> , L193 <sup>b</sup> , H195 <sup>2ab</sup> , R198 <sup>ab</sup>  |
| Ser <sup>5</sup>  |  | E187 <sup>b</sup> , R198 <sup>b</sup>   |
| Ser <sup>6</sup>  | F172 <sup>b</sup> , H185 <sup>b</sup>  |   |
| Cys <sup>7</sup>  | Y154 <sup>b</sup> , F165 <sup>b</sup>  |   |
| Phe <sup>8</sup>  | Y154 <sup>b</sup> , F165 <sup>b</sup> , V168 <sup>b</sup> , E169 <sup>b</sup> , F172 <sup>b</sup> ,<br>M173 <sup>b</sup> , H185 <sup>b</sup> |   |
| Gly <sup>9</sup>  | F172 <sup>b</sup> , M173 <sup>b</sup>  |   |
| Arg <sup>10</sup> | M173 <sup>b</sup>  | D192 <sup>2a</sup>  |
| Arg <sup>11</sup> | M173 <sup>b</sup>  | Y156 <sup>ab</sup> , R157 <sup>b</sup> , P158 <sup>b</sup> , E187 <sup>ab</sup>   |
| Leu <sup>12</sup> |  | Y88 <sup>b</sup> , Y156 <sup>b</sup> , P158 <sup>a</sup>  |
| Asp <sup>13</sup> | G113 <sup>b</sup> , V116 <sup>b</sup> , Y120 <sup>2a</sup>   |   |
| Arg <sup>14</sup> | R95 <sup>b</sup> , E119 <sup>2ab</sup> , Y120 <sup>ab</sup>  | S61 <sup>b</sup> , Y88 <sup>b</sup> , P158 <sup>b</sup> , G159 <sup>b</sup>   |
| Ile <sup>15</sup> | Y88 <sup>b</sup> , F165 <sup>b</sup> , F166 <sup>b</sup>   |   |
| Gly <sup>16</sup> | Y88 <sup>b</sup>   |   |
| Ser <sup>17</sup> | Y88 <sup>b</sup> , P92 <sup>b</sup>  | A91 <sup>b</sup> , P92 <sup>b</sup> , R95 <sup>b</sup>  |
| Leu <sup>18</sup> | Y88 <sup>a</sup>   | V87 <sup>b</sup> , Y88 <sup>b</sup> , A91 <sup>b</sup> , A111 <sup>b</sup> , G113 <sup>b</sup> , F114 <sup>b</sup> ,<br>Y120 <sup>b</sup> , F166 <sup>b</sup> |
| Ser <sup>19</sup> | Y88 <sup>ab</sup> , P158 <sup>b</sup> , D160 <sup>b</sup> , E162 <sup>b</sup>  | F166 <sup>b</sup>   |
| Gly <sup>20</sup> |  | L112 <sup>b</sup> , F165 <sup>b</sup> , F166 <sup>b</sup> , E169 <sup>ab</sup>  |
| Leu <sup>21</sup> | Y156 <sup>b</sup> , P158 <sup>b</sup>  | E169 <sup>ab</sup>  |
| Gly <sup>22</sup> |  | F165 <sup>b</sup> , E169 <sup>b</sup>   |
| Cys <sup>23</sup> | F165 <sup>b</sup>  |   |
| Asn <sup>24</sup> |  | Y154 <sup>b</sup> , Y156 <sup>ab</sup> , E187 <sup>2ab</sup>  |
| Ser <sup>25</sup> |  |   |
| Phe <sup>26</sup> | L186 <sup>b</sup> , E187 <sup>b</sup> , H195 <sup>b</sup>  |   |
| Arg <sup>27</sup> | Y154 <sup>b</sup> , Y156 <sup>b</sup> , P158 <sup>b</sup> , F165 <sup>b</sup> , E187 <sup>4ab</sup>  |   |
| Tyr <sup>28</sup> |  | L112 <sup>b</sup> , F172 <sup>b</sup> , M173 <sup>b</sup> , R176 <sup>2a</sup>  |

<sup>a</sup> Indique un pont hydrogène (un chiffre est ajouté lorsqu'il y en a plus d'un).

<sup>b</sup> Indique un contact hydrophobique ou de van der Waal

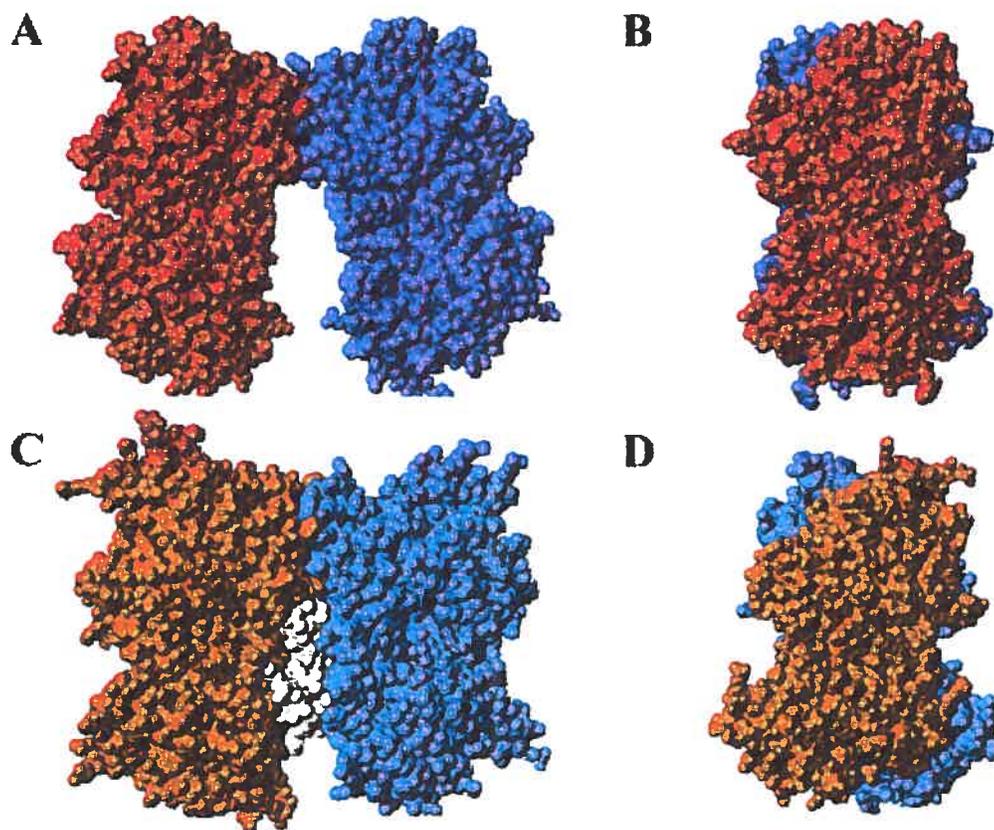


**FIGURE 6 : Possibilités de structure du domaine extracellulaire du NPR-A déduites de la cristallisation.** La forme en V (domaine de dimérisation proximal à la membrane) avec deux sites de liaison pour le peptide s'oppose à la forme en A (domaine de dimérisation distal à la membrane) ne comportant qu'un seul site de liaison. Le tryptophane 74 est illustré en magenta (Van der Akker F et coll., 2000 et 2001, De Léan A et coll., 2003) (63, 66, 67).



**FIGURE 7 : Structure déduite de la cristallisation du domaine extracellulaire du NPR-A avec et sans l'ANP lié.** A) Avec l'ANP<sub>7-27</sub> (vert). B) Sans l'ANP. Les ions de chlore sont en magenta. (Ogawa H et coll., 2004) (69).

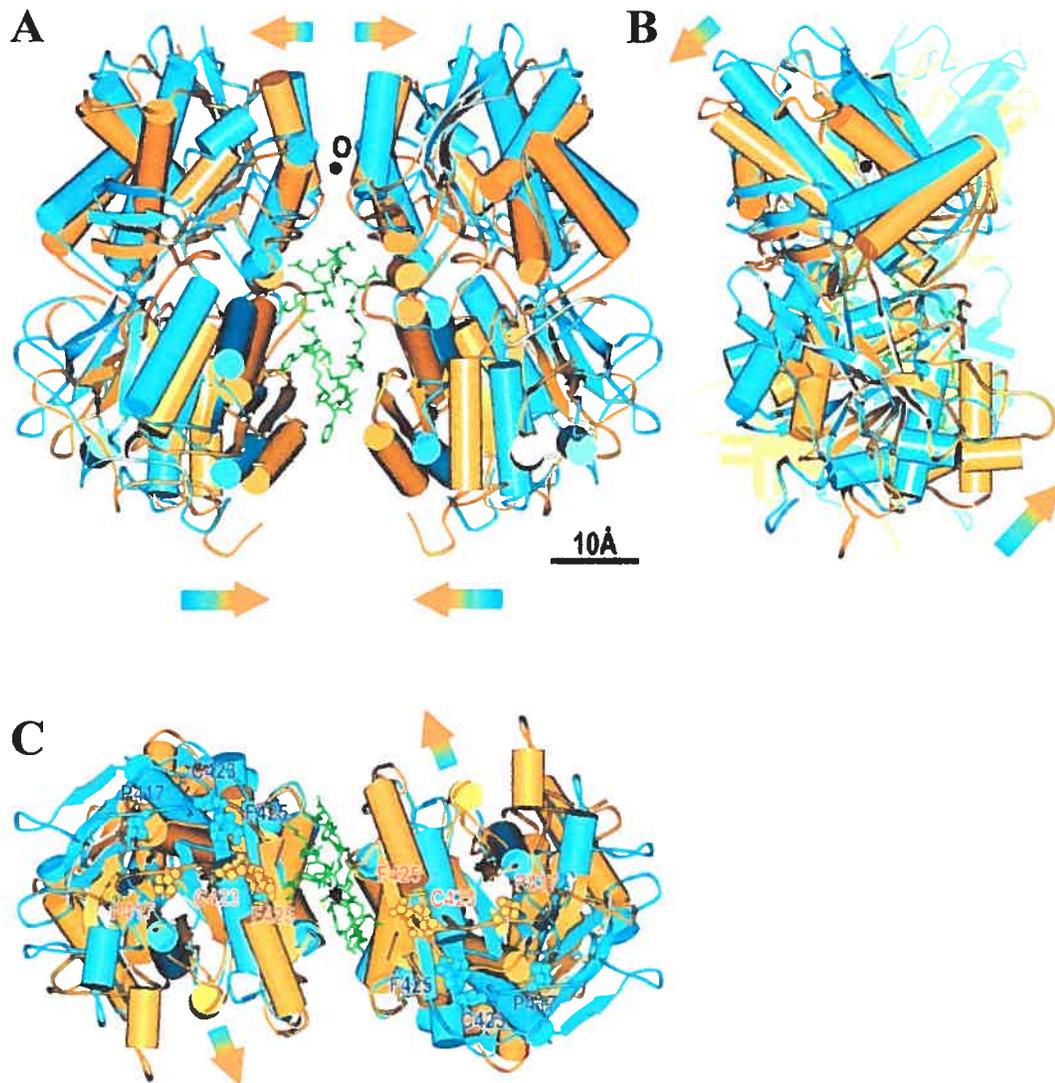
Par ailleurs, de nouvelles études de photomarquage ont permis le développement d'une modélisation de la liaison d'un peptide pleine longueur sur le récepteur entier (70) (**Figure 8** et **Tableau I**). La portion N-terminale de l'agoniste utilisé interagit avec la région entre l'acide aspartique 177 et la valine 183 du NPR-A alors que la leucine 18 de la boucle s'accroche près de la valine 116 de la sous-unité opposée du dimère. La tyrosine 28 de la queue C-terminale du peptide serait quant à elle localisée à proximité de la méthionine 173. La position des segments N- et C-terminaux diffère des résultats du nouveau cristal en raison de l'absence de la portion amino-terminale dans le peptide qui a permis d'obtenir ce dernier. La queue carboxy-terminale y prend la place de la portion N-terminale établie par la modélisation.



**FIGURE 8 : Modèle du domaine extracellulaire du NPR-A en absence ou présence du peptide.** A) Vue de front du dimère relâché. B) Profil du dimère relâché. C) Vue de front du dimère resserré autour du peptide. D) Profil du dimère resserré autour du peptide. (Jossart C et coll., 2005) (70).

Alors que la portion extracellulaire du NPR-A sert à lier le peptide dans une poche de liaison définie par deux interfaces de dimérisation (distale et proximale à la membrane), le segment cytoplasmique offre plusieurs subdivisions aux fonctions complexes. Il comporte en effet un domaine juxtamembranaire d'approximativement 250 aa homologues aux kinases (KHD) et un domaine catalytique C-terminal d'environ 250 aa à l'activité guanylate cyclase (GC) (61). Ces deux sections sont rattachées par une région hélicoïdale surenroulée et amphipathique de 41 aa. Cette dernière est responsable de la dimérisation du côté cytoplasmique puisque sa délétion produit une construction intracellulaire monomérique et inactive alors que le domaine intracellulaire exprimé seul est dimérique et affiche une activité guanylate cyclase relative (62).

La portion intracellulaire exprimée sans le KHD est par contre beaucoup plus active. En fait, le récepteur entier produit sans KHD est lui-même constitutivement actif (62). Le KHD aurait donc une action répressive sur la GC qui serait relevée suite à la liaison de l'agoniste sur l'ECD. On dit de ce domaine qu'il est « homologues aux protéines kinases » en raison du fait qu'il présente une séquence en acides aminés semblable au domaine catalytique des kinases sauf entre autre pour un acide aspartique essentiel à l'activité kinase (71). Bien qu'il ne présente donc pas cette activité, le KHD est phosphorylable. Il est phosphorylé à l'état de base aux sérines 497, 502, 506 et 510 en plus des thréonines 500 et 513 (61). Cette phosphorylation est essentielle à l'activité guanylate cyclase du NPR-A. Le KHD est aussi pressenti pour contenir un site de liaison à l'ATP (62). La séquence glycine503-arginine-glycine-sérine-asparagine-tyrosine-glycine509 a été suggérée comme étant le module de régulation de l'ATP en raison de sa similarité avec la séquence consensus de liaison de l'ATP GXGXXG retrouvée dans plusieurs kinases (61, 62). Or, la liaison directe de l'ATP sur le NPR-A n'a jamais été montrée et la mutation en alanine des trois glycines ne réduit que légèrement l'activité guanylate cyclase du récepteur en cellules entières alors que l'ATP est essentielle à celle-ci (61).



**FIGURE 9 : Rotation de la structure quaternaire du domaine extracellulaire du NPR-A induite par l'ANP.** La structure du dimère lié (orange) se superpose à la structure du dimère libre (cyan). Les hélices- $\alpha$  sont représentées par des cylindres alors que les feuillets- $\beta$  sont illustrés sous la forme de rubans. L'ANP est désigné par des bâtonnets verts. Le point O est le centre de rotation et les flèches indiquent le mouvement de la structure. A) Vue de front. B) Vue de profil. C) Vue du dessous. (Ogawa H et coll., 2004) (69).

Le domaine GC ressemble un peu aux guanylates cyclases solubles (GCs) et au domaine catalytique de l'adénylate cyclase à la différence qu'il s'agit d'un homodimère plutôt que d'un hétérodimère (61). Il contient par conséquent deux sites potentiels pour la production de GMPc à partir du GTP et non pas un seul. On ne sait cependant pas si ces sites de catalyse peuvent fonctionner simultanément ou alternativement. Comme pour ses congénères, la GC a toutefois besoin de se dimériser pour être active. Puisque les résidus de l'adénylate cyclase interagissant avec le ribose, le triphosphate et le magnésium sont conservés chez la GC, on croit qu'ils y auraient les mêmes fonctions (61). Les résidus interagissant avec la purine seraient quant à eux responsables de la spécificité pour le substrat. D'ailleurs, les acides aminés glutamate 925 et cystéine 997 de la guanylate cyclase rétinienne forment des ponts hydrogènes avec la guanine et leur mutation respective en lysine et arginine (leurs résidus correspondants dans l'adénylate cyclase) change la spécificité de la poche catalytique pour l'ATP plutôt que le GTP. Ces résidus sont conservés pour le NPR-A et pourraient y jouer le même rôle (61).

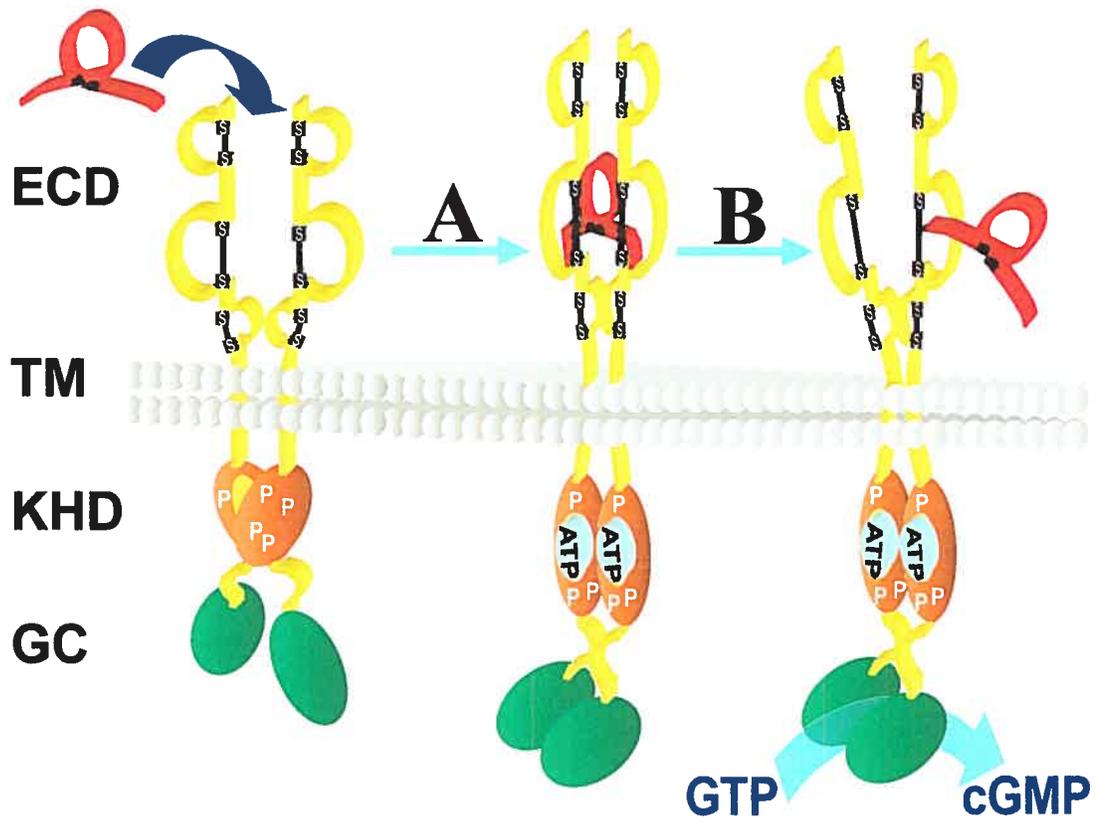
#### D) Signalisation

Le processus menant à l'activation de la GC débute par la liaison de l'agoniste sur le récepteur. Le peptide viendrait s'intercaler entre les interfaces de dimérisation distal et proximal à la membrane. Selon la modélisation de Jossart et coll. (70), cette liaison aurait pour effet de rapprocher les sous-unités de l'homodimère, du moins au niveau de l'ECD, en plus d'engendrer une rotation dans la région juxtamembranaire de l'ECD (**Figure 8**). La récente cristallisation permet aussi de voir cette rotation induite par l'ANP mais pas le rapprochement (69) (**Figure 9**). Cela s'explique peut-être par le fait que, contrairement à la modélisation, le cristal n'a pas été obtenu à partir d'un récepteur intercalé dans la membrane phospholipidique mais plutôt à partir de l'ECD seul. Les études d'agents de co-liaison décrites plus haut tendent aussi à démontrer un resserrement du dimère suite à la liaison de l'ANP, resserrement autour du peptide qui pourrait expliquer l'état de haute affinité (67). La rotation de la région juxtamembranaire est en accord avec d'autres études qui ont montré que la liaison de l'ANP rendait cette région sensible au clivage par des protéases (72) et

favorisait la dimérisation du mutant NPR-A D435C (73). L'ajout d'une cystéine supplémentaire au niveau juxtamembranaire de l'ECD permettait effectivement la dimérisation du NPR-A par pont disulfure mais seulement en présence d'agoniste. Ce mutant partage un patron dose-réponse guanylate cyclase similaire au NPR-A de type sauvage mais demeure actif même après le retrait de l'agoniste du milieu de culture.

Par ailleurs, une construction tronquée de ce mutant duquel on aurait retiré la portion intracellulaire donne un récepteur de plus grande affinité et constitutivement dimérique covalent (73). De plus, le NPR-A exprimé sans KHD est constitutivement actif (61). Le KHD réprime donc l'activité GC et confère possiblement à l'ECD une position fixe particulièrement au niveau proximal de la membrane. L'agoniste viendrait ainsi induire un changement conformationnel dans cette région, mouvement qui se transmettrait de l'autre côté de la membrane pour relever ultimement l'inhibition de la GC dépendante du KHD. Cette nouvelle conformation serait conservée par le pont disulfure du NPR-A D435C ce qui expliquerait la persistance de son activation en absence d'agoniste. Ce mouvement juxtamembranaire nécessiterait l'attachement à la membrane puisque la version ECD seul du mutant D435C ne devient pas dimérique covalent même en présence d'ANP (73).

La suppression de l'action inhibitrice du KHD ne serait toutefois pas directement causée par le changement conformationnel induit par l'agoniste. Un effet allostérique de l'ATP est essentiel (36). Cette action de l'ATP fait suite à la liaison de l'agoniste sur le récepteur. On présume donc que la liaison de l'hormone à l'ECD changerait la structure du NPR-A permettant ainsi l'interaction de l'ATP avec le KHD (62) (**Figure 10**). Trois phénomènes font suite à l'intervention de l'ATP : 1) l'activation de la GC, 2) une transition temps-dépendante d'un état de haute affinité vers un état de basse affinité qui amène la libération de l'agoniste et 3) la déphosphorylation du KHD (61). Or, la phosphorylation est requise pour la transmission du signal, le récepteur déphosphorylé ne peut donc répondre à une stimulation subséquente. Ce phénomène de désensibilisation sera abordé plus en détails dans la section 1.3.



**FIGURE 10: Transduction du signal.** A) La liaison de l'ANP entraîne un resserrement du NPR-A dimérique ce qui a pour effet de favoriser l'association de l'ATP aux KHDs. B) S'ensuit la dissociation de l'ANP et le rapprochement des GCs permettant la production de GMPc par ces dernières.

L'interaction de l'ATP avec le KHD induirait l'activation de la GC en modifiant l'orientation de la région hélicoïdale reliant le KHD à la GC (**Figure 10**). Les hélices amphiphiliques se positionneraient alors pour permettre la dimérisation des sous-unités GC (61). Cette dimérisation confère à la GC l'habilité de produire du GMPc. Le GTP est utilisé comme substrat alors que le magnésium ou le manganèse servent de cofacteur à la réaction (56). Le GMPc produit peut ensuite réguler diverses protéines cytoplasmiques et membranaires pour propager la réponse cellulaire commandée par l'hormone. Il pourrait possiblement agir à l'extérieur de la cellule puisqu'il est continuellement excrété par transport actif indépendamment de sa concentration intracellulaire (74).

### E) Régulation

Les niveaux de GMPc cytoplasmiques sont contrôlés par les enzymes phosphodiésterases (PDE) (75). Il en existe plus d'une cinquantaine classées en familles selon leur homologie, chaque famille comportant plusieurs sous-types provenant de gènes différents et aux isoformes multiples. Les isoformes sont exprimés de façon très sélective dans divers types de cellules. Les PDEs sont formées de deux domaines régulateurs délimitant une région centrale catalytique. C'est à cet endroit qu'est clivé le lien 3'-phosphodiester pour libérer le 5'-GMP, la version inactive du GMPc (75).

Outre une action directe sur le GMPc, la voie de signalisation globale est aussi contrôlée par des mécanismes de régulation agissant aux niveaux de l'hormone (voir section 1.1) et du récepteur. Il y a d'abord la désensibilisation rapide du NPR-A qui sera abordée à la section 1.3 mais il y a également des mécanismes agissant plus tardivement. L'équipe du Dr Pandey présente depuis plusieurs années des résultats montrant qu'à moyen terme, le NPR-A serait internalisé par endocytose et qu'un certain nombre serait dégradé dans les lysosomes, conjointement avec le ligand, alors qu'une autre portion serait recyclée à la membrane (76). Ils ont même récemment décrit le motif qui serait responsable de l'internalisation et des voies de circulation du NPR-A (77). Le problème est que maintes autres équipes sont arrivées aux conclusions opposées et ce même en suivant parfois des protocoles identiques (78, 79, 80). Il faut dire que le laboratoire en question utilise des cellules transformées exprimant très fortement le NPR-A. Ces cellules pourraient donc montrer une endocytose constitutive de protéines membranaires piégées non spécifiquement dans des puits d'internalisation (80). Toutes ces données face aux litigieux résultats d'un seul laboratoire font que le consensus soit que le NPR-A ne s'internalise pas.

À long terme, toutefois, l'ANP amène une réduction de la quantité d'ARNm du NPR-A. Cet effet dépend du temps d'incubation et de la concentration de l'agoniste (36). Il appert que la région -1575 à -1290 du gène du NPR-A est sensible à une incubation avec l'ANP, le BNP ou le 8-bromo-GMPc (un dérivé du GMPc qui peut traverser la membrane plasmique vers l'intérieur). Cette région pourrait donc contenir un élément de réponse au GMPc qui réprimerait l'expression du récepteur.

La transcription du gène du NPR-A peut aussi être inhibée par l'angiotensine II et l'endothéline-1 (57). Au terme de sa transcription, le NPR-A est ultimement mûré pour se rendre à la membrane. Le KHD forme d'ailleurs un complexe avec la chaperone HSP90 et la co-chaperone p50<sup>cdc37</sup> et cette interaction est essentielle à la réponse guanylate cyclase (36).

D'autres éléments peuvent entrer en contact avec le NPR-A pour le réguler. L'amiloride interagit avec le KHD pour stabiliser l'état de haute affinité envers le ligand et antagonise l'interaction avec l'ATP en agissant cependant sur un site différent (36, 61). De plus, il semble que le chlore soit requis pour la liaison de l'ANP sur le NPR-A (62). Son effet régulateur est par contre discutabile étant donné que la concentration de chlore nécessaire pour 50% de la liaison maximale est de deux ordres de magnitude sous le niveau physiologique (61).

### 1.2.2 Le récepteur B des peptides natriurétiques

#### A) Expression tissulaire et génique

Le NPR-B est exprimé dans le cerveau, les os, les reins, les poumons, la rate, les fibroblastes ainsi que dans les cellules de l'endothélium et du muscle lisse vasculaires (56, 57). Le gène du NPR-B mesure 16,5 kb et comprend 22 exons (36). Il est très semblable à celui du NPR-A. Les individus porteurs de mutations dans ce gène souffrent de problèmes au niveau de la croissance osseuse (81). Ces cas particuliers sont nettement plus petits que la moyenne en raison d'une dysplasie acromésomélisme de type Maroteaux.

#### B) Structure

La structure du NPR-B est également très similaire à celle du NPR-A (**Figure 4**). Son domaine extracellulaire d'environ 450 aa a 44% d'homologie avec sa contrepartie (61, 35). On y retrouve encore une fois des ponts disulfures intramoléculaires (cystéines 53-79, 205-314 et 417-426) et cinq sites de glycosylation essentiels à la bonne maturation de la protéine (61). Une région hydrophobe de 21

résidu sert de lien transmembranaire avec la portion intracellulaire de 568 aa (61). Du côté cytoplasmique, il y a d'abord un KHD présentant 63% d'homologie avec son équivalent NPR-A (35). Le KHD du NPR-B est lui aussi phosphorylé (sérines 513, 518, 523, 526 et thréonine 516) et pourrait contenir un site de liaison pour l'ATP (61). Encore une fois, la phosphorylation, présente à l'état de base, et l'interaction avec l'ATP sont indispensables pour l'activation de la GC. La GC est reliée au KHD par une région hélicoïdale amphipathique de 41 aa et a 88% d'homologie avec la GC correspondante du NPR-A (61, 35). Les résidus impliqués dans la catalyse et la spécificité du substrat sont en outre conservés.

### C) Signalisation et régulation

La transduction du signal dans le cas du NPR-B est identique à celle du NPR-A (**Figure 10**). Le CNP va se lier à l'ECD pour possiblement resserrer le dimère lâche et induire un mouvement au niveau juxtamembranaire (36). Ce mouvement se transmettrait de l'autre côté de la membrane et permettrait l'interaction de l'ATP avec le KHD. L'action répressive du KHD sur la GC serait alors levée (36). Comme c'est le cas avec le NPR-A, l'ATP n'induit pas seulement la dimérisation et l'activation des GC. L'ATP provoque aussi une transition temps-dépendante d'un état de haute affinité vers un état de basse affinité qui amène la libération de l'agoniste (36). De plus, le NPR-B est déphosphorylé suite à l'intervention de l'ATP et cette perte de groupements phosphates est ici aussi responsable de l'état désensibilisé du récepteur (61). Des résultats qui en laissent plusieurs perplexes montreraient le même patron d'internalisation-dégradation/recyclage que le NPR-A suite à la stimulation par l'agoniste (36). D'autres arrivent cependant aux conclusions inverses (78). Il est donc plus probable que le NPR-B ne s'internalise pas.

### 1.2.3 Le récepteur C des peptides natriurétiques

#### A) Expression tissulaire et génique

Le NPR-C est le récepteur des peptides natriurétiques le plus abondant dans le corps humain. Sa distribution tissulaire entre en corrélation avec les lieux d'action des peptides natriurétiques. Le NPR-C est ainsi présent dans le cœur, le cerveau, les reins, l'endothélium et le muscle lisse vasculaire, les poumons, les surrénales et autres glandes endocrines (18, 26). L'inactivation du gène du NPR-C crée des souris où l'ANP a une demi-vie en circulation deux fois plus longue que chez le type sauvage (82). Même si les niveaux plasmatiques d'ANP et de BNP n'y sont pas significativement plus élevés, ces souris NPR-C *-/-* ont une pression sanguine sous la normale et une diurèse supérieure. Le NPR-C modulerait donc la disponibilité des peptides natriurétiques dans leurs tissus cibles (82). Ces souris présentent aussi des déformations squelettiques reliées à une augmentation du métabolisme osseux. À l'opposé, une surexpression du NPR-C a été décrite chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque ou d'hypertension liée à l'obésité; deux pathologies caractérisées par une réponse à l'ANP altérée (57). De fortes concentrations de NaCl résultent en une diminution de l'expression du NPR-C et cela peut-être par l'action des peptides natriurétiques (57). Les peptides natriurétiques amènent en effet une réduction des niveaux d'ARNm du NPR-C via la production de GMPc (36). Les glucocorticoïdes, les facteurs de croissance, les cathécolamines et l'angiotensine II sont aussi reconnus pour défavoriser l'expression du NPR-C (36, 57).

#### B) Structure et fonctions

Le gène du NPR-C code pour deux isoformes différant d'un segment de 3 paires de base (83). La séquence Sérine431-Glycine432 de la forme majeure est remplacée par une cystéine. Les deux comportent un domaine extracellulaire de 436 ou 435 résidus et une courte queue cytoplasmique de 37 aa joints par un passage transmembranaire long de 23 unités (**Figure 11**). Leur portion extracellulaire a 33% d'homologie avec l'ECD du NPR-A et aligne deux ponts disulfures intramoléculaires (cystéines 63-91 et 168-216) en plus de un ou deux intermoléculaires au niveau des cystéines 428 et 431 (si présente) (84, 85). On y retrouve aussi des sites de

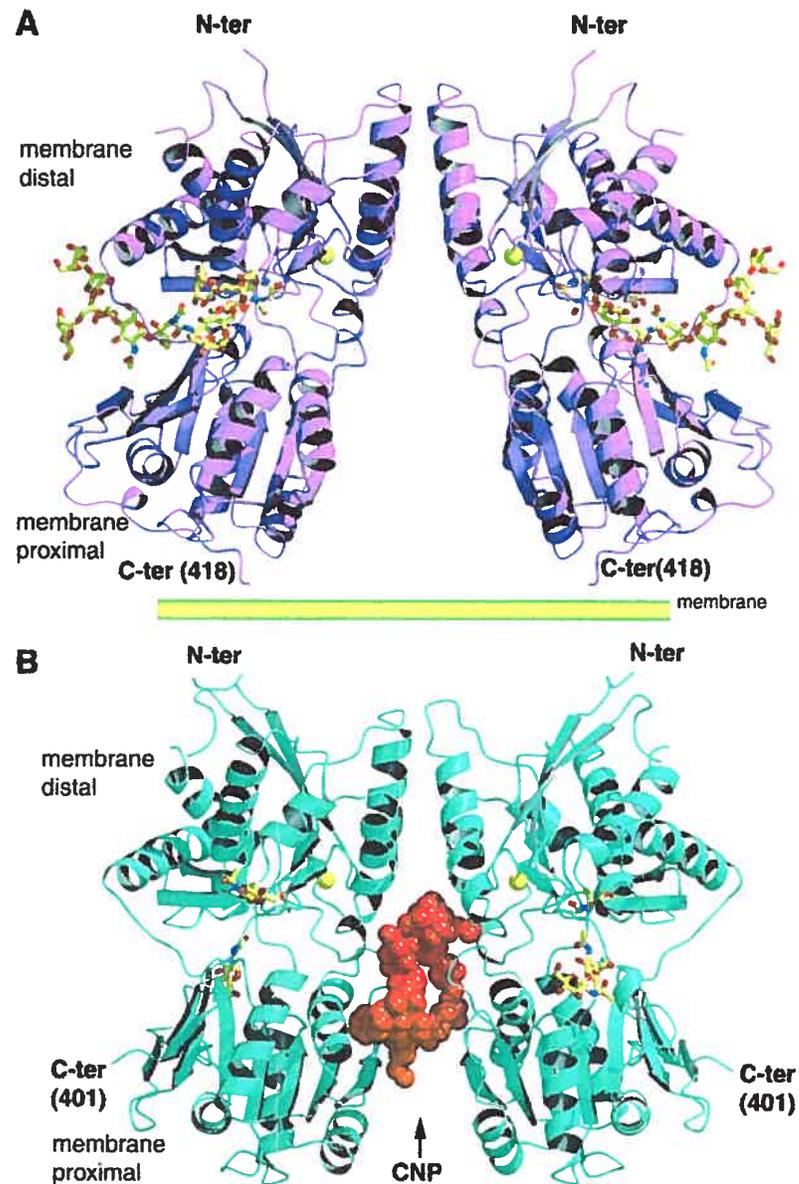
glycosylation aux asparagines 41 (complexe), 248 (riche en mannose) et 349 (complexe) (85).

Le NPR-C est donc exprimé sous la forme d'un homodimère covalent dont la dimérisation n'est toutefois pas essentielle à la liaison du peptide (86). La structure du cristal de son ECD seul ou liant le CNP montre l'attachement d'un unique ligand dans la poche de liaison aménagée au centre du dimère (87). Le dimère arbore la conformation en A avec une interface de dimérisation entre les régions hydrophobiques amino-terminales. L'interaction avec l'hormone induit un rapprochement des sous-unités au niveau du domaine proximal à la membrane. Ni les chaînes latérales glycosylées ni les atomes de chlore (un par monomère) n'interagissent avec le ligand.

Le rôle premier du NPR-C est de débarrasser le milieu ambiant des peptides natriurétiques. Il accomplit cette tâche en entraînant avec lui ces molécules lors de son internalisation. Cette internalisation est constitutive et passe par un processus d'endocytose via des puits tapissés de clathrine (88). Le ligand est dirigé vers les lysosomes pour y être dégradé alors que le récepteur est recyclé à la membrane. L'ensemble du mécanisme requiert la tyrosine 508 et la dimérisation du NPR-C (88). Le ratio de dissociation du peptide est beaucoup plus lent que le taux d'internalisation du récepteur ce qui permet un temps d'interaction suffisant pour internaliser le ligand.

La petite portion intracellulaire du NPR-C est phosphorylée sur plusieurs sérines (89) et comporte aussi une séquence d'activation des protéines G (90). Ce segment de 17 aa débute par deux arginines et se termine par un motif histidine-arginine-glutamate-leucine-arginine conformément à la séquence consensus de 10 à 26 aa BB...BBXXB (où B est une base) reconnue pour interagir avec les  $G_i$ . La liaison des peptides natriurétiques sur le NPR-C est en outre liée à une activation de la phospholipase C- $\beta_3$  via les sous-unités  $\beta\gamma$  de  $G_{i-1/2}$  et à l'inhibition de l'adénylate cyclase par les sous-unités  $\alpha$  (91). C'est donc par l'hydrolyse des phosphoinositols ou par une diminution de l'AMPc que les peptides natriurétiques pourraient induire via le NPR-C des effets aussi diversifiés que l'inhibition de la cyclooxygénase-2, l'activation de la synthase d'oxyde nitrique endothéliale, l'inhibition des canaux

calciques de type-L, l'inhibition de la sécrétion d'endothéline-1 ainsi que des effets antiprolifératifs sur les cellules endothéliales (92, 93, 94).



**FIGURE 11 : Structure tridimensionnelle du domaine extracellulaire du NPR-C déduite de la cristallisation. A) Représentation du dimère non-lié au ligand. B) Représentation du dimère liant le CNP (rouge). (He XL et coll., 2001) (87).**

### 1.3 Les processus de désensibilisation des NPR-A/B

Grâce à leurs actions hypotensives et anti-hypertrophiques, les peptides natriurétiques pourraient être très utiles pour atténuer certaines conditions pathologiques parmi les plus létales en Occident. Malheureusement, face à une stimulation chronique, les tissus deviennent insensibles aux peptides natriurétiques. Le maintien de maladies telles que l'insuffisance cardiaque et l'hypertension sont de possibles conséquences de ce mécanisme d'interruption du signal. L'insuffisance cardiaque est d'ailleurs caractérisée par des concentrations massives d'ANP et de BNP en circulation où la réponse à ces hormones est toutefois altérée (17). Outre les mécanismes de régulation à long terme abordés précédemment, ce phénomène s'explique souvent à court terme par des modifications au niveau de la structure du récepteur (95). Ces modifications empêchent la transduction du signal normalement induite par la liaison de l'agoniste. Ce phénomène s'appelle la désensibilisation. Il en existe deux types : la désensibilisation homologue et la désensibilisation hétérologue, selon qu'elle soit respectivement conséquent ou non d'une activation par l'agoniste.

#### 1.3.1 La désensibilisation homologue

Suite à la stimulation par l'agoniste, les résidus phosphorylés du NPR-A et du NPR-B perdent leurs groupements phosphates en corrélation dans le temps avec l'apparition de la désensibilisation du récepteur (61). Cette désensibilisation des NPR-A/B est bloquée par l'utilisation de la microcystine (un inhibiteur de protéines phosphatases) ou de l'ATP $\gamma$ S (la thiophosphorylation des résidus étant reconnue pour résister à l'action des phosphatases). De plus, lorsque tous les sites de phosphorylation sont mutés en alanine, le récepteur ne répond plus aux peptides natriurétiques. À l'opposé, lorsque ces mêmes sites sont mutés en glutamate pour mimer la forme constitutivement phosphorylée du NPR-A, le récepteur ne se désensibilise plus suite à l'activation par l'agoniste (61). Ces résultats indiquent que la désensibilisation homologue des NPR-A/B est liée à la déphosphorylation du récepteur. Ce phénomène est réversible puisque le NPR-A peut être resensibilisé (96).

À l'état de base, il y a donc un équilibre entre les actions kinase et phosphatase qui favorise l'état phosphorylé du récepteur. La stimulation par l'agoniste briserait ultimement cet équilibre induisant conséquemment la déphosphorylation. Pendant longtemps, plusieurs ont présumé que celle-ci résultait d'une augmentation de l'activité phosphatase. Joubert et al. ont cependant démontré que c'est plutôt l'action kinase qui est inhibée suite à l'activation du NPR-A par l'ANP alors que le peptide n'accroît pas davantage l'activité phosphatase (97). Nous ne savons toutefois pas si la perte d'efficacité kinase découle d'une inhibition de la protéine kinase ou d'un changement conformationnel du récepteur qui empêcherait la kinase, mais pas la phosphatase, d'avoir accès aux sites de phosphorylation. L'identité des protéines kinases et phosphatases régulant les NPR-A/B est aussi inconnue. Un chercheur a malgré tout découvert une protéine qui interagirait avec le KHD du NPR-A et qui comporte une région semblable au domaine catalytique des protéines phosphatases (98). Cette protéine fut ultérieurement désignée «protéine phosphatase 5». Les résultats d'une autre équipe suggèrent qu'il existe deux protéines phosphatases régulant la déphosphorylation du NPR-A : l'une sensible à la microcystine, l'autre dépendante du magnésium (99). Parmi les protéines phosphatases connues, PP1, PP2A, PP2C $\alpha/\beta$ , PP4, PP5 et PP6 pourraient donc être des candidates potentielles. Les protéines kinases A, C et G peuvent quant à elles phosphoryler le NPR-A purifié (100).

### **1.3.2 La désensibilisation hétérologue**

Les peptides natriurétiques ne sont pas les seules hormones qui conduisent à la désensibilisation des NPR-A/B. Au cours de l'insuffisance cardiaque par exemple, le système rénine-angiotensine-aldostérone est suractivé. Or, les hormones vasoconstrictrices telles que l'arginine vasopressine (101, 102), l'angiotensine II (103, 104) et l'endothéline-1 (105, 106) inhibent elles aussi l'activité guanylate cyclase des NPR-A/B. Elles sont reconnues pour induire l'activation de la protéine kinase C (PKC) et l'entrée de calcium dans le cytosol via la stimulation de la phospholipase C (PLC) qui engendre la production d'ester de phorbol et d'inositol trisphosphate (IP3). L'activation de la PKC et l'entrée de calcium dans le cytosol

sont d'ailleurs deux mécanismes inhibant la production de GMPc par les NPR-A/B (107, 101). C'est par ces voies que les hormones vasoconstrictrices communiquent la désensibilisation de ces récepteurs (101, 103, 105, 106).

La désensibilisation dépendante de la PKC est liée à la déphosphorylation des NPR-A/B (108). Le patron de déphosphorylation par la PKC est cependant différent de celui induit par l'ANP. De plus, les effets inhibiteurs de l'ANP et de la PKC sur l'activité guanylate cyclase des NPR-A/B sont additifs alors qu'un inhibiteur de PKC ne bloque pas la désensibilisation induite par l'ANP (109). L'activation de la PKC n'apparaît donc pas être impliquée dans la désensibilisation homologue.

La désensibilisation liée au calcium serait quant à elle causée par l'activation de phosphodiésterases et/ou par la déphosphorylation des NPR-A/B (103, 110). La calmoduline kinase II (CaMKII) pourrait être nécessaire pour promulguer l'inhibition induite par le calcium (106). Des conditions hyperosmotiques et l'acide lysophosphatidique inhibent aussi l'activité guanylate cyclase des NPR-A/B par un mécanisme dépendant du calcium mais pas de la PKC. Ces conditions entraînent la déphosphorylation du NPR-B (110). Aucune relation directe entre l'augmentation de calcium cytosolique et la déphosphorylation de ces récepteurs n'a toutefois été montrée jusqu'à présent. La possible implication du calcium dans la désensibilisation homologue des NPR-A/B n'avait jamais été étudiée non plus.

De récents résultats proposent par ailleurs un système de désensibilisation croisée entre les guanylates cyclases particulières et solubles (111). Le potentiel vasodilatateur de l'ANP et du CNP sur l'aorte de souris est en effet réduit suite à un prétraitement avec un donneur d'oxyde nitrique (NO) activant les GCs, phénomène bloqué par un inhibiteur des GCs. Les auteurs concluent que le GMPc serait responsable de la désensibilisation des NPR-A/B induite par l'activation des GCs. Pourtant, une publication antérieure témoignait du fait que des analogues du GMPc pouvant traverser la membrane cellulaire n'affectaient pas l'activité du NPR-A (108). Ces conclusions contradictoires pourraient s'expliquer par le fait que ces analogues n'imitent pas parfaitement le GMPc ou encore que le système de désensibilisation croisée noté au niveau physiologique soit causé par un facteur en aval de la vraie désensibilisation du récepteur.

**CHAPITRE 2 :**  
**OBJECTIF ET MÉTHODOLOGIE**

Plusieurs questions en rapport avec les processus de désensibilisation des récepteurs des peptides natriurétiques demeurent donc en suspens. Dans un premier temps, nous voulions clarifier la possible responsabilité du GMPc dans l'arrêt de l'activité guanylate cyclase du NPR-A. Pour ce faire, nous avons décidé, comme l'ont fait Madhani et coll. (111), de produire du GMPc en activant les GCs mais de mesurer l'effet sur la production de second messager par le récepteur plutôt que l'effet sur la réponse vasculaire. Les tests ont été réalisés sur des cellules LLC-PK1, lignée cellulaire immortalisée dérivée de cellules épithéliales du tubule rénal de porc (112). Nous avons choisi les cellules LLC-PK1 parce qu'elles expriment de manière endogène le NPR-A et les GCs alors que le NPR-B y est négligeable et le NPR-C absent (113, 114). Les cellules ont d'abord été pré-incubées en présence de SNP, un activateur des GCs. Après plusieurs lavages, les cellules furent ensuite stimulées par l'ANP en présence de l'inhibiteur de phosphodiésterases, le 3-isobutyle-1-méthylxanthine (IBMX). La quantité de GMPc dans le milieu extracellulaire a ensuite été dosée par RIA pour chiffrer sa production dépendante de l'ANP. Il fut ainsi possible d'évaluer l'activité guanylate cyclase du récepteur suite à la stimulation des GCs.

Les cellules LLC-PK1 ont également été utilisées pour étudier le mécanisme de désensibilisation du NPR-A dépendant du calcium. Nous voulions d'abord savoir si le calcium cytosolique était impliqué dans la désensibilisation homologue. Nous avons donc examiné si un chélateur de calcium pouvait bloquer la désensibilisation homologue comme il peut prévenir l'inhibition de l'activité du NPR-A induite par un ionophore de calcium. De plus, les cellules LLC-PK1 expriment le récepteur AT-1 de l'angiotensine II (115) et il a été montré que AngII y stimule l'activité de calcineurine, une phosphatase dépendante du calcium, en passant par la production de IP3 induite par PLC- $\gamma$ 1 (116). Il fut ainsi intéressant de tester l'implication envisageable de la calcineurine dans le processus de désensibilisation dépendant du calcium.

Les procédures expérimentales sont détaillées dans la publication présentée au troisième chapitre de ce mémoire.

**CHAPITRE 3 :**  
**RÉSULTATS**

## **Contribution des auteurs à la publication**

**Yann Fortin :**

Élaboration et exécution des protocoles, analyse des résultats et rédaction du premier jet de l'article.

**André De Léan :**

Directeur de recherche, supervision des travaux, analyses statistiques et correction de l'article.

Publication soumise à *American Journal of Physiology –  
Cell Physiology*

**Role of Cyclic GMP and calcineurin in homologous and heterologous  
desensitization of natriuretic peptide receptor-A**

Yann Fortin and André De Léan

Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal,  
Montréal, Canada

**Running head:** Mechanism of natriuretic peptide receptor desensitization.

## ABSTRACT

The natriuretic peptide receptor-A (NPR-A) is a single-spanned transmembrane receptor that mediates natriuretic, hypotensive and antihypertrophic effects of natriuretic peptides through the production of cGMP. In pathological conditions such as heart failure, these effects are attenuated by homologous and heterologous desensitization mechanisms. Agonist-induced desensitization results from the dephosphorylation of the cytosolic portion of the receptor resulting from the attenuation of receptor kinase activity. Pressor hormones-induced desensitization however is dependent on protein kinase C (PKC) stimulation and/or cytosolic calcium elevation. Mechanisms by which PKC and more particularly  $\text{Ca}^{2+}$  promote NPR-A desensitization are not known. The role of cGMP and of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent desensitization pathway were therefore studied. In contrast with the activation of NPR-A by its agonist, activation of soluble guanylyl cyclases of LLC-PK1 cells by sodium nitroprusside also leads to a production of cGMP but without altering further NPR-A activation. Consequently, cGMP elevation *per se* does not appear to mediate homologous desensitization of NPR-A. In addition, cytosolic calcium increase is not required in the homologous desensitization pathway since the calcium chelator BAPTA-AM, which inhibits ionomycin-induced NPR-A desensitization, does not block natriuretic peptide-induced desensitization. Also, calcineurin inhibitors block the NPR-A guanylyl cyclase desensitization induced by ionomycin, suggesting an essential role for that  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated phosphatase in NPR-A desensitization. In summary, the present report demonstrates that cGMP does not cause NPR-A homologous desensitization while  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolic elevation is not involved. Our results also indicate a role for calcineurin in calcium-dependent NPR-A heterologous desensitization.

**Keywords:** natriuretic peptide receptors, desensitization, signal transduction, cytosolic calcium, cardiac hypertrophy, hypertension.

**Abbreviations:** ANP, atrial natriuretic peptide; BNP, brain natriuretic peptide; CIP, calcineurin inhibitory peptide; CNP, c-type natriuretic peptide; CyA, cyclosporin A; ECD, extracellular domain; GC, guanylyl cyclase; GCAPs, guanylyl cyclase-activating proteins; IP3, inositol trisphosphate; KN-62, 1-[N,O-bis(5-Isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine; NO, nitric oxide; NPR, natriuretic peptide receptor; pGC, particulate guanylyl cyclase; PKG, protein kinase G; sGC, soluble guanylyl cyclase; SNP, sodium nitroprusside.

## INTRODUCTION

Natriuretic peptides (NP) are hormones released into the circulation upon cardiac overload and atrial wall stretch (33, 3). Atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) are mainly produced by cardiac atria and ventricles, respectively. They can act locally on cardiac function to antagonize the hypertrophic growth response occurring in cardiac diseases (22). They also act peripherally on vascular tone, adrenal and kidney functions by inhibiting the renin-angiotensin-aldosterone system. Their function in regulating the lipolytic pathway in human adipose tissue has also been recently recognized (23). C-type natriuretic peptide (CNP) however appears to be devoided of natriuretic effect, but acts as a paracrine factor produced by vascular endothelium (33, 3). CNP also appears to be involved in bone remodelling (14).

These effects of NP are mediated through single-spanned membrane receptors (30). The natriuretic peptide receptors A (NPR-A) selectively binds ANP and BNP, while B-type receptor (NPR-B) preferentially binds CNP. Both receptor subtypes consist of an extracellular ligand-binding domain (ECD) linked by a single transmembrane domain to the intracellular part. The latter is composed of a kinase-homology domain (KHD), which acts as a non catalytic regulatory domain, and a catalytic guanylyl cyclase domain (GC), both connected by a coiled-coil hinge region. The third subtype NPR-C is a disulfide-bridged homodimer which lacks a functional intracellular portion and which can provide clearance function for all three natriuretic peptides through internalization and degradation (34, 20, 25).

NPR-A and NPR-B are found as loose homodimers stabilized by extracellular and intracellular interactions (4, 19, 38). Upon the binding of only one NP (32), the ECD dimer is tightened (15, 5) and that conformational change is presumably transferred to the KHD to enable ATP binding (12). It is currently thought that ATP binding to the KHD results in the dissociation of the NP and complementation of the two GC domains, leading to catalytic activation and production of the second messenger cGMP (16).

Following activation by NP, the KHD, which is constitutively phosphorylated at basal state, is subsequently dephosphorylated (27). Dephosphorylation of the KHD coincides with desensitization of the guanylyl cyclase to activation by NP (27). Phosphorylation of the KHD appears to be required for activation of NPR-A and NPR-B (29). Pathological conditions associated with overproduction of NPs could thus limit their function by desensitization of receptor activity. In heart failure, ANP and BNP are overproduced and their effects seem to be attenuated by homologous and heterologous desensitization as well as by compensatory mechanisms, such as the renin-angiotensin-aldosterone and the sympathetic systems (33).

In the case of homologous desensitization of NPR-A/B by NP, the equilibrium between receptor kinase and phosphatase activities that favours receptor phosphorylation at basal state is altered. We have previously shown that it is the receptor kinase activity that is reduced while the phosphatase activity remains unchanged (13). However the identity of the protein kinase involved is not yet known. Inhibition of receptor kinase function could result either from hindrance of substrate or from inhibition of protein kinase catalytic function.

On the other hand, desensitization of NPR-A/B can also result from heterologous pathways activated by pressor agents such as angiotensin II (35, 8), arginine vasopressin (24) and endothelin (10, 37). Those factors are known to induce protein kinase C activation, increased IP<sub>3</sub> production and cytosolic calcium levels. PKC activation and calcium entry are two mechanisms known to desensitize natriuretic receptors (11, 1). Activation of PKC leads to dephosphorylation of the KHD and does not appear to be involved in homologous desensitization (40, 28). However the mechanism of the calcium pathway inducing NPR-A/B desensitisation remains to be determined. There is still a possibility that calcium triggers the dephosphorylation of NPR-B (31). Furthermore, recent evidence suggest a cross-desensitization system between NPR-A/B and soluble guanylyl cyclases activated by nitric oxide (21). It has been shown that the vasodilatation potency of ANP and CNP in mice aorta is reduced following pre-treatment with NO-donor. This suggests the hypothesis that cGMP might be responsible for desensitisation. However, previous results have shown that cell-permeable analogs of cGMP do not affect NPR-A

hormone-stimulated activity (28). Those conflicting facts might be explained by the inability of cell-permeable analogs to adequately mimic cGMP or by a cross-desensitization mechanism between the two families of guanylyl cyclase caused by a factor downstream to receptor regulation.

To clarify the situation, we have activated soluble guanylyl cyclase (sGC) with the NO-donor sodium nitroprusside (SNP) and checked if the cGMP produced influences NPR-A agonist-dependent activity. We have performed these tests in LLC-PK1 cells, an immortalized cell line of porcine renal tubular epithelial cells (9) that endogenously expresses NPR-A and sGC, but negligible NPR-B and no noticeable NPR-C (7, 36). It appears that SNP induces cGMP production in LLC-PK1 cells without inhibiting NPR-A agonist-dependent cGMP production, indicating therefore that cGMP alone is not sufficient for inducing NPR-A desensitization.

LLC-PK1 cells were also used to study the calcium-dependent desensitisation mechanism of NPR-A. These cells express angiotensin II AT-1 receptor (39) and Angiotensin II as been shown, in LLC-PK1, to stimulate the activity of the calcium-dependent phosphatase calcineurin through PLC- $\gamma$ 1-mediated IP3 production (17). Our results are clearly suggesting an implication for that phosphatase in the calcium-dependent NPR-A heterologous desensitization.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

LLC-PK1 cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, Virginia). Atrial natriuretic peptide, sodium nitroprusside, angiotensin II, phorbol 12-myristate 13-acetate, ionomycin, Bisindolylmaleimide I, BAPTA-AM, KN-62 and cyclosporin A were purchased from Sigma (Oakville, Ontario), while the cell-permeable calcineurin autoinhibitory peptide CIP was obtained from Calbiochem (San Diego, California).

### Whole Cell Stimulation

LLC-PK1 cells were cultured in 24-well plates (30,000 cells/well) in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 5% fetal bovine serum and 100 units of penicillin/streptomycin for 48 hours at 37°C under air/CO<sub>2</sub> (95%:5%). The day of the stimulation, plates were kept on a plate-warmer at 37°C and wells were washed with FBS-free medium. For preincubation steps, medium was replaced with 0.5 ml of DMEM containing various agents and incubated for the indicated time. The doses and the time of incubation for those agents were selected based on the literature. For stimulation, the culture medium was replaced with medium containing the same agents with the addition of 0.1 μM ANP or different concentrations of SNP and 0.5 mM of the phosphodiesterase inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine for 1 hour. When ANP or SNP were used in the pre-stimulation period, wells were washed twice with DMEM before stimulation to get rid of the cGMP produced. Media were collected in borosilicate 12x75 mm tubes after the hour of stimulation. Assays were achieved in quadruplicate.

### **Measurement of extracellular cGMP by radioimmunoassay**

The assay was achieved with a 50 mM sodium acetate pH 6.2 buffer (buffer A). 100  $\mu$ l of cGMP standards prepared in buffer A or 50  $\mu$ l of the samples diluted to 100  $\mu$ l with buffer A were mixed in duplicate borosilicate 12x75 mm tubes with 10  $\mu$ l of triethylamine/acetic anhydride (2:1). Then were added successively 15 000 CPM of  $^{125}$ I-cGMP prepared in 100  $\mu$ l of buffer A containing 1% normal rabbit serum and anti-cGMP 1/50000 in 100  $\mu$ l of buffer A containing 5% goat anti-rabbit gamma-globulin. Tubes were then vortexed and incubated in the dark for 16 hours at 4°C. 0.5 ml of buffer A was added in each tube and then centrifuged at 2000g for 20 min at 4°C. The supernatant was then aspirated and pellet were measured in a gamma counter. Results were analysed by the RiaFit program and expressed as pmol of cGMP per well.

### **Statistical analysis**

Variation of cGMP measurements between replicate experiments appear to be mostly due to a multiplicative factor presumably caused by differences in the number of cells per well for each experiment. To correct for experiment variability, cGMP measurements were first log-transformed. Log-transforms were then corrected by subtracting the averaged log-transforms within each experiment, then adding the grand average of all log-transforms. Finally the antilogs of the corrected log transforms were obtained and used for further testing. Statistics were performed by ANOVA, followed by multiple comparisons obtained by Student Newman Keuls test, using  $P < 0.05$  as the significance level. Values presented in figures correspond to the average and standard error of the mean of the indicated number of replicate experiments.

## RESULTS

### **ANP but not SNP induces NPR-A desensitization in LLC-PK1 cells**

In order to determine the role of cGMP in NPR-A desensitization, we have used the soluble guanylyl cyclase as an alternative source of endogenous cyclic nucleotide. LLC-PK1 cells seem to be a convenient model for this study since they express both NPR-A and sGC. To confirm this, we have stimulated LLC-PK1 cells with ANP and the sGC activator SNP. A concentration of ANP known to produce maximal activation of NPR-A in LLC-PK1 cells (7) leads to a cGMP production of about 2.8 pmol/well, while SNP induces a much higher concentration-dependent cGMP elevation ranging from 14 pmol/well at 1  $\mu$ M SNP to 134 pmol/well at 1000  $\mu$ M SNP (data not shown). These results indicate that both NPR-A and sGC are present in LLC-PK1 cells and can be activated by ANP and SNP, respectively.

Since cGMP production triggered by ANP incubation is modest compared to that of SNP in LLC-PK1 cells, we checked whether this stimulation could lead to NPR-A homologous desensitization. LLC-PK1 cells were therefore pre-incubated with 1 nM or 10 nM ANP, then assayed for cGMP production in the presence of 0.1  $\mu$ M ANP (Figure 1A). Controls without ANP during the second stimulation phase were used to document residual cGMP carried over from the twice-washed pre-incubation period and were subtracted to calculate net ANP stimulation. Preincubation with ANP desensitizes NPR-A in a concentration-dependent manner from 26% loss of net activity at 1 nM ANP to 75% loss at 10 nM ANP relative to maximal agonist stimulation. Thus homologous desensitization of NPR-A by ANP is clearly occurring in LLC-PK1 cells.

The same experiment was then repeated using SNP instead of ANP for inducing cGMP production during the pre-incubation step (Figure 1B). In this case, the net ANP-stimulated cGMP production is not inhibited following pre-incubation with SNP. The dose-dependent increase in cGMP level remaining after pre-incubation with SNP is most probably caused by carryover residual cGMP. These results indicate that, even if both ANP and SNP induce cGMP production in LLC-

PK1, only ANP stimulation can lead to NPR-A desensitization. Thus endogenous cGMP does not appear to be involved *per se* in NPR-A desensitization.

### **NPR-A homologous desensitization does not involve calcium**

Besides cGMP, other pathways inducing NPR-A desensitization have been described in various cell types (35, 8, 24, 10, 37, 11, 1, 40). NPR-A heterologous desensitization mechanisms triggered by pressor hormones, such as angiotensin II, seem to require protein kinase C activation and/or increased cytosolic calcium levels. It is recognized that PKC activation is not part of the homologous desensitization mechanism for NPR-A. However the possible role of cytosolic calcium elevation has not been previously evaluated. In retina for instance, increased cytosolic calcium inhibits membrane guanylyl cyclases (RetGC-1 and RetGC-2) through binding to guanylyl cyclase-activating proteins (GCAP) (26).

We first tested the calcium-dependent desensitizing effect on NPR-A agonist-dependent cGMP production. Before pre-incubation with ionomycin, LLC-PK1 cells were cultured in the presence of BAPTA-AM, a cell-permeable calcium chelator (Figure 2A). BAPTA-AM inhibited ionomycin-induced NPR-A desensitization without affecting basal level of cGMP nor maximal NPR-A agonist-dependent cGMP production. These results indicate that cytosolic calcium elevation induces NPR-A desensitization and that BAPTA-AM is a helpful substance to block calcium-specific pathways.

LLC-PK1 cells were therefore pre-incubated with the calcium chelator BAPTA-AM in addition to ANP to test its effect on ANP-induced NPR-A desensitization (Figure 2B). BAPTA-AM blocks ionomycin-induced NPR-A desensitization but not the ANP-induced desensitization. The same type of results was obtained with bisindolylmaleimide I, a specific PKC inhibitor, which was inhibiting the PMA-induced NPR-A desensitization but not the agonist-induced one (date not shown). Therefore, it seems unlikely that NPR-A homologous desensitization requires protein kinase C activation or cytosolic calcium elevation.

**Protein kinase C is not involved in the ionomycin-dependent NPR-A desensitization while calcium might be required for PMA-dependent NPR-A desensitization**

The results presented so far indicate that protein kinase C activation and cytosolic calcium elevation might be involved only in NPR-A heterologous desensitization pathways. Pre-incubation with PMA or ionomycin, separately or in combination, inhibit NPR-A agonist-dependent cGMP production with apparently the same efficiency (data not shown). This suggests that PMA- and ionomycin-induced desensitization might be related to the same pathway. A PKC inhibitor and a calcium chelator were therefore used during pre-incubation of LLC-PK1 cells, before the second pre-incubation period with PMA and ionomycin, to check if they could block both desensitization pathways (Figure 3). Unlike BisI which inhibits only the PMA-induced NPR-A desensitization, BAPTA-AM seems to block both ionomycin- and PMA-induced desensitization. These results suggest that the PMA-dependent pathway, in addition to a requirement for PKC activation, might also involve cytosolic calcium elevation to promote NPR-A desensitization. On the other hand, PKC activation does not seem to be required for the ionomycin-dependent desensitization pathway since it is only blocked by a calcium chelator and not by a PKC inhibitor. Taken together, these data suggest that PKC activation might promote cytosolic calcium elevation leading to NPR-A desensitization.

**Ionomycin-induced inhibition of NPR-A agonist-dependent cGMP production requires calcineurin but not calmodulin kinase II**

Numerous calcium-activated proteins have been described which might possibly mediate NPR-A desensitization. Some recent reports have concluded that endothelin might inhibit CNP-induced cGMP production via calcium-activated calmodulin kinase II activation (37), while others have demonstrated that angiotensin II stimulates calcium-activated phosphatase calcineurin activity in LLC-PK1 (17). In order to test for these various pathways, LLC-PK1 cells were pre-incubated with the inhibitor for CaMKII (KN-62), or with the calcineurin inhibitor cyclosporin A (CyA), to check if they could block ionomycin-induced NPR-A desensitization (Figure 4).

While KN-62 has no effect on the ionomycin-induced desensitization of NPR-A, CyA can effectively block the desensitization mechanism without affecting maximal agonist-stimulated cGMP production. Since the actions of CyA are not absolutely specific to the inhibition of calcineurin, we also performed the same assay with the newly calcineurin auto-inhibitory peptide (CIP). Like CyA, CIP was inhibiting the ionomycin desensitization effect on NPR-A agonist-induced cGMP production (data not shown). These results indicate that calcineurin, unlike CaMKII, is required for the ionomycin-induced NPR-A desensitization pathway in LLC-PK1 cells.

## DISCUSSION

This report aimed at understanding the signalling pathways involved in homologous and heterologous desensitization of NPR-A. The results presented clarify the role of the cGMP activated-cascade in homologous desensitization by stimulating soluble guanylyl cyclase to produce cGMP independently of ANP. Both ANP and SNP induce cGMP elevation in LLC-PK1 cells but only ANP leads to desensitization of NPR-A. Thus cGMP alone is not sufficient to promote NPR-A desensitization and an agonist-induced conformational change of the receptor is required. A negative feedback mechanism based on a cGMP-activated-cascade that would directly inhibit the receptor protein kinase activity is therefore unlikely. Thus, the loss of receptor protein kinase efficiency associated with NPR-A homologous desensitization might result from other mechanisms. A conformational change of NPR-A could prevent access to the phosphorylation sites for the kinase. Alternatively, a cGMP-activated cascade could selectively alter the activated conformation of NPR-A. The variations in cGMP measurement can not be explained by receptor internalisation/degradation (6) neither by interference on cGMP degradation since a phosphodiesterase inhibitor is present in every stimulation steps.

These results are consistent with those of Potter and Garbers (28) who reported that cell-permeable cGMP analogs do not further inhibit ANP-dependent cGMP production. On the other hand, a recent publication has suggested that the production of cGMP by sGC can desensitize NPR-A and NPR-B (21). That report documented in vascular tissue a cross-desensitization mechanism between particulate and soluble guanylyl cyclases in their potency to generate vasodilatation. However changes in cGMP production were not documented. Therefore, the cross-interaction of SNP and ANP documented in vascular tissue is likely to occur at a step distal to guanylyl cyclase activation. It could be argued that stimulating sGC to mimic the pGC-induced cGMP production is not appropriate since it has been shown that localized pools of cGMP could play distinct regulatory roles in the regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis within ECV304 cells (41). In that system, BNP and not SNP inhibit  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion through a cGMP-dependent pathway. However, this fact might be

possibly explained by segregation of protein kinase G at the plasma membrane and phosphorylation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase pump. Recruitment of PKG to the plasma membrane following ANP treatment has been demonstrated by Airhart *et al.* (2). Furthermore, SNP treatment did not induce PKG membrane translocation in that system. Therefore, according to that report, PKG plasma membrane recruitment, in analogy with NPR-A homologous desensitization, requires a conformational change induced by agonist binding and not simply a cGMP increase.

Besides homologous desensitization, NPR-A guanylyl cyclase activity can be inhibited by heterologous systems triggered by pressor hormones without requirement for receptor activation or cGMP production. The present work confirms in LLC-PK1 cells that PKC activation and cytosolic calcium elevation induce NPR-A desensitization. It is not clear though if these two desensitization mechanisms are independent pathways or if cytosolic calcium elevation is required for the PKC-induced NPR-A guanylyl cyclase inhibition. It seems obvious however that neither PKC activation nor cytosolic calcium elevation is playing a role in the NPR-A homologous desensitization pathway.

The fact that PKC activation desensitizes NPR-A/B and its implication in diverse pressor hormones-induced pGC activity inhibition rather than in homologous desensitization have been well documented in various cell lines (8, 10, 37, 11, 40, 28). While arginine-vasopressin (1) and endothelin (37) are already known to desensitize NPR-B through a cytosolic calcium elevation mechanism, our results document for the first time a calcium-induced inhibition of NPR-A activity. This is also the first report indicating that calcium is not involved in NPR-A homologous desensitization.

Nevertheless, the calcium-dependent NPR-A desensitization pathway should require the implication of a calcium-activated protein. Opposing those of Tokudome *et al.* (37), our findings suggest that the calcium-activated calmodulin kinase II may not be a reliable candidate since a calcium ionophore treatment can still reduce NPR-A agonist-dependent cGMP production in the presence of the CaMKII inhibitor KN62. The divergent results from Tokudome *et al.* could be explained by the use of a different cell line or CaMKII inhibitor. On the other hand, this report is the first to

present data supporting an essential role for the calcium-activated phosphatase calcineurin in NPR-A guanylyl cyclase inhibition. This is suggested by the fact that treatment with calcineurin inhibitors block the NPR-A desensitization engendered by cytosolic calcium elevation.

In summary, the present report demonstrates that cGMP elevation is not sufficient to induce NPR-A homologous desensitization and that an agonist-dependent conformational change of the receptor is required. Evidently, a role for cGMP in this process is not excluded since the NPR-A conformational change might not be sufficient. The dephosphorylation of NPR-A may be caused by a combination of both events: cGMP increase could activate a protein that would bind only to the activated conformation of the NPR-A, thus preventing the receptor protein kinase to access the phosphorylation sites of the KHD. PKG might be a candidate for this inhibitory mechanism since it seems to associate with NPR-A and might be recruited to the plasma membrane only upon ANP treatment. It is most likely that the mechanism of heterologous desensitization differs and might possibly require increased receptor phosphatase activity instead of a reduction in kinase efficiency. Our results are suggesting that activation of the phosphatase calcineurin inhibits NPR-A guanylyl cyclase activity. Since it is known that calcineurin activation leads to cardiac hypertrophy (18), documentation of a direct interaction between calcineurin and NPR-A will be required to further study the role of NPR-A desensitization in the mechanism of cardiac hypertrophy and congestive heart failure.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by grant 13753 from the Canadian Institutes of Health Research. We thank Normand McNicoll and Simon Joubert for helpful discussions and suggestions. ADL is recipient of the Merck Frosst Canada research Chair in Pharmacology. YF is recipient of a FES-Pharmacology studentship.

**REFERENCES**

- 1 **Abbey SE and Potter LR.** Vasopressin-dependent inhibition of the C-type natriuretic peptide receptor, NPR-B/GC-B, requires elevated intracellular calcium concentrations. *J. Biol. Chem.* 277: 42423-42430, 2002.
- 2 **Airhart N, Yang YF, Roberts CT Jr. and Silberbach M.** Atrial natriuretic peptide induces natriuretic peptide receptor-cGMP-dependent protein kinase interaction. *J. Biol. Chem.* 278: 38693-38698, 2003.
- 3 **Baxter GF.** The natriuretic peptides. *Basic Res. Cardiol.* 99, 71-75, 2004.
- 4 **Chinkers M, and Wilson EM.** Ligand-independent oligomerization of natriuretic peptide receptors. Identification of heteromeric receptors and a dominant negative mutant. *J. Biol. Chem.* 267: 18589-18597, 1992.
- 5 **De Léan A, McNicoll N and Labrecque J.** Natriuretic peptide receptor A activation stabilizes a membrane-distal dimer interface. *J. Biol. Chem.* 278: 11159-11166, 2003.
- 6 **Fan D, Bryan PM, Antos LK, Potthast RJ and Potter LR.** Downregulation does not mediate natriuretic peptide-dependent desensitization of NPR-A or NPR-B: Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors do not internalize. *Mol. Pharm.* 67: 174-183, 2005.
- 7 **Féthière J, Meloche S, Nguyen TT, Ong H and De Léan A.** Distinct properties of atrial natriuretic factor receptor subpopulations in epithelial and fibroblast cell lines. *Mol. Pharm.* 35: 584-592, 1989.
- 8 **Haneda M, Kikkawa R, Maeda S, Togawa M, Koya D, Horide N, Kajiwara N and Shigeta Y.** Dual mechanism of angiotensin II inhibits ANP-induced mesangial cGMP accumulation. *Kidney Int.* 40: 188-194, 1991.
- 9 **Hull RN, Cherry WR and Weaver GW.** The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK. *In Vitro* 12: 670-677, 1976.
- 10 **Jaiswal RK.** Endothelin inhibits the atrial natriuretic factor stimulated cGMP production by activating the protein kinase C in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182: 395-402, 1992.
- 11 **Jaiswal RK, Jaiswal N and Sharma RK.** Negative regulation of atrial natriuretic factor receptor coupled membrane guanylate cyclase by phorbol ester.

- Potential protein kinase C regulation of cyclic GMP signal in isolated adrenocortical carcinoma cells of rat. *FEBS Lett.* 227: 47-50, 1988.
- 12 **Jewett J R S, Koller KJ, Goeddel DV and Lowe DG.** Hormonal induction of low affinity receptor guanylyl cyclase. *EMBO J.* 12: 769-777, 1993.
  - 13 **Joubert S, Labrecque J and De Léan A.** Reduced activity of the NPR-A kinase triggers dephosphorylation and homologous desensitization of the receptor. *Biochemistry* 40: 11096-11105, 2001.
  - 14 **Komatsu Y, Chusho H, Tamura N, Yasoda A, Miyazawa T, Suda M, Miura M, Ogawa Y and Nakao K.** Significance of C-type natriuretic peptide (CNP) in endochondral ossification: analysis of CNP knockout mice. *J Bone Miner Metab.* 20: 331-6, 2002.
  - 15 **Labrecque J, Deschênes J, McNicoll N and De Léan A.** Agonistic induction of a covalent dimer in a mutant of natriuretic peptide receptor-A documents a juxtamembrane interaction that accompanies receptor activation. *J. Biol. Chem.* 276: 8064-8072, 2001.
  - 16 **Larose L, McNicoll N, Ong H and De Léan A.** Allosteric modulation by ATP of the bovine adrenal natriuretic factor R1 receptor functions. *Biochemistry* 30: 8990-8995, 1991.
  - 17 **Lea JP, Jin SG, Roberts BR, Shuler MS, Marrero MB and Tumlin JA.** Angiotensin II stimulates calcineurin activity in proximal tubule epithelia through AT-1 receptor-mediated tyrosine phosphorylation of the PLC-gamma1 isoform. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13: 1750-1756, 2002.
  - 18 **Leinwand LA.** Calcineurin inhibition and cardiac hypertrophy: a matter of balance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 2947-2949, 2001.
  - 19 **Lowe DG.** Human natriuretic peptide receptor-A guanylyl cyclase is self-associated prior to hormone binding. *Biochemistry* 31: 10421-10425, 1992.
  - 20 **Maack T, Suzuki M, Almeida FA, Nussenzveig D, Scarborough RM, McEnroe GA and Lewicki JA.** Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* 238: 675-678, 1987.

- 21 **Madhani M, Scotland RS, MacAllister RJ and Hobbs AJ.** Vascular natriuretic peptide receptor-linked particulate guanylate cyclases are modulated by nitric oxide-cyclic GMP signalling. *Br. J. Pharm.* 139: 1289-1296, 2003.
- 22 **Molkentin JD.** A friend within the heart: natriuretic peptide receptor signaling. *J. Clin. Invest.* 111: 1275-1277, 2003.
- 23 **Moro C, Crampes F, Sengenès C, De Glisezinski I, Galitzky J, Thalamas C, Lafontan M and Berlan M.** Atrial natriuretic peptide contributes to physiological control of lipid mobilization in humans. *FASEB J.* 18: 908-910, 2004.
- 24 **Nambi P, Whitman M, Gessner G, Nambi A and Crooke ST.** Vasopressin-mediated inhibition of atrial natriuretic factor-stimulated cGMP accumulation in an established smooth muscle cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 8492-8495, 1986.
- 25 **Nussenzveig DR, Lewicki JA and Maack T.** Cellular mechanisms of the clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor. *J. Biol. Chem.* 265: 20952-20958, 1990.
- 26 **Olshevskaya EV, Ennilov AN and Dizhoor AM.** Factors that affect regulation of cGMP synthesis in vertebrate photoreceptors and their genetic link to human retinal degeneration. *Mol. Cell. Biochem.* 230: 139-147, 2002.
- 27 **Potter LR and Garbers DL.** Dephosphorylation of the guanylyl cyclase-A receptor causes desensitization. *J. Biol. Chem.* 267: 14531-14534, 1992.
- 28 **Potter LR and Garbers DL.** Protein kinase C-dependent desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor is mediated by dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* 269: 14636-14642, 1994.
- 29 **Potter LR and Hunter T.** Phosphorylation of the kinase homology domain is essential for activation of the A-type natriuretic peptide receptor. *Mol. Cell. Biol.* 18: 2164-2172, 1998.
- 30 **Potter LR and Hunter T.** Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation. *J. Biol. Chem.* 276: 6057-6060, 2001.
- 31 **Potthast R, Abbey-Hosch SE, Antos LK, Marchant JS, Kuhn M and Potter LR.** Calcium-dependent dephosphorylation mediates the hyperosmotic and

- lysophosphatidic acid-dependent inhibition of natriuretic peptide receptor-B/guanylyl cyclase-B. *J. Biol. Chem.* 279: 48513-48519, 2004.
- 32 **Rondeau JJ, McNicoll N, Gagnon J, Bouchard N, Ong H and De Léan A.** Stoichiometry of the atrial natriuretic factor-R1 receptor complex in the bovine zona glomerulosa. *Biochemistry* 34: 2130-2136, 1995.
- 33 **Rubattu S and Volpe M.** The atrial natriuretic peptide: a changing view. *J. Hypertens.* 19: 1923-1931, 2001.
- 34 **Schenk DB, Phelps MN, Porter JG, Fuller F, Cordell B and Lewicki JA.** Purification and subunit composition of atrial natriuretic peptide receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 1521-1525, 1987.
- 35 **Smith JB and Lincoln TM.** Angiotensin decreases cyclic GMP accumulation produced by atrial natriuretic factor. *Am. J. Physiol.* 253: C147-C150, 1987.
- 36 **Suga S, Nakao K, Mukoyama M, Arai H, Hosada K, Ogawa Y and Imura H.** Characterization of natriuretic peptide receptors in cultured cells. *Hypertension* 19: 762-765, 1992.
- 37 **Tokudome T, Horio T, Soeki T, Mori K, Kishimoto I, Suga SI, Yoshihara F, Kawano Y, Kohno M and Kangawa K.** Inhibitory effect of C-type natriuretic peptide (CNP) on cultured cardiac myocyte hypertrophy: interference between CNP and endothelin-1 signaling pathways. *Endocrinology* 145: 2131-2140, 2004.
- 38 **Van den Akker F, Zhang X, Miyagi M, Huo X, Misono KS and Yee VC.** Structure of the dimerized hormone-binding domain of a guanylyl-cyclase-coupled receptor. *Nature* 406: 101-104, 2000.
- 39 **Wolf G, Zahner G, Mondorf U, Schoeppe W and Stahl RA.** Angiotensin II stimulates cellular hypertrophy of LLC-PK1 cells through the AT1 receptor. *Nephrol Dial Transplant.* 8: 128-133, 1993.
- 40 **Yasunari K, Kohno M, Murakawa K, Yokokawa K, Horio T and Takeda T.** Phorbol ester and atrial natriuretic peptide receptor response on vascular smooth muscle. *Hypertension* 19: 314-319, 1992.
- 41 **Zolle O, Lawrie AM and Simpson AWM.** Activation of particulate and not soluble guanylate cyclase leads to inhibition of  $Ca^{2+}$  extrusion through localized elevation of cGMP. *J. Biol. Chem.* 275: 25892-25899, 2000.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1: Effects of ANP and SNP on NPR-A agonist-dependent activation.**

Pre-incubation with ANP (A), but not SNP (B), induces desensitization of NPR-A in LLC-PK1 cells. Cells were cultured as described in *Experimental* and were incubated for 1h with DMEM, 1 or 10 nM ANP (A) or 1 or 100  $\mu$ M SNP (B). Cells were then washed twice with DMEM and incubated for 1h in the absence or presence of 0.1  $\mu$ M ANP. Culture media were recovered and cGMP was measured by RIA. Assays were performed in quadruplicates and cGMP from each well was quantified in duplicate. Results are presented as the average and standard error of the mean of three experiments. \* indicates  $p < 0.05$  versus basal cGMP level. † indicates  $p < 0.05$  versus ANP-stimulation.

### **Figure 2: Cytosolic calcium elevation is not involved in the homologous desensitization mechanism of NPR-A.**

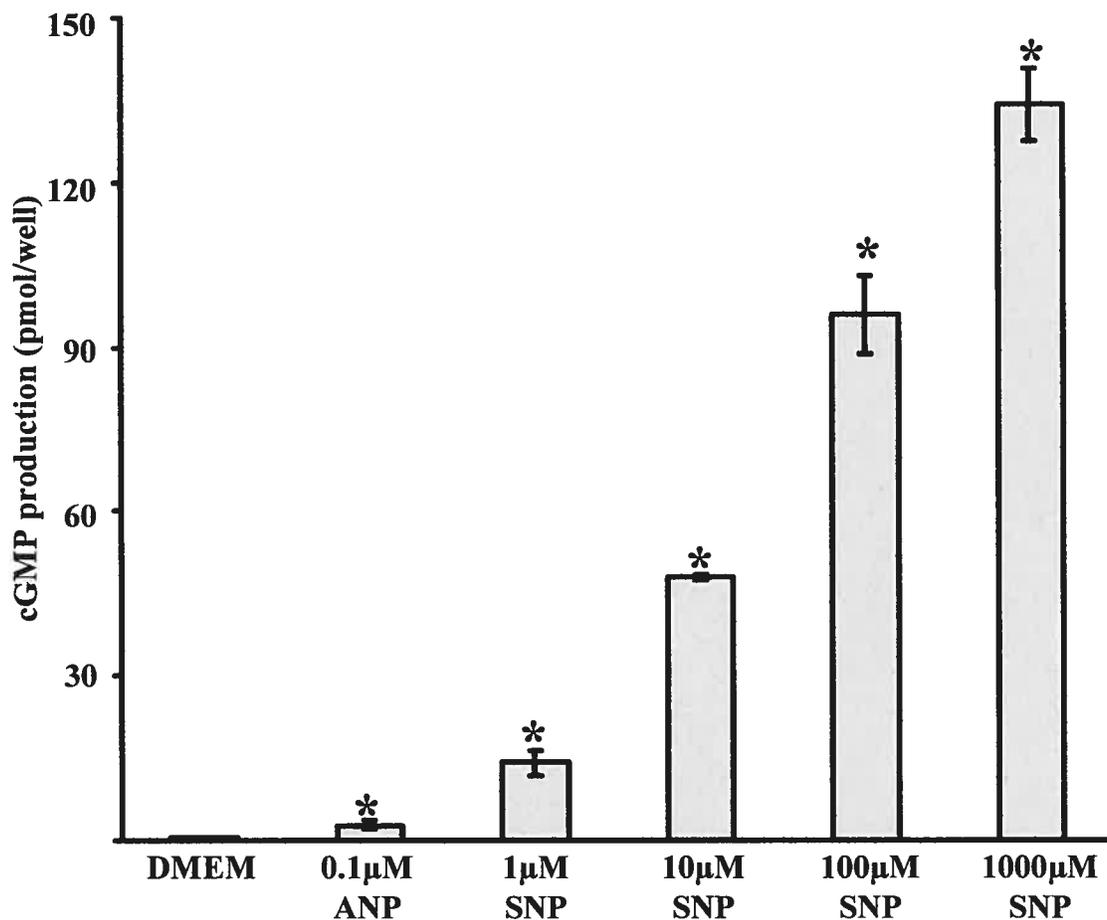
A calcium chelator blocks ionomycin-induced NPR-A desensitization but not the ANP-induced desensitization (B) without affecting basal level of cGMP nor maximal NPR-A agonist-dependent cGMP production (A). Cells were cultured as described in *Experimental* and were pre-incubated for 30 min. in the absence or presence of 2  $\mu$ M BAPTA-AM. Culture media were replaced with the same media containing the same agents with the addition, when indicated, of 1  $\mu$ M ionomycin or 0.1  $\mu$ M ANP (ANP(p)). After 30 min., culture media were once again replaced with the same media containing the same agents with the addition, when indicated, of 0.1  $\mu$ M ANP and incubated for 1h (ANP(s)). Culture media were recovered and cGMP was measured by RIA. Assays were performed in quadruplicates and cGMP from each well was quantified in duplicate. Results are presented as the average and standard error of the mean of four (A) or three (B) experiments. \* indicates  $p < 0.05$  versus basal cGMP level. † indicates  $p < 0.05$  versus ANP-stimulation. ‡ indicates  $p < 0.05$  versus ionomycin- or ANP-desensitized level.

### **Figure 3: PKC activation is not part of ionomycin-induced NPR-A desensitization while cytosolic calcium elevation is part of the PMA-induced mechanism.**

(A) The PKC inhibitor blocks the PMA-induced NPR-A desensitization but not the ionomycin-induced desensitization, while (B) the calcium chelator blocks both ionomycin- and PMA-induced NPR-A desensitization. Cells were cultured as described in *Experimental* and were pre-incubated for 30 min. in the absence or presence of 1  $\mu$ M BisI (A) or 2  $\mu$ M Bapta-AM (B). Culture media were replaced with the same media containing the same agents with the addition, when indicated, of 1  $\mu$ M PMA or 1  $\mu$ M ionomycin. After 30 min., culture media were once again replaced with the same media containing the same agents with the addition, when indicated, of 0.1  $\mu$ M ANP and incubated for 1h. Culture media were recovered and cGMP was measured by RIA. Assays were performed in quadruplicates and cGMP from each well was quantified in duplicate. Results are presented as the average and standard error of the mean of four (A) or two (B) experiments. \* indicates  $p < 0.05$  versus basal cGMP level. † indicates  $p < 0.05$  versus ANP-stimulation. ‡ indicates  $p < 0.05$  versus PMA- or ionomycin-desensitized level.

**Figure 4: The ionomycin-induced NPR-A desensitization involves calcineurin but not calmodulin kinase II.**

A calmodulin kinase II inhibitor (A) does not block but a calcineurin inhibitor (B) does block the ionomycin-induced NPR-A desensitization. Cells were cultured as described in *Experimental* and were pre-incubated for 30 min. in the absence or presence of 5  $\mu$ M KN-62 (A) or 1  $\mu$ M CyA (B). Culture media were replaced with the same media containing the same agents with the addition, when indicated, of 1  $\mu$ M ionomycin. After 30 min., culture media were once again replaced with the same media containing the same agents with the addition, when indicated, of 0.1  $\mu$ M ANP and incubated for 1h. Culture media were recovered and cGMP was measured by RIA. Assays were performed in quadruplicates and cGMP from each well was quantified in duplicate. Results are presented as the average and standard error of the mean of three (A) or four (B) experiments. \* indicates  $p < 0.05$  versus basal cGMP level. † indicates  $p < 0.05$  versus ANP-stimulation. ‡ indicates  $p < 0.05$  versus ionomycin-desensitized level.



**Data not shown: Activation of particulate and soluble guanylyl cyclases in LLC-PK1.** Production of cGMP by LLC-PK1 cells in response to ANP and SNP. Cells were cultured as described in *Experimental* and were incubated for 1h with DMEM, 0.1 μM ANP or different concentrations of SNP (1, 10, 100 or 1000 μM). Culture media were recovered and cGMP was measured by RIA. Assays were performed in quadruplicates and cGMP from each well was quantified in duplicate. Results are presented as the average and standard error of the mean of three experiments. \* indicates  $p < 0.05$  versus basal cGMP level.

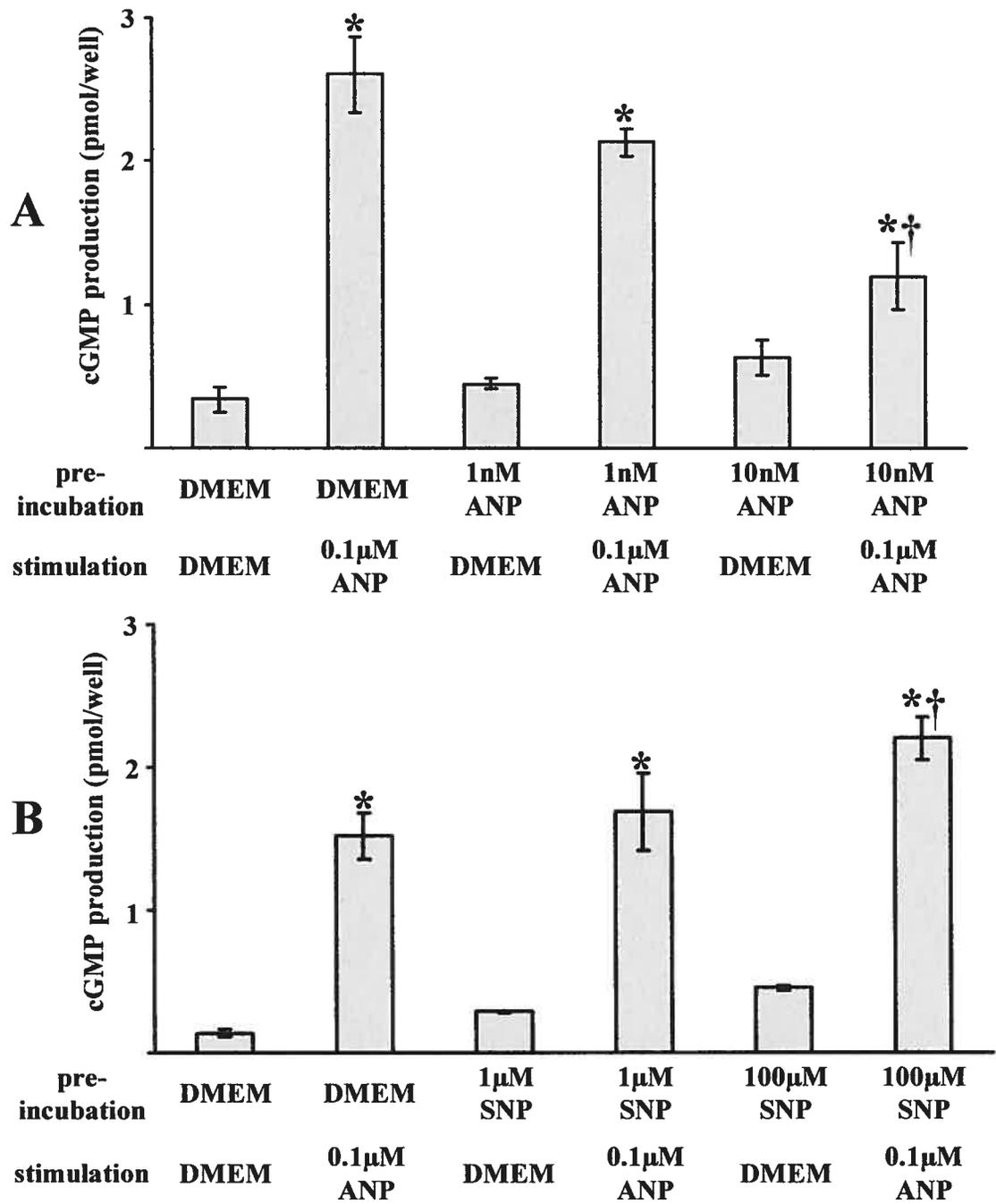


Figure 1

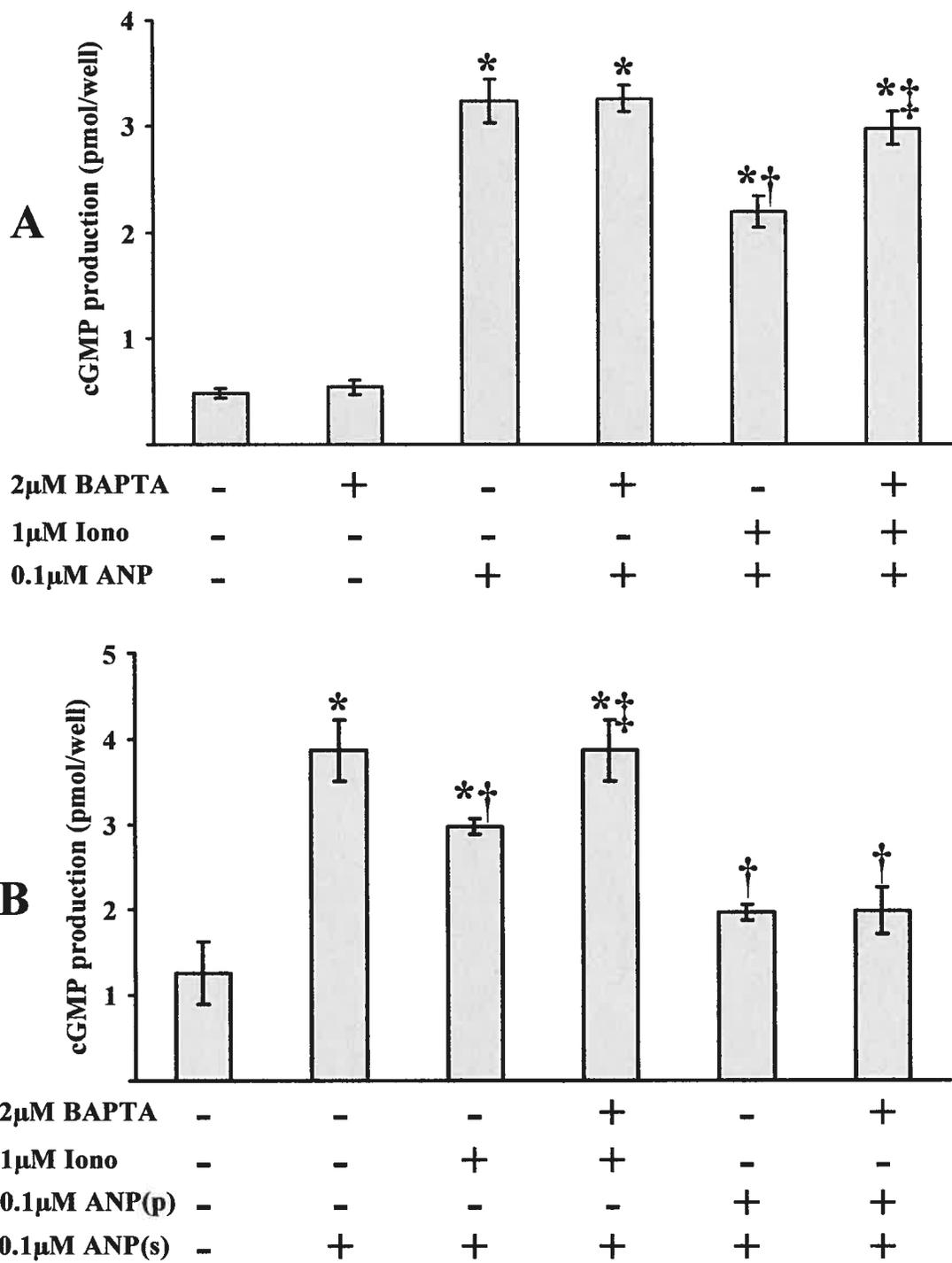
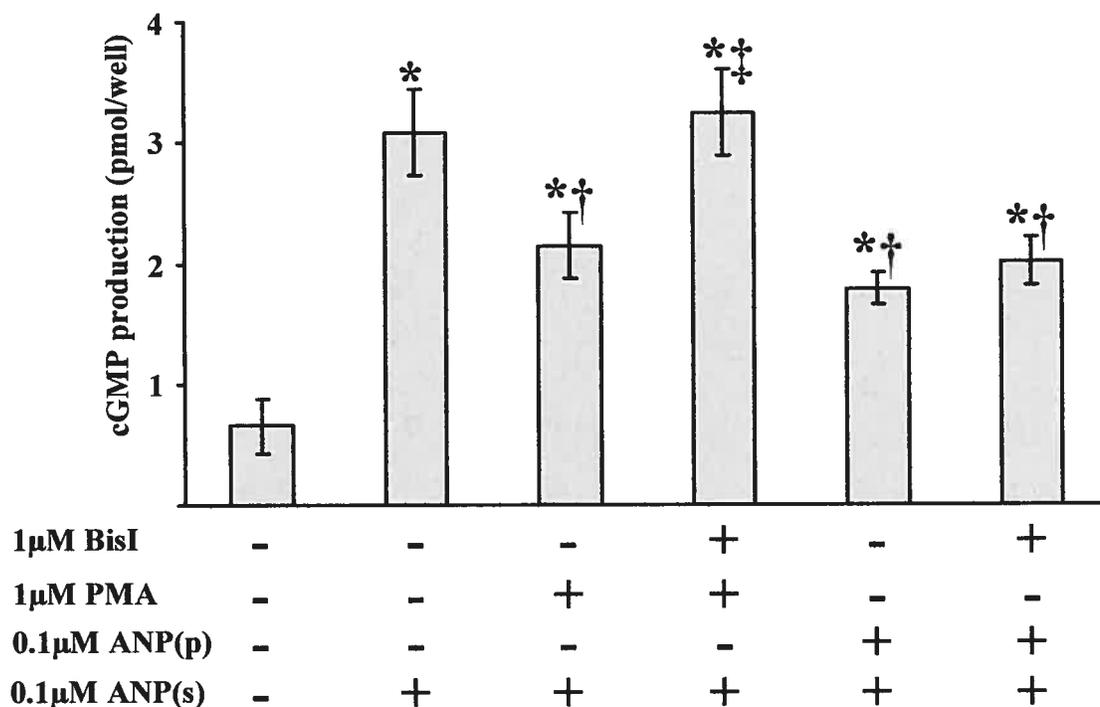
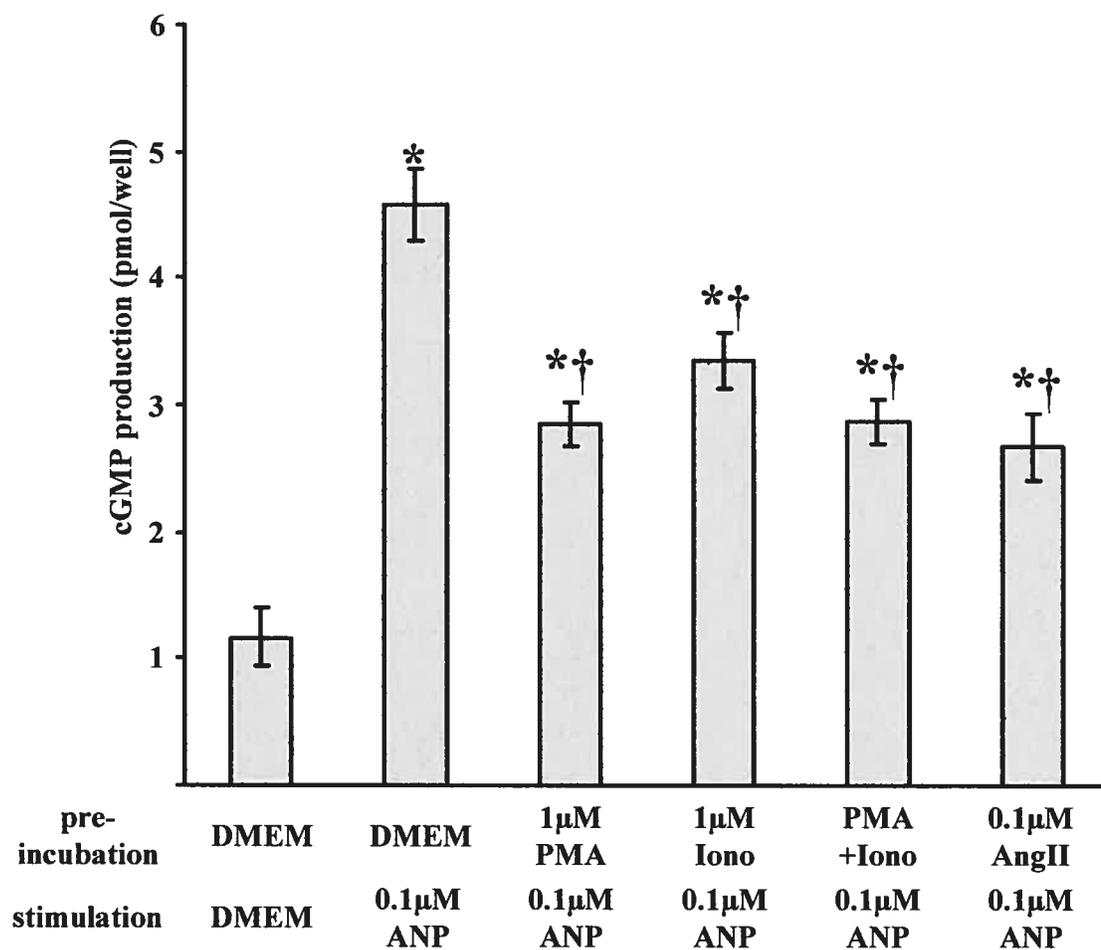


Figure 2



**Data not shown: PKC activation is not involved in the homologous desensitization mechanism of NPR-A.** A PKC inhibitor blocks PMA-induced NPR-A desensitization but not the ANP-induced desensitization. Cells were cultured as described in *Experimental* and were pre-incubated for 30 min. in the absence or presence of 1 µM Bisindolylmaleimide I (BisI). Culture media were replaced with the same media containing the same agents with the addition, when indicated, of 1 µM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) or 0.1 µM ANP (ANP(p)). After 30 min., culture media were once again replaced with the same media containing the same agents with the addition, when indicated, of 0.1 µM ANP and incubated for 1h (ANP(s)). Culture media were recovered and cGMP was measured by RIA. Assays were performed in quadruplicates and cGMP from each well was quantified in duplicate. Results are presented as the average and standard error of the mean of four experiments. \* indicates  $p < 0.05$  versus basal cGMP level. † indicates  $p < 0.05$  versus ANP-stimulation. ‡ indicates  $p < 0.05$  versus PMA- or ANP-desensitized level.



**Data not shown: Heterologous desensitization pathways of NPR-A in LLC-PK1.** Effects of PMA, ionomycin, and angiotensin II on NPR-A agonist-dependent cGMP production. Cells were cultured as described in *Experimental* and were pre-incubated 30 min with DMEM, 1 µM PMA, 1 µM ionomycin, 1 µM PMA and 1 µM ionomycin, or 0.1 µM AngII. Culture media were replaced with the same media containing the same agents with the addition, when indicated, of 0.1 µM ANP and incubated for 1h. Culture media were recovered and cGMP was measured by RIA. Assays were performed in quadruplicates and cGMP from each well was quantified in duplicate. Results are presented as the average and standard error of the mean of four experiments. \* indicates  $p < 0.05$  versus basal cGMP level. † indicates  $p < 0.05$  versus ANP-stimulation.

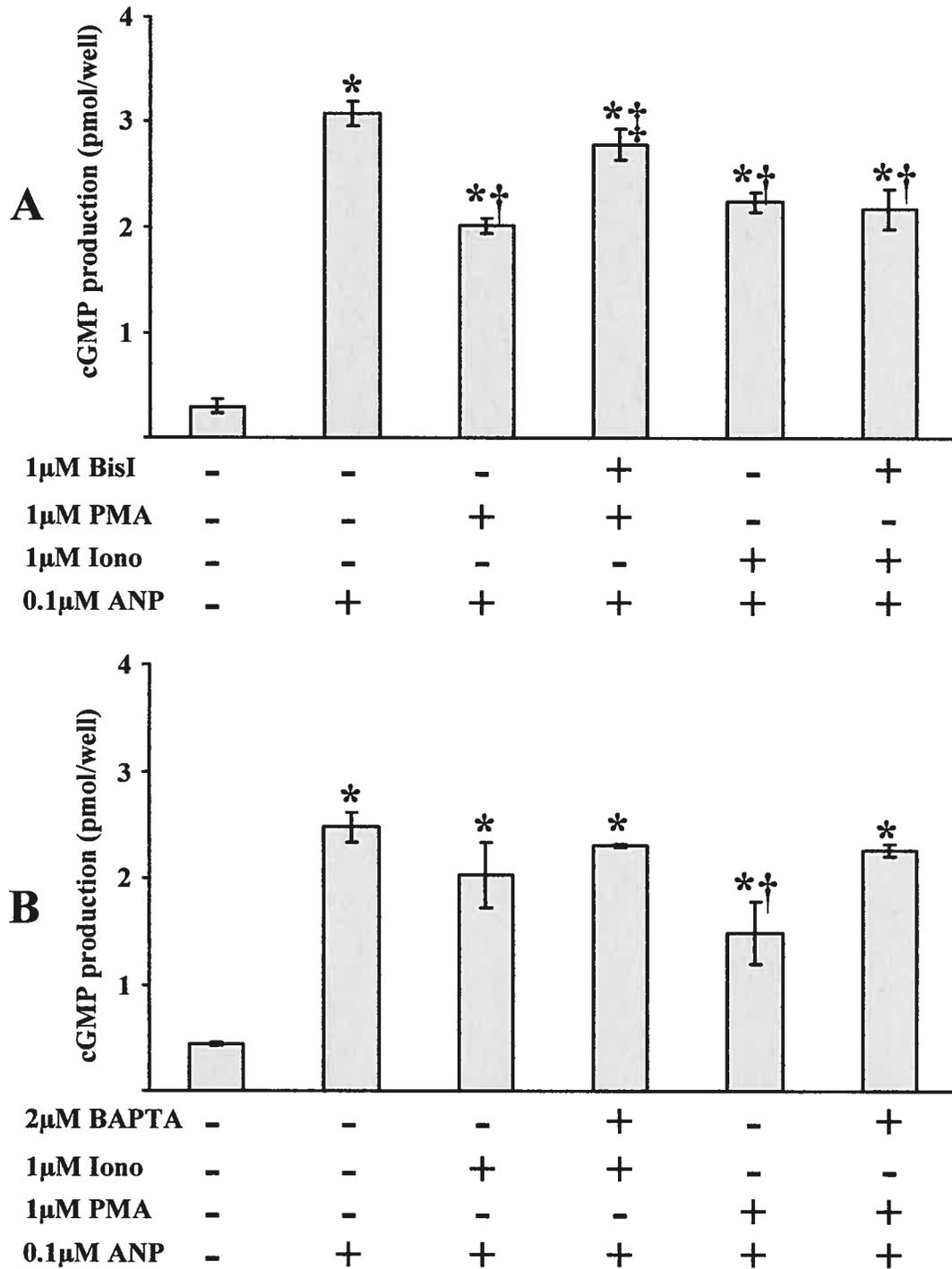


Figure 3

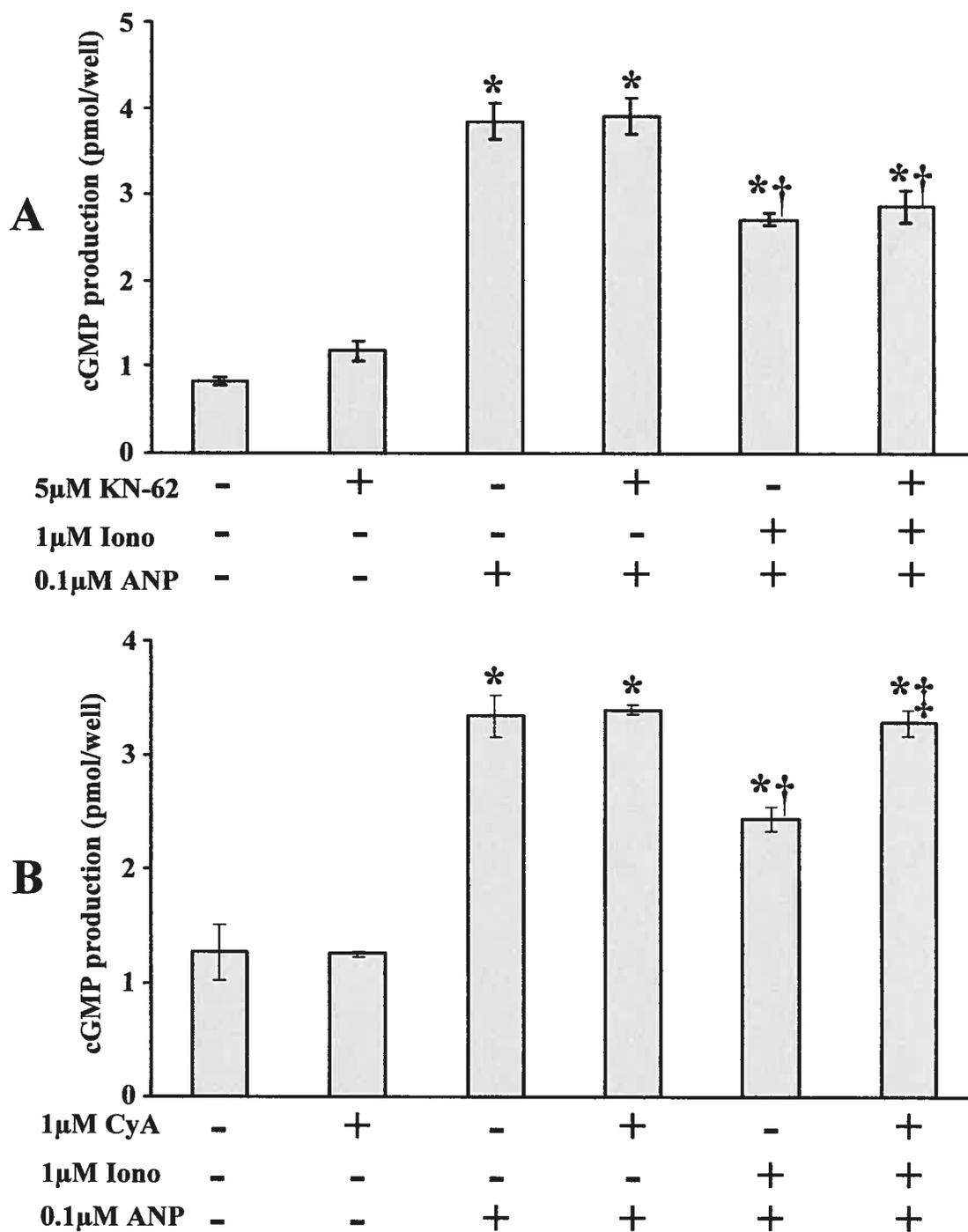
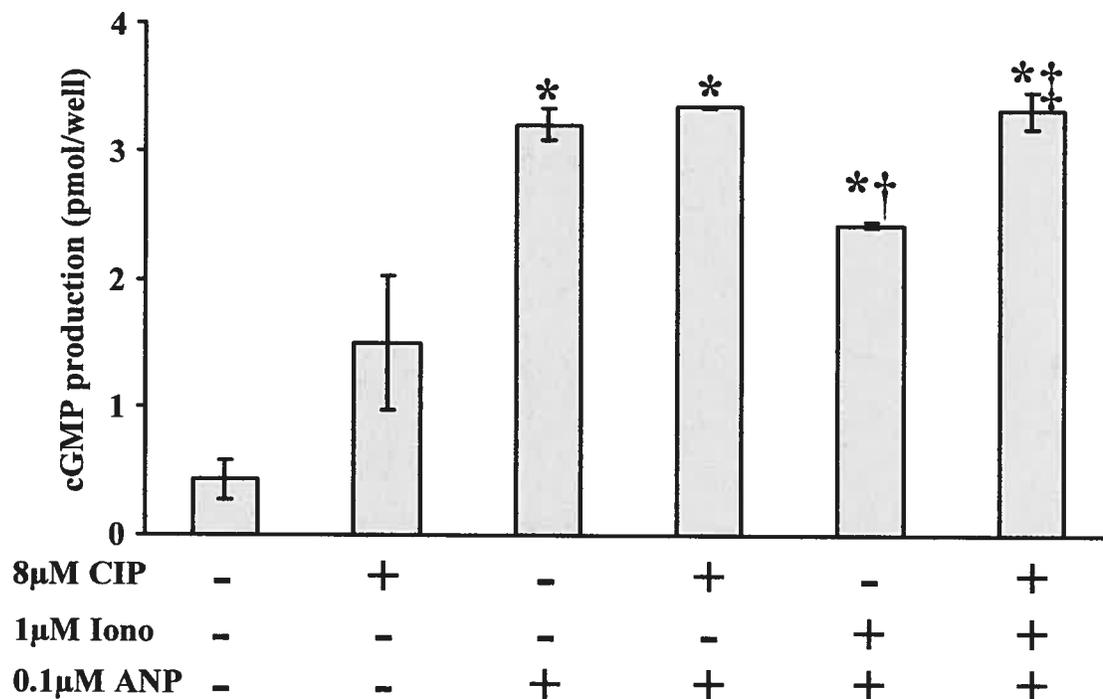


Figure 4



**Data not shown: The ionomycin-induced NPR-A desensitization involves calcineurin.** A calcineurin inhibitor blocks the ionomycin-induced NPR-A desensitization. Cells were cultured as described in *Experimental* and were pre-incubated for 30 min. in the absence or presence 8 µM Calcineurin autoinhibitory peptide (CIP). Culture media were replaced with the same media containing the same agents with the addition, when indicated, of 1 µM ionomycin. After 30 min., culture media were once again replaced with the same media containing the same agents with the addition, when indicated, of 0.1 µM ANP and incubated for 1h. Culture media were recovered and cGMP was measured by RIA. Assays were performed in quadruplicates and cGMP from each well was quantified in duplicate. Results are presented as the average and standard error of the mean of three experiments. \* indicates  $p < 0.05$  versus basal cGMP level. † indicates  $p < 0.05$  versus ANP-stimulation. ‡ indicates  $p < 0.05$  versus ionomycin-desensitized level.

**CHAPITRE 4 :**  
**DISCUSSION ET CONCLUSION**

Une partie de la discussion est incluse dans la publication présentée au troisième chapitre de ce mémoire.

Ces travaux visaient à mieux comprendre les voies de signalisation impliquées dans les processus de désensibilisation homologue et hétérologue du NPR-A. Les résultats qui en ont découlé clarifient d'abord le rôle de la cascade métabolique du GMPc au sein de la désensibilisation homologue. Nous avons été en mesure d'évaluer un possible mécanisme de rétro-inhibition engendré par le GMPc en stimulant les GCs pour produire ce second messager indépendamment de l'activation du NPR-A. Autant l'ANP que le SNP induisent une élévation du GMPc dans les cellules LLC-PK1 mais seulement l'ANP mène à la désensibilisation du NPR-A. Par conséquent, le GMPc seul n'est pas suffisant pour promouvoir la désensibilisation du NPR-A. Un changement conformationnel du récepteur induit par l'agoniste est donc requis. L'inhibition directe de la protéine kinase du NPR-A à l'intérieur de la cascade métabolique du GMPc semble ainsi improbable. La perte d'efficacité kinase associée à la désensibilisation homologue du récepteur doit alors découler d'un autre mécanisme. 1) Un changement conformationnel du récepteur pourrait empêcher la kinase d'avoir accès aux sites de phosphorylation. 2) L'élévation de GMPc intracellulaire pourrait mener à l'activation d'une protéine qui irait interagir uniquement avec la conformation activée du récepteur, interaction qui bloquerait l'accès aux sites de phosphorylation pour la kinase.

Ces résultats concordent avec ceux de Potter et Garbers (108) qui rapportaient que des analogues du GMPc pouvant traverser la membrane cellulaire n'inhibaient pas la production de GMPc induite par l'ANP. Ils en avaient conclu que la désensibilisation homologue ne semble pas dériver d'un simple mécanisme de rétro-inhibition où une hausse des concentrations de GMPc serait l'unique responsable de la diminution de l'activité du NPR-A et que la liaison de l'ANP paraît requise. À l'opposé, une autre publication suggérait que la production de GMPc par les GCs pouvait désensibiliser le NPR-A et le NPR-B (111). Les auteurs ont documenté un système de désensibilisation croisée entre les guanylates cyclases particulières et

solubles en ce qui a trait à leur potentiel vasodilatateur. Ils n'ont cependant pas évalué si la production de GMPc était modifiée. L'interaction croisée entre SNP versus ANP et CNP documentée en tissu vasculaire se produit donc vraisemblablement à une étape en aval de l'activation de la guanylate cyclase. En présence d'une concentration élevée de NO, les NPR-A/B peuvent probablement produire du GMPc en réponse à leurs agonistes, mais cette élévation de GMPc n'induit peut-être pas davantage la vasodilatation. À l'opposé, lorsque les GCs sont inhibées, le GMPc produit par les récepteurs natriurétiques est possiblement plus efficace pour occasionner la vasodilatation étant donné qu'il n'y a pas de vasodilatation basale dépendante du NO.

Stimuler les GCs pour imiter la production de GMPc liée à l'activation des GCp peut sembler discutable puisqu'il a été montré que le GMPc peut avoir des effets localisés selon le lieu de sa synthèse dans les cellules ECV304 (117). Dans ce système, le BNP, mais pas le SNP, inhibe l'extrusion de  $Ca^{2+}$  par une voie dépendante du GMPc. Cette constatation peut toutefois être expliquée par la ségrégation de PKG à la membrane plasmique où cette kinase phosphorylerait la pompe  $Ca^{2+}$ -ATPase. Le recrutement de PKG à la membrane cellulaire suite à un traitement avec ANP a été démontré par Airhart et al (118). Une stimulation par SNP ne reproduit toutefois pas cette translocation de PKG malgré la production subséquente de GMPc. Ainsi, d'après ces auteurs, le recrutement de PKG à la membrane plasmique, en analogie avec la désensibilisation homologue du NPR-A, requiert un changement conformationnel induit par la liaison de l'agoniste et non pas simplement une augmentation du GMPc cytosolique.

En plus de la désensibilisation homologue, l'activité guanylate cyclase des NPR-A/B peut être inhibée par des systèmes hétérologues déclenchés par les hormones vasoconstrictrices et qui n'impliquent ni l'activation du récepteur ni la production de GMPc. Le présent ouvrage confirme, dans les LLC-PK1, que AngII mène à la réduction de la production de GMPc par le NPR-A alors que l'activation de PKC et l'élévation du calcium cytosolique, deux voies faisant partie intégrante de la

signalisation cellulaire de AngII, induisent aussi la désensibilisation du NPR-A. Il n'est cependant pas clair si ces deux mécanismes de désensibilisation sont des voies indépendantes ou si l'élévation du calcium cytosolique est requise pour l'inhibition de la guanylate cyclase du NPR-A induite par PKC. Il apparaît par contre évident que ni l'activation de la PKC, ni l'élévation du calcium cytosolique ne sont impliquées dans le processus de désensibilisation homologue du NPR-A.

Le fait que l'activation de la PKC désensibilise les NPR-A/B est bien connu de même que l'est son implication dans les voies d'inhibition hétérologues de l'activité des GCp plutôt qu'au sein de la désensibilisation consécutive de l'agoniste (103, 105, 106, 107, 108, 109). Alors que l'arginine vasopressine (101) et l'endothéline-1 (106) sont reconnues pour désensibiliser le NPR-B par un mécanisme impliquant l'élévation du calcium cytosolique, nos résultats documentent pour la première fois une inhibition de l'activité du NPR-A induite par le calcium. Ce sont aussi les premiers travaux indiquant que le calcium ne joue aucun rôle dans la désensibilisation homologue du NPR-A.

Néanmoins, le processus de désensibilisation du NPR-A dépendant du calcium nécessite la complicité d'une protéine activée par le calcium. En opposition à Tokudome et al. (106), nos études suggèrent que la calmoduline kinase II (CaMKII) ne serait pas un candidat éventuel puisque un ionophore de calcium persiste à réduire la production de GMPc dépendante de l'agoniste du NPR-A même en présence d'un inhibiteur de CaMKII, le KN-62. La divergence dans les résultats pourrait s'expliquer par l'utilisation d'un type cellulaire ou d'un inhibiteur différent. Par ailleurs, cet ouvrage est le premier à présenter des données proposant un rôle essentiel pour calcineurine, une phosphatase activée par le calcium, dans l'inhibition de la guanylate cyclase du NPR-A. Traiter les cellules avec un dérivé du peptide auto-inhibiteur de la calcineurine (CIP) pouvant traverser la membrane cellulaire bloque en effet la désensibilisation du NPR-A engendrée par une élévation du calcium cytosolique tout comme le fait la cyclosporine A, une molécule depuis longtemps reconnue pour inhiber la calcineurine mais de façon moins spécifique. Il semble

toutefois que la calcineurine ne soit pas une phosphatase déphosphorylant constitutivement le NPR-A (96). De façon surprenante, le CIP tend à accroître le niveau de base de GMPc dans les cellules LLC-PK1. Étant donné qu'il n'amplifie pas la hausse maximale de GMPc induite par l'ANP, il est possible que ce peptide altère une inhibition tonique du NPR-A plutôt que de promouvoir la synthèse de GMPc par un autre système. De toutes nouvelles données indiquent que la cyclophiline A interagit de manière endogène avec le domaine catalytique du NPR-A et fonctionne comme un inhibiteur de l'activité du NPR-A stimulée par l'ANP en favorisant l'isomérisation *cis-trans*-peptidyle-propyle (119). Puisque la cyclophiline A est connue pour former un complexe avec la calcineurine, il est pensable que CIP puisse restreindre l'effet d'inhibition endogène de la cyclophiline A sur le NPR-A.

Pour étudier la réponse du récepteur dépendante de l'agoniste, l'activité du NPR-A n'a pas été mesurée directement mais bien évaluée en se basant sur le dosage du GMPc présent dans le milieu extracellulaire. Or, malgré les contrôles, les variations de GMPc extracellulaire induites par les divers réactifs employés ne résultent peut-être pas nécessairement d'une modification de l'activité guanylate cyclase du NPR-A. Les réactifs pourraient hypothétiquement agir sur d'autres agents de cette voie de signalisation influençant le niveau de GMPc extracellulaire. Puisque le NPR-A ne s'internalise pas, il serait cependant surprenant que ces produits fassent diminuer la concentration membranaire des GCp en dedans de deux heures. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de phosphodiésterases permet de réfuter l'hypothèse d'une régulation différente de la dégradation du GMPc. Ne reste donc que l'extrusion du GMPc qui pourrait varier en présence de certains réactifs. Nous aurions pu recourir à un test permettant de mesurer l'activité guanylate cyclase dépendante de l'ANP sur des préparations de membranes (100). Cette technique est cependant plus complexe, plus longue et moins précise. L'idéal aurait été de pouvoir doser le GMPc intracellulaire en réponse à une stimulation par l'ANP (101). Malheureusement, les cellules LLC-PK1 n'expriment pas suffisamment le NPR-A. La production de GMPc induite par l'ANP était imperceptible lorsque nous tentions d'en mesurer la concentration intracellulaire (résultats non présentés). Évaluer

l'activité guanylate cyclase du NPR-A en dosant le GMPc extracellulaire demeure tout de même une technique éprouvée (67, 73, 100, 120). Les légères fluctuations d'une expérience à l'autre en ce qui concerne le niveau basal de GMPc ou la stimulation maximale par l'agoniste peuvent s'expliquer par une variabilité au sein du nombre de cellules présentes dans les puits le jour de l'essai. Il est aussi possible que le niveau de NPR-A exprimé par les cellules LLC-PK1 change dans le temps en fonction du nombre de passage.

Avoir recours au CIP pour inhiber la calcineurine peut soulever quelques questionnements. C'est effectivement la cyclosporine A qui est habituellement utilisée pour ce type d'essai. Cet immunosuppresseur n'est toutefois pas spécifique car il agit sur plusieurs voies de signalisation indépendamment de la calcineurine (121). Or la calcineurine comporte en elle-même un domaine auto-inhibiteur (122). Un dérivé de ce peptide pouvant pénétrer la cellule devient alors un efficace inhibiteur spécifique de l'activité phosphatase de la calcineurine (123). Bien entendu, la technique de l'ARN silencieux aurait été le meilleur moyen pour montrer l'effet de l'inhibition de la calcineurine sur la désensibilisation du NPR-A induite par une élévation du calcium cytosolique. Cette procédure coûte toutefois très cher.

En bref, les travaux présentés dans ce mémoire démontrent que l'élévation de GMPc n'est pas suffisante pour causer la désensibilisation homologue du NPR-A et qu'un changement conformationnel induit par l'agoniste est requis. Évidemment, un rôle pour le GMPc dans ce processus n'est pas exclu puisque le changement conformationnel du NPR-A n'est peut-être pas suffisant non plus. La déphosphorylation du NPR-A pourrait être causée par une combinaison des deux événements : la hausse de GMPc pourrait activer une protéine qui lierait seulement la conformation activée du récepteur empêchant ainsi la protéine kinase du récepteur d'avoir accès aux sites de phosphorylation du KHD. PKG pourrait être une candidate pour ce mécanisme d'inhibition étant donné qu'elle semble s'associer au NPR-A et qu'elle serait recrutée à la membrane plasmique uniquement suite à la stimulation par ANP. Cette translocation de PKG pourrait par conséquent avoir une double fonction

où cette kinase pourrait phosphoryler des protéines liées à la membrane transmettant ainsi la réponse au GMPc tout en servant de mécanisme de rétro-inhibition pour l'activité du NPR-A. Puisque la PKG peut phosphoryler le NPR-A purifié (100), il est aussi possible que ce recrutement puisse plutôt faciliter la resensibilisation rapide du système dès que le changement conformationnel est relevé.

Il est plus que probable que le processus de désensibilisation hétérologue soit différent et qu'il puisse requérir une augmentation de l'activité phosphatase plutôt qu'une réduction de l'efficacité kinase. Nos résultats suggèrent que l'activation de la phosphatase calcineurine inhibe l'activité guanylate cyclase du NPR-A. Maintenant, est-ce que la calcineurine n'est qu'un intermédiaire de la voie de désensibilisation hétérologue par le calcium ou peut-elle déphosphoryler directement le NPR-A? Cela reste à voir puisque nous ne savons pas encore si la désensibilisation par le calcium implique réellement la déphosphorylation du récepteur.

La prochaine étape serait évidemment de tester si la hausse de calcium cytosolique entraîne la déphosphorylation du NPR-A et si une inhibition de la calcineurine pouvait bloquer cette déphosphorylation du KHD. Une procédure développée en première année de maîtrise permettrait de vérifier ces hypothèses. Il suffirait de pré-incuber, en présence de phosphore-32, des cellules LLC-PK1 exprimant stablement le NPR-A dérivé avec l'épitope FLAG avant de les traiter avec l'ionomycine et/ou le CIP. Après avoir solubilisé les cellules, le NPR-A serait immunoprécipité avec un anticorps reconnaissant spécifiquement sa queue carboxy-terminale. Les protéines du culot migreraient ensuite par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide avant d'être transférées sur une membrane de nitrocellulose. La même membrane servirait pour le buvardage Western anti-FLAG et pour l'autoradiogramme. Le rapport de l'intensité des bandes obtenues par l'autoradiogramme sur l'intensité des bandes respectives obtenues par buvardage Western donnerait alors le niveau de phosphorylation du NPR-A en tenant compte de la quantité de récepteur. Cela permet de mesurer avec précision l'évolution du niveau de phosphorylation sans subir l'influence des variations de la quantité de récepteur

déposée dans chacun des puits de l'électrophorèse. La solubilisation et l'immunoprécipitation n'étant pas des procédures parfaitement constantes.

Il est de notoriété que l'activation de la calcineurine entraîne l'hypertrophie cardiaque (124). L'étude d'une possible interaction directe entre la calcineurine et le NPR-A est donc essentielle pour examiner la responsabilité de la désensibilisation du NPR-A dans les mécanismes du développement et de la maintenance de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque. De plus, la recherche de la kinase phosphorylant les NPR-A/B demeure cruciale. L'identification de cette protéine clé dans la régulation de l'activité des récepteurs natriurétiques aiderait grandement à mieux comprendre le mécanisme de désensibilisation homologue. Cela s'avère primordial puisque cette condition est caractéristique de pathologies résistantes aux peptides natriurétiques où les actions hypotensives et anti-hypertrophiques des peptides natriurétiques seraient pourtant des plus salutaires. Nos recherches représentent un pas important dans la compréhension de ces processus de désensibilisation homologue et hétérologue des récepteurs des peptides natriurétiques.

## Bibliographie

- 1- Kisch B. Electron microscopy of the atrium of the heart. I. Guinea pig. *Exp. Med. Surg.* 14; 99-112 (1956).
- 2- Henry JP, Gauer OH et Reeves JL. Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow. *Circ. Res.* 4; 85-90 (1956).
- 3- de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT et Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci.* 28; 89-94 (1981).
- 4- Flynn TG, de Bold ML et de Bold AJ. The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117; 859-865 (1983).
- 5- Sudoh T, Kangawa K, Minamino N et Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 332; 78-81 (1988).
- 6- Sudoh T, Minamino N, Kangawa K et Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168; 863-870 (1990).
- 7- Schweitz H, Vigne P, Moinier D, Frelin C et Lazdunski M. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *J. Biol. Chem.* 267; 13928-13932 (1992).
- 8- Schirger JA, Heublein DM, Chen HH, Lisy O, Jougasaki M, Wennberg PW et Burnett JC Jr. Presence of *Dendroaspis* natriuretic peptide-like immunoreactivity in human plasma and its increase during human heart failure. *Mayo Clin. Proc.* 74; 126-130 (1999).
- 9- Lisy O, Jougasaki M, Heublein DM, Schirger JA, Chen HH, Wennberg PW et Burnett JC. Renal actions of synthetic *dendroaspis* natriuretic peptide. *Kidney Int.* 56; 502-508 (1999).
- 10- Collins E, Bracamonte MP, Burnett JC Jr et Miller VM. Mechanism of relaxations to *dendroaspis* natriuretic peptide in canine coronary arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 35; 614-618 (2000).

- 11- Greenberg RN, Hill M, Crytzer J, Krause WJ, Eber SL, Hamra FK et Forte LR. Comparison of effects of uroguanylin, guanylin, and Escherichia coli heat-stable enterotoxin STa in mouse intestine and kidney: evidence that uroguanylin is an intestinal natriuretic hormone. *J. Investig. Med.* 45; 276-282 (1997).
- 12- Forssmann WG. Urodilatin (ularitide, INN): a renal natriuretic peptide. Molecular biology and clinical importance. *Nephron* 69; 211-222 (1995).
- 13- Silberbach M et Roberts CT, Jr. Natriuretic peptide signalling: molecular and cellular pathways to growth regulation. *Cell Signal.* 13; 221-231 (2001).
- 14- Espiner EA, Richards AM, Yandle TG et Nicholls MG. Natriuretic hormones. *Endocrinol. Metab Clin. North Am.* 24; 481-509 (1995).
- 15- Greenberg BD, Bencen GH, Seilhamer JJ, Lewicki JA et Fiddes JC. Nucleotide sequence of the gene encoding human atrial natriuretic factor precursor. *Nature* 312; 656-658 (1984).
- 16- Seidman CE, Bloch KD, Klein KA, Smith JA et Seidman JG. Nucleotide sequences of the human and mouse atrial natriuretic factor genes. *Science* 226; 1206-1209 (1984).
- 17- Rubattu S et Volpe M. The atrial natriuretic peptide: a changing view. *J. Hypertens.* 19; 1923-1931 (2001).
- 18- Kone BC. Molecular biology of natriuretic peptides and nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.* 51; 429-441 (2001).
- 19- Forssmann WG, Richter R et Meyer M. The endocrine heart and natriuretic peptides: histochemistry, cell biology, and functional aspects of the renal urodilatin system. *Histochem. Cell Biol.* 110; 335-357 (1998).
- 20- Yan W, Wu F, Morser J et Wu Q. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97; 8525-8529 (2000).
- 21- Vesely DL, Douglass MA, Dietz JR, Gower WR Jr, McCormick MT, Rodriguez-Paz G et Schocken DD. Three peptides from the atrial natriuretic factor prohormone amino terminus lower blood pressure and produce diuresis, natriuresis, and/or kaliuresis in humans. *Circulation* 90; 1129-1140 (1994).

- 22- Weir ML, Honrath U, Flynn TG et Sonnenberg H. Lack of biologic activity or specific binding of amino-terminal pro-ANP segments in the rat. *Regul. Pept.* 53; 111-122 (1994).
- 23- Sugawara A, Nakao K, Morii N, Yamada T, Itoh H, Shiono S, Saito Y, Mukoyama M, Arai H, Nishimura K, Obata K, Yasue H, Ban T et Imura H. Synthesis of atrial natriuretic polypeptide in human failing hearts. Evidence for altered processing of atrial natriuretic polypeptide precursor and augmented synthesis of beta-human ANP. *J. Clin. Invest* 81; 1962-1970 (1988).
- 24- Kangawa K, Fukuda A et Matsuo H. Structural identification of beta- and gamma-human atrial natriuretic polypeptides. *Nature* 313; 397-400 (1985).
- 25- McDowell G, Shaw C, Buchanan KD et Nicholls DP. The natriuretic peptide family. *Eur. J. Clin. Invest* 25; 291-298 (1995).
- 26- Koller KJ et Goeddel DV. Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors. *Circulation* 86; 1081-1088 (1992).
- 27- Garcia R, Thibault G, Seidah NG, Lazure C, Cantin M, Genest J et Chretien M. Structure-activity relationships of atrial natriuretic factor (ANF). II. Effect of chain-length modifications on vascular reactivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126; 178-184 (1985).
- 28- De Léan A, Thibault G, Seidah NG, Lazure C, Gutkowska J, Chretien M, Genest J et Cantin M. Structure-activity relationships of atrial natriuretic factor (ANF). III. Correlation of receptor affinity with relative potency on aldosterone production in zona glomerulosa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132; 360-367 (1985).
- 29- Baxter GF. The natriuretic peptides. *Basic Res. Cardiol.* 99; 71-75 (2004).
- 30- Venugopal J. Cardiac natriuretic peptides--hope or hype? *J. Clin. Pharm. Ther.* 26; 15-31 (2001).
- 31- Woods RL. Cardioprotective functions of atrial natriuretic peptide and B-type natriuretic peptide: a brief review. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* 31; 791-794 (2004).
- 32- Sengenès C, Berlan M, De Glisezinski I, Lafontan M et Galitzky J. Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB J.* 14; 1345-1351 (2000).

- 33- Suzuki T, Yamazaki T et Yazaki Y. The role of the natriuretic peptides in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.* 51; 489-494 (2001).
- 34- Levin ER, Gardner DG et Samson WK. Natriuretic peptides. *N. Engl. J. Med.* 339; 321-328 (1998).
- 35- Stoupakis G et Klapholz M. Natriuretic peptides: biochemistry, physiology, and therapeutic role in heart failure. *Heart Dis.* 5; 215-223 (2003).
- 36- Tremblay J, Desjardins R, Hum D, Gutkowska J et Hamet P. Biochemistry and physiology of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Mol. Cell Biochem.* 230; 31-47 (2002).
- 37- Brunner-La Rocca HP, Kiowski W, Ramsay D et Sutsch G. Therapeutic benefits of increasing natriuretic peptide levels. *Cardiovasc. Res.* 51; 510-520 (2001).
- 38- Wilkins MR, Redondo J et Brown LA. The natriuretic-peptide family. *Lancet* 349; 1307-1310 (1997).
- 39- Ogawa Y, Nakao K, Mukoyama M, Hosoda K, Shirakami G, Arai H, Saito Y, Suga S, Jougasaki M et Imura H. Natriuretic peptides as cardiac hormones in normotensive and spontaneously hypertensive rats. The ventricle is a major site of synthesis and secretion of brain natriuretic peptide. *Circ. Res.* 69; 491-500 (1991).
- 40- Ogawa Y, Itoh H, Yoshitake Y, Inoue M, Yoshimasa T, Serikawa T et Nakao K. Molecular cloning and chromosomal assignment of the mouse C-type natriuretic peptide (CNP) gene (Nppc): comparison with the human CNP gene (NPPC). *Genomics* 24; 383-387 (1994).
- 41- Hunt PJ, Espiner EA, Richards AM, Yandle TG, Frampton C et Nicholls MG. Interactions of atrial and brain natriuretic peptides at pathophysiological levels in normal men. *Am. J. Physiol* 269; R1397-R1403 (1995).
- 42- Ogawa Y, Tamura N, Chusho H et Nakao K. Brain natriuretic peptide appears to act locally as an antifibrotic factor in the heart. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 79; 723-729 (2001).
- 43- Kalra PR, Anker SD et Coats AJ. Water and sodium regulation in chronic heart failure: the role of natriuretic peptides and vasopressin. *Cardiovasc. Res.* 51; 495-509 (2001).

- 44- Hirose S, Hagiwara H et Takei Y. Comparative molecular biology of natriuretic peptide receptors. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 79; 665-672 (2001).
- 45- Furuya M, Tawaragi Y, Minamitake Y, Kitajima Y, Fuchimura K, Tanaka S, Minamino N, Kangawa K et Matsuo H. Structural requirements of C-type natriuretic peptide for elevation of cyclic GMP in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183; 964-969 (1992).
- 46- Kalra PR, Anker SD, Struthers AD et Coats AJ. The role of C-type natriuretic peptide in cardiovascular medicine. *Eur. Heart J.* 22; 997-1007 (2001).
- 47- Yasoda A, Ogawa Y, Suda M, Tamura N, Mori K, Sakuma Y, Chusho H, Shiota K, Tanaka K et Nakao K. Natriuretic peptide regulation of endochondral ossification. Evidence for possible roles of the C-type natriuretic peptide/guanylyl cyclase-B pathway. *J. Biol. Chem.* 273; 11695-11700 (1998).
- 48- Mericq V, Uyeda JA, Barnes KM, De Luca F et Baron J. Regulation of fetal rat bone growth by C-type natriuretic peptide and cGMP. *Pediatr. Res.* 47; 189-193 (2000).
- 49- Chusho H, Tamura N, Ogawa Y, Yasoda A, Suda M, Miyazawa T, Nakamura K, Nakao K, Kurihara T, Komatsu Y, Itoh H, Tanaka K, Saito Y, Katsuki M et Nakao K. Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98; 4016-4021 (2001).
- 50- Chinkers M, Garbers DL, Chang MS, Lowe DG, Chin HM, Goeddel DV et Schulz S. A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature* 338; 78-83 (1989).
- 51- Suga S, Nakao K, Hosoda K, Mukoyama M, Ogawa Y, Shirakami G, Arai H, Saito Y, Kambayashi Y, Inouye K et Imura H. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 130; 229-239 (1992).
- 52- Chang MS, Lowe DG, Lewis M, Hellmiss R, Chen E et Goeddel DV. Differential activation by atrial and brain natriuretic peptides of two different receptor guanylate cyclases. *Nature* 341; 68-72 (1989).

- 53- Schulz S, Singh S, Bellet RA, Singh G, Tubb DJ, Chin H et Garbers DL. The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell* 58; 1155-1162 (1989).
- 54- Schenk DB, Phelps MN, Porter JG, Fuller F, Cordell B et Lewicki JA. Purification and subunit composition of atrial natriuretic peptide receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84; 1521-1525 (1987).
- 55- Nussenzveig DR, Lewicki JA et Maack T. Cellular mechanisms of the clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor. *J. Biol. Chem.* 265; 20952-20958 (1990).
- 56- Kobialka M et Gorczyca WA. Particulate guanylyl cyclases: multiple mechanisms of activation. *Acta Biochim. Pol.* 47; 517-528 (2000).
- 57- Kuhn M. Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ. Res.* 93; 700-709 (2003).
- 58- Oliver PM, Fox JE, Kim R, Rockman HA, Kim HS, Reddick RL, Pandey KN, Milgram SL, Smithies O et Maeda N. Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94; 14730-14735 (1997).
- 59- Kishimoto I, Rossi K et Garbers DL. A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98; 2703-2706 (2001).
- 60- Garg R, Oliver PM, Maeda N et Pandey KN. Genomic structure, organization, and promoter region analysis of murine guanylyl cyclase/atrial natriuretic peptide receptor-A gene. *Gene* 291; 123-133 (2002).
- 61- Potter LR et Hunter T. Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation. *J. Biol. Chem.* 276; 6057-6060 (2001).
- 62- Misono KS. Natriuretic peptide receptor: structure and signaling. *Mol. Cell Biochem.* 230; 49-60 (2002).

- 63- van den Akker F, Zhang X, Miyagi M, Huo X, Misono KS et Yee VC. Structure of the dimerized hormone-binding domain of a guanylyl-cyclase-coupled receptor. *Nature* 406; 101-104 (2000).
- 64- Misono KS, Sivasubramanian N, Berkner K et Zhang X. Expression and purification of the extracellular ligand-binding domain of the atrial natriuretic peptide (ANP) receptor: monovalent binding with ANP induces 2:2 complexes. *Biochemistry* 38; 516-523 (1999).
- 65- Rondeau JJ, McNicoll N, Gagnon J, Bouchard N, Ong H et De Léan A. Stoichiometry of the atrial natriuretic factor-R1 receptor complex in the bovine zona glomerulosa. *Biochemistry* 34; 2130-2136 (1995).
- 66- van den Akker F. Structural insights into the ligand binding domains of membrane bound guanylyl cyclases and natriuretic peptide receptors. *J. Mol. Biol.* 311; 923-937 (2001).
- 67- De Léan A, McNicoll N et Labrecque J. Natriuretic peptide receptor A activation stabilizes a membrane-distal dimer interface. *J. Biol. Chem.* 278; 11159-11166 (2003).
- 68- Qiu Y, Ogawa H, Miyagi M et Misono KS. Constitutive activation and uncoupling of the atrial natriuretic peptide receptor by mutations at the dimer interface. Role of the dimer structure in signalling. *J. Biol. Chem.* 279; 6115-6123 (2004).
- 69- Ogawa H, Qiu Y, Ogata CM et Misono KS. Crystal structure of hormone-bound atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain: rotation mechanism for transmembrane signal transduction. *J. Biol. Chem.* 279; 28625-28631 (2004).
- 70- Jossart C, Coupal M, McNicoll N, Fournier A, Wilkes BC et De Léan A. Photolabeling Study of the Ligand Binding Domain of Natriuretic Peptide Receptor A: Development of a Model. *Biochemistry* 44; 2397-2408 (2005).
- 71- Garbers DL. The guanylyl cyclase receptors. *Methods* 19; 477-484 (1999).
- 72- Huo X, Abe T et Misono KS. Ligand binding-dependent limited proteolysis of the atrial natriuretic peptide receptor: juxtamembrane hinge structure essential for transmembrane signal transduction. *Biochemistry* 38; 16941-16951 (1999).

- 73- Labrecque J, Deschenes J, McNicoll N et De Léan A. Agonistic induction of a covalent dimer in a mutant of natriuretic peptide receptor-A documents a juxtamembrane interaction that accompanies receptor activation. *J. Biol. Chem.* 276; 8064-8072 (2001).
- 74- Hamet P, Pang SC et Tremblay J. Atrial natriuretic factor-induced egression of cyclic guanosine 3':5'-monophosphate in cultured vascular smooth muscle and endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 264; 12364-12369 (1989).
- 75- Essayan DM. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108; 671-680 (2001).
- 76- Pandey KN. Intracellular trafficking and metabolic turnover of ligand-bound guanylyl cyclase/atrial natriuretic peptide receptor-A into subcellular compartments. *Mol. Cell Biochem.* 230; 61-72 (2002).
- 77- Pandey KN, Nguyen HT, Garg R, Khurana ML et Fink J. Internalization and trafficking of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A is regulated by an acidic tyrosine-based cytoplasmic motif GDAY. *Biochem. J.* 388; 103-113 (2005).
- 78- Fan D, Bryan PM, Antos LK, Potthast RJ et Potter LR. Down-regulation does not mediate natriuretic peptide-dependent desensitization of natriuretic peptide receptor (NPR)-A or NPR-B: guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors do not internalize. *Mol. Pharmacol.* 67; 174-183 (2005).
- 79- Jewett JR, Koller KJ, Goeddel DV et Lowe DG. Hormonal induction of low affinity receptor guanylyl cyclase. *EMBO J.* 12; 769-777 (1993).
- 80- Vieira MA, Gao M, Nikonova LN et Maack T. Molecular and cellular physiology of the dissociation of atrial natriuretic peptide from guanylyl cyclase a receptors. *J. Biol. Chem.* 276; 36438-36445 (2001).
- 81- Bartels CF, Bukulmez H, Padayatti P, Rhee DK, van Ravenswaaij-Arts C, Pauli RM, Mundlos S, Chitayat D, Shih LY, Al-Gazali LI, Kant S, Cole T, Morton J, Cormier-Daire V, Faivre L, Lees M, Kirk J, Mortier GR, Leroy J, Zabel B, Kim CA, Crow Y, Braverman NE, van den Akker F et Warman ML. Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux. *Am. J. Hum. Genet.* 75; 27-34 (2004).

- 82- Matsukawa N, Grzesik WJ, Takahashi N, Pandey KN, Pang S, Yamauchi M et Smithies O. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96; 7403-7408 (1999).
- 83- Mizuno T, Iwashina M, Itakura M, Hagiwara H et Hirose S. A variant form of the type C atrial natriuretic peptide receptor generated by alternative RNA splicing. *J. Biol. Chem.* 268; 5162-5167 (1993).
- 84- Itakura M, Iwashina M, Mizuno T, Ito T, Hagiwara H et Hirose S. Mutational analysis of disulfide bridges in the type C atrial natriuretic peptide receptor. *J. Biol. Chem.* 269; 8314-8318 (1994).
- 85- Stults JT, O'Connell KL, Garcia C, Wong S, Engel AM, Garbers DL et Lowe DG. The disulfide linkages and glycosylation sites of the human natriuretic peptide receptor-C homodimer. *Biochemistry* 33; 11372-11381 (1994).
- 86- Itakura M, Suzuki H et Hirose S. Structural analysis of natriuretic peptide receptor-C by truncation and site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* 322 ( Pt 2); 585-590 (1997).
- 87- He XI, Chow Dc, Martick MM et Garcia KC. Allosteric activation of a spring-loaded natriuretic peptide receptor dimer by hormone. *Science* 293; 1657-1662 (2001).
- 88- Cohen D, Koh GY, Nikonova LN, Porter JG et Maack T. Molecular determinants of the clearance function of type C receptors of natriuretic peptides. *J. Biol. Chem.* 271; 9863-9869 (1996).
- 89- Pedro L, Fenrick R, Marquis M, McNicoll N et De Léan A. Characterization of the phosphorylation state of natriuretic peptide receptor-C. *Mol. Cell Biochem.* 178; 95-101 (1998).
- 90- Zhou H et Murthy KS. Identification of the G protein-activating sequence of the single-transmembrane natriuretic peptide receptor C (NPR-C). *Am. J. Physiol Cell Physiol* 284; C1255-C1261 (2003).
- 91- Murthy KS, Teng BQ, Zhou H, Jin JG, Grider JR et Makhlouf GM. G(i-1)/G(i-2)-dependent signaling by single-transmembrane natriuretic peptide clearance receptor. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 278; G974-G980 (2000).

- 92- Hu RM, Levin ER, Pedram A et Frank HJ. Atrial natriuretic peptide inhibits the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. Mediation through the C receptor. *J. Biol. Chem.* 267; 17384-17389 (1992).
- 93- Kierner AK, Lehner MD, Hartung T et Vollmar AM. Inhibition of cyclooxygenase-2 by natriuretic peptides. *Endocrinology* 143; 846-852 (2002).
- 94- Rose RA, Lomax AE et Giles WR. Inhibition of L-type Ca<sup>2+</sup> current by C-type natriuretic peptide in bullfrog atrial myocytes: an NPR-C-mediated effect. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 285; H2454-H2462 (2003).
- 95- Sibley DR et Lefkowitz RJ. Molecular mechanisms of receptor desensitization using the beta-adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model. *Nature* 317; 124-129 (1985).
- 96- Foster DC et Garbers DL. Dual role for adenine nucleotides in the regulation of the atrial natriuretic peptide receptor, guanylyl cyclase-A. *J. Biol. Chem.* 273; 16311-16318 (1998).
- 97- Joubert S, Labrecque J et De Léan A. Reduced activity of the NPR-A kinase triggers dephosphorylation and homologous desensitization of the receptor. *Biochemistry* 40; 11096-11105 (2001).
- 98- Chinkers M. Targeting of a distinctive protein-serine phosphatase to the protein kinase-like domain of the atrial natriuretic peptide receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91; 11075-11079 (1994).
- 99- Bryan PM et Potter LR. The atrial natriuretic peptide receptor (NPR-A/GC-A) is dephosphorylated by distinct microcystin-sensitive and magnesium-dependent protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* 277; 16041-16047 (2002).
- 100- Larose L, Rondeau JJ, Ong H et De Léan A. Phosphorylation of atrial natriuretic factor R1 receptor by serine/threonine protein kinases: evidences for receptor regulation. *Mol. Cell Biochem.* 115; 203-211 (1992).
- 101- Abbey SE et Potter LR. Vasopressin-dependent inhibition of the C-type natriuretic peptide receptor, NPR-B/GC-B, requires elevated intracellular calcium concentrations. *J. Biol. Chem.* 277; 42423-42430 (2002).

- 102- Nambi P, Whitman M, Gessner G, Aiyar N et Crooke ST. Vasopressin-mediated inhibition of atrial natriuretic factor-stimulated cGMP accumulation in an established smooth muscle cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83; 8492-8495 (1986).
- 103- Haneda M, Kikkawa R, Maeda S, Togawa M, Koya D, Horide N, Kajiwara N et Shigeta Y. Dual mechanism of angiotensin II inhibits ANP-induced mesangial cGMP accumulation. *Kidney Int.* 40; 188-194 (1991).
- 104- Smith JB et Lincoln TM. Angiotensin decreases cyclic GMP accumulation produced by atrial natriuretic factor. *Am. J. Physiol* 253; C147-C150 (1987).
- 105- Jaiswal RK. Endothelin inhibits the atrial natriuretic factor stimulated cGMP production by activating the protein kinase C in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182; 395-402 (1992).
- 106- Tokudome T, Horio T, Soeki T, Mori K, Kishimoto I, Suga S, Yoshihara F, Kawano Y, Kohno M et Kangawa K. Inhibitory effect of C-type natriuretic peptide (CNP) on cultured cardiac myocyte hypertrophy: interference between CNP and endothelin-1 signaling pathways. *Endocrinology* 145; 2131-2140 (2004).
- 107- Jaiswal RK, Jaiswal N et Sharma RK. Negative regulation of atrial natriuretic factor receptor coupled membrane guanylate cyclase by phorbol ester. Potential protein kinase C regulation of cyclic GMP signal in isolated adrenocortical carcinoma cells of rat. *FEBS Lett.* 227; 47-50 (1988).
- 108- Potter LR et Garbers DL. Protein kinase C-dependent desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor is mediated by dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* 269; 14636-14642 (1994).
- 109- Yasunari K, Kohno M, Murakawa K, Yokokawa K, Horio T et Takeda T. Phorbol ester and atrial natriuretic peptide receptor response on vascular smooth muscle. *Hypertension* 19; 314-319 (1992).
- 110- Potthast R, Abbey-Hosch SE, Antos LK, Marchant JS, Kuhn M et Potter LR. Calcium-dependent dephosphorylation mediates the hyperosmotic and lysophosphatidic acid-dependent inhibition of natriuretic peptide receptor-B/guanylyl cyclase-B. *J. Biol. Chem.* 279; 48513-48519 (2004).

- 111- Madhani M, Scotland RS, MacAllister RJ et Hobbs AJ. Vascular natriuretic peptide receptor-linked particulate guanylate cyclases are modulated by nitric oxide-cyclic GMP signalling. *Br. J. Pharmacol.* 139; 1289-1296 (2003).
- 112- Hull RN, Cherry WR et Weaver GW. The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK. *In Vitro* 12; 670-677 (1976).
- 113- Fethiere J, Meloche S, Nguyen TT, Ong H et De Léan A. Distinct properties of atrial natriuretic factor receptor subpopulations in epithelial and fibroblast cell lines. *Mol. Pharmacol.* 35; 584-592 (1989).
- 114- Suga S, Nakao K, Mukoyama M, Arai H, Hosoda K, Ogawa Y et Imura H. Characterization of natriuretic peptide receptors in cultured cells. *Hypertension* 19; 762-765 (1992).
- 115- Wolf G, Zahner G, Mondorf U, Schoeppe W et Stahl RA. Angiotensin II stimulates cellular hypertrophy of LLC-PK1 cells through the AT1 receptor. *Nephrol. Dial. Transplant.* 8; 128-133 (1993).
- 116- Lea JP, Jin SG, Roberts BR, Shuler MS, Marrero MB et Tumlin JA. Angiotensin II stimulates calcineurin activity in proximal tubule epithelia through AT-1 receptor-mediated tyrosine phosphorylation of the PLC-gamma1 isoform. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13; 1750-1756 (2002).
- 117- Zolle O, Lawrie AM et Simpson AW. Activation of the particulate and not the soluble guanylate cyclase leads to the inhibition of Ca<sup>2+</sup> extrusion through localized elevation of cGMP. *J. Biol. Chem.* 275; 25892-25899 (2000).
- 118- Airhart N, Yang YF, Roberts CT Jr et Silberbach M. Atrial natriuretic peptide induces natriuretic peptide receptor-cGMP-dependent protein kinase interaction. *J. Biol. Chem.* 278; 38693-38698 (2003).
- 119- Chen ZJ, Vetter M, Chang GD, Liu S, Che D, Ding Y, Kim SS et Chang CH. Cyclophilin A functions as an endogenous inhibitor for membrane-bound guanylate cyclase-A. *Hypertension* 44; 963-968 (2004).
- 120- Potter LR et Hunter T. A constitutively "phosphorylated" guanylyl cyclase-linked atrial natriuretic peptide receptor mutant is resistant to desensitization. *Mol. Biol. Cell* 10; 1811-1820 (1999).

- 121- Matsuda S et Koyasu S. Regulation of MAPK signaling pathways through immunophilin-ligand complex. *Curr. Top. Med. Chem.* 3; 1358-1367 (2003).
- 122- Hashimoto Y, Perrino BA et Soderling TR. Identification of an autoinhibitory domain in calcineurin. *J. Biol. Chem.* 265; 1924-1927 (1990).
- 123- Terada H, Matsushita M, Lu YF, Shirai T, Li ST, Tomizawa K, Moriwaki A, Nishio S, Date I, Ohmoto T et Matsui H. Inhibition of excitatory neuronal cell death by cell-permeable calcineurin autoinhibitory peptide. *J. Neurochem.* 87; 1145-1151 (2003).
- 124- Leinwand LA. Calcineurin inhibition and cardiac hypertrophy: a matter of balance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98; 2947-2949 (2001).