

Université de Montréal

Effets du GMPc sur les régulateurs de la synthèse protéique
dans des cardiomyocytes adultes

Par
FATMÉ SAMHAT

Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures



Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Biologie Moléculaire

Janvier 2005
©, FATMÉ SAMHAT, 2005



QH

506

U54

2005

V.024

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 :

Effets du GMPc sur les régulateurs de la synthèse protéique
dans des cardiomyocytes adultes

Présenté par :
FATMÉ SAMHAT

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Marc Therrien
Président rapporteur

Dr Christian Deschepper
Directeur de recherche

Dr Gaétan Guillemette
Membre du jury

Résumé

Comme le GMPc exerce des effets anti-hypertrophiques sur les cardiomyocytes, nous avons testé si cet effet pouvait s'exercer en partie via des effets sur les régulateurs de la synthèse protéique. En utilisant des cultures primaires de cardiomyocytes de rats adultes, nous avons d'abord observé que l'accumulation de protéines *de novo* était stimulée tant par l'insuline (Ins) que la phényléphrine (PE), mais que la préincubation des cellules avec le 8-Br-GMPc (10^{-4} M) prévenait uniquement l'effet de la PE. Il est connu que l'Ins régule la synthèse protéique principalement via une voie rapamycine-sensible, alors que l'effet de la PE peut être en partie rapamycine-indépendant. Nous avons donc testé l'effet de GMPc sur la phosphorylation des résidus thr421/ser424 (dont la phosphorylation peut être rapamycine-indépendante) de la kinase p70 S6K1 et du résidu thr389 (dont la phosphorylation est rapamycine-dépendante) de cette même kinase. Nous avons ainsi observé que la PE et l'Ins induisent la phosphorylation tant des résidus thr421/ser424 que de thr389. Alors que le GMPc a inhibé la phosphorylation des résidus thr421/ser424 par la PE, il n'avait pas d'effets sur la phosphorylation de ces deux résidus par l'Ins, ni sur la phosphorylation du résidu thr389 par la PE ou l'Ins. Nous avons également confirmé que la phosphorylation des résidus thr421/ser424 suite au traitement à la PE (au contraire de celle induite par l'Ins) n'était pas sensible à la rapamycine. Finalement, comme d'autres auteurs ont rapporté que l'activation des kinases PKC δ et/ou PKC ϵ était nécessaire pour transduire l'effet de la PE sur la phosphorylation de S6K1, nous avons testé si le 8-Br-GMPc pouvait interférer avec les effets de la PE sur PKC δ et PKC ϵ . Nos résultats indiquaient que PE induit la translocation de PKC δ et PKC ϵ vers la membrane des cardiomyocytes, mais que cet effet est inhibé par l'ajout du 8-Br-GMPc aux cellules. Au total, ces résultats indiquent que les effets anti-hypertrophiques du GMPc au niveau cardiaque pourraient s'expliquer (du moins en partie) par des effets au niveau de molécules spécifiques impliquées dans la régulation de la synthèse protéique.

Mots clés

Cardiomyocytes adultes, hypertrophie ventriculaire, phényléphrine, insuline, GMPc, synthèse protéique, S6K1, PKC, rapamycine.

Abstract

As cGMP exerts anti-hypertrophic effects on cardiomyocytes, we tested if this effect could be exerted partly via regulators of protein synthesis. By using primary cultures of cardiomyocytes of adult rats, we initially observed that the accumulation of proteins *de novo* was stimulated by insulin (Ins) and phenylephrin (PE), but the incubation of the cells with 8-Br-cGMP (10^{-4} M) prevented only the PE effect. It is known that Ins controls the protein synthesis mainly via a rapamycin-sensitive pathway, whereas the effect of PE can be partly rapamycin-independent. We thus tested the effect of cGMP on the phosphorylation of thr421/ser424 residues of the kinase p70 S6K1 and the thr389 residue of this same kinase. We observed that PE and Ins induce the phosphorylation of thr421/ser424 residues as well as of thr389. By adding 8-Br-cGMP to the cells, we prevent only the phosphorylation of thr421/ser424 residues by PE. cGMP had no effect in the phosphorylation of thr421/ser424 residues by Ins, neither the phosphorylation of thr389 residue by PE and Ins. We confirmed also that the phosphorylation of thr421/ser424 after PE treatment (in contrast to insulin treatment) was not sensitive to rapamycin. Finally, as of other authors reported that the activation of PKC δ and/or PKC ϵ kinases was necessary for the transmission of PE effect on S6K1 phosphorylation, we tested if 8-Br-cGMP could interfere with the effects of PE on PKC δ and PKC ϵ activation. Our results indicate that PE induces the translocation of PKC δ and PKC ϵ towards the membrane of the cardiomyocytes, but this effect is inhibited by the addition of 8-Br-cGMP to the cells. On the whole, these results indicate that the anti-hypertrophic effects of cGMP at the cardiac level could be explained (at least partly) by affecting on specific molecules implicated in the regulation of the protein synthesis.

Key words

Adult cardiomyocytes, ventricular hypertrophy, phenylephrin, insulin, cGMP, protein synthesis, S6K1, PKC, rapamycin.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xv
Corps de l'ouvrage.....	xvi

Chapitre I: INTRODUCTION.....1

1. L'hypertrophie cardiaque.....	1
1.1. Définition de l'hypertrophie.....	1
1.2. Les principales causes de l'hypertrophie cardiaque.....	2
1.3. Caractéristiques des cellules durant le processus d'hypertrophie.....	2
1.4. Induction expérimentale de l'hypertrophie.....	2
1.5. Expression des gènes durant l'hypertrophie cardiaque.....	3
2. L'ANF et le GMPc.....	3
2.1. Les peptides natriurétiques.....	3
2.2. Le facteur natriurétique des oreillettes.....	6
2.2.1. Histoire de l'ANF.....	6
2.2.2. L'ANF et l'hypertrophie cardiaque.....	6
2.3. Le GMPc.....	7
2.3.1. Les mécanismes d'action du GMPc.....	8
2.3.2. Le GMPc et l'hypertrophie cardiaque.....	8
3. Synthèse protéique.....	9
3.1. Généralités sur la synthèse protéique.....	9
3.2. Les déterminants du taux de la synthèse protéique.....	10
3.2.1. L'efficacité de la synthèse protéique.....	10
3.2.2. La capacité de la synthèse protéique.....	11

3.3. La kinase de la protéine ribosomale S6.....	11
3.3.1. Les isoformes de S6K1.....	11
3.3.2. Les sites de phosphorylation de S6K1.....	12
3.3.3. Modèle d'activation de S6K1.....	13
3.4. Les principaux régulateurs de la synthèse protéique.....	14
4. Les voies de signalisation qui régulent l'hypertrophie cardiaque.....	15
4.1. Les récepteurs couplés aux protéines G.....	16
4.2. Le facteur de croissance IGF-1.....	18
4.3. Les GTPases à faible poids moléculaire.....	21
4.4. Les MAPKs.....	22
4.5. La protéine kinase C.....	24
4.6. La voie calcineurine-NFAT.....	25
4.7. En aval de la PE.....	27
5. Culture des cardiomyocytes.....	31
6. Projet de recherche.....	31
Chapitre II : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	33
1. Animaux.....	33
2. Matériel.....	33
3. Anticorps.....	34
4. Isolation et mise en culture de cardiomyocytes de rats adultes.....	34
5. Incorporation de phenylalanine H ³	35
6. Dosage de l'ADN.....	36
7. Extraction des protéines.....	36
7.1. S6K1.....	36
7.2. PKC.....	36
7.3. MKP-1.....	37
8. Dosage des protéines.....	38
9. Immuno-buvardage.....	38
10. Analyses statistiques.....	38

Chapitre III: RÉSULTATS.....	39
1. Effets du GMPc sur l'accumulation des protéines nouvellement synthétisées.....	40
2. Effets du GMPc sur la phosphorylation de S6K1 par la PE.....	44
3. Effets du GMPc sur la phosphorylation de S6K1 par l'insuline.....	47
4. Effets de la rapamycine sur la phosphorylation de S6K1 par la PE.....	49
5. Effets de la rapamycine sur la phosphorylation de S6K1 par l'insuline.....	49
6. Le GMPc inhibe la voie d'activation mTOR-indépendante de S6K1.....	52
7. MKP-1 ne semble pas être impliquée dans l'effet inhibiteur du GMPc.....	54
8. PKC δ et PKC ϵ sont des cibles du GMPc.....	56
Chapitre IV : DISCUSSION.....	61
1. Le GMPc et la synthèse protéique.....	63
2. Le GMPc et S6K1.....	63
3. En amont de S6K1.....	65
4. Expérimentations futures.....	67
4.1. Identifier les effecteurs cellulaires qui peuvent être inhibés par le GMPc dans la voie d'un récepteur couplé à la protéine Gq.....	67
4.1.1. Les effets du GMPc sur la génération de ROS et l'activation de NADP(H) par la PE dans des cardiomyocytes adultes.....	69
4.1.2. Implication de RhoA dans l'effet inhibiteur du GMPc sur la synthèse protéique et la phosphorylation de S6K1 par la PE.....	70
4.2. Tester si le GMPc affecte les régulateurs de la synthèse protéique <i>in vivo</i>	71
5. Conclusion.....	72
RÉFÉRENCES.....	73

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résumé des résultats obtenus pour les effets du GMPc et de la rapamycine sur la phosphorylation des résidus thr421/ser424 et du résidu thr389.

Liste des figures

- Figure 1: Structures et fonctions des peptides natriurétiques et de leurs récepteurs
- Figure 2: les sites de phosphorylation de S6K1.
- Figure 3: Modèle d'activation de S6K1.
- Figure 4: Les principaux régulateurs de la synthèse protéique.
- Figure 5: La voie de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G.
- Figure 6: La voie de PI3-K.
- Figure 7: La voie de signalisation de Ras.
- Figure 8: Voie de signalisation des MAPKs.
- Figure 9: Régulation de la synthèse protéique par la PE ou par l'insuline.
- Figure 10: A) Une courbe du temps pour la synthèse protéique induite par la PE, B)
Effets du GMPc sur la synthèse protéique induite par la PE ou l'insuline.
- Figure 11: Courbes des temps pour les deux formes phosphorylées de S6K1 dans des cardiomyocytes adultes stimulés par la PE
- Figure 12: Effets du GMPc sur la phosphorylation de S6K1 après stimulation des cardiomyocytes adultes par la PE.
- Figure 13: Effets du GMPc sur la phosphorylation de S6K1 après stimulation des cardiomyocytes adultes par l'insuline.
- Figure 14: Effets de la rapamycine (Rapa) sur la phosphorylation de S6K1 après stimulation des cardiomyocytes adultes par la PE.
- Figure 15: Effets de la rapamycine (Rapa) sur la phosphorylation de S6K1 après stimulation des cardiomyocytes adultes par l'insuline.
- Figure 16: Immuno-buvardage montrant les effets du GMPc et de la rapamycine (Rapa) sur la phosphorylation des résidus thr421/ser424 dans des cardiomyocytes adultes stimulés par la PE.
- Figure 17: La voie qui peut être inhibée par le GMPc en amont de S6K1.
- Figure 18: Immunobuvardage anti MKP-1.
- Figure 19: Courbe du temps montrant La translocation de PKC δ .
- Figure 20: Effets du GMPc sur la translocation de PKC δ après stimulation des cardiomyocytes adultes par la PE.

Figure 21: Effets du GMPc sur la translocation de PKC ϵ après stimulation des cardiomyocytes adultes par la PE.

Figure 22: Régulation de la phosphorylation de S6K1 par la PE et effet du GMPc sur cette phosphorylation.

Figure 23: Diagramme montrant les voies de signalisation qui peuvent relier les récepteurs couplés aux protéines Gq à la réponse hypertrophique dans le coeur

Figure 24: Effets de l'apocynine sur la phosphorylation des résidus thr421/ser424 de S6K1 après stimulation des cardiomyocytes adultes par la PE.

Listes des sigles et des abréviations

4E-BP	Eucaryotic initiation 4E binding protein
8-Br-GMPc	8-Bromo-guanylate monophosphate cyclique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénylate monophosphate cyclique
ANF	Atrial natriuretic factor (facteur natriurétique auriculaire)
Ang II	Angiotensine II
ANP	Atrial natriuretic peptide
aPKC	Atypical PKC
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
BNP	Brain natriuretic peptide (peptide natriurétique cérébral)
BSA	Bovine serum albumine (albumine de sérum bovin)
CNP	C-type natriuretic peptide
cPKC	Conventional PKC
DAG	Diacylglycerol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
eEF	Eukaryotic elongation factor
EGTA	Ethylene glycol-O,O'-bis-[2-amino-ethyl]-N,N,N',N',-tetraacetic acid
eIF	Eukaryotic initiation factor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
Et	Endothelin
FAF-BSA	Fatty acid free-bovine serum albumin
FBS	Fetal bovine serum (sérum bovin fœtal)
FGF	Fibroblast growth factor
GC-A	Guanylate cyclase A
GC-B	Guanylate cyclase B

GDP	Guanosine diphosphate
GMPc	Guanylate monophosphate cyclique
GPCR	G-protein coupled receptor
GSK	Glycogen synthase kinase
GTP	Guanosine triphosphate
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfuric acid
HRP	Horseardish peroxidase
HVG	Hypertrophie cardiaque du ventricule gauche
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
IGF	Insulin-like growth factor
IRS	Insulin receptor substrate
JAK	Janus-activated kinase
JNK	Jun N-terminal kinase
KDa	KiloDalton
KH	Krebs-Henseleit
KO	Knock-Out
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MEK	Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase
MEKK	Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase
MKP	MAPK-phosphatase
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NE	Norépinéphrine
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NO	Nitric oxyde (oxyde nitrique)
NP-40	Nonidet-P40
nPKC	Novel PKC
Nppa	Natriuretic peptide precursor type A
Npr	Natriuretic peptide receptor (le gène qui code pour le récepteur natriurétique de type A)

NPR-A	Natriuretic peptide receptor type A
NPR-B	Natriuretic peptide receptor type B
NPR-C	Natriuretic peptide receptor type C
ON	Over night
p38	Protéine de 38 kDa
P70S6K	70-kDa ribosomal S6 kinase
PBS	Phosphate-buffered-saline
PDK1	Phosphoinositide dependent kinase
PE	Phenyléphrine
Pen-strep	Pénicilline/streptomycine
PHAS	Phosphorylatable heat and acid stable
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PKB	Protein kinase B
PKC	Protein kinase C
PKG	cGMP dependent protein kinase
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethyl-sulfonyl fluoride
RCPG	Récepteur couplé à la protéine G
RGS	Regulator of G protein signaling
ROS	Reactif oxygen species
RTK	Recepteur tyrosine kinase
S6K	S6 kinase (Kinase de la protéine ribosomale S6)
SD	Standard deviation
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
Ser	Sérine
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TAK	TGF-activated kinase
TBS	Tris-buffered saline



TCA	Trichloroacetic acid
TGF	Transforming growth factor
Thr	Thréonine
TOP	Terminal oligopyrimidine
TOR	Target of rapamycin
TP	Température de la pièce
WKY	Wistar Kyoto



Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr Christian Deschepper pour son accueil généreux dans son laboratoire et pour le projet motivant qui m'a offert. Nul doute que Dr Deschepper est le directeur le plus distingué. Il est un des directeurs qui vouent une réelle confiance à ses étudiants.

Dr Deschepper a été toujours disposé à répondre à mes questionnements. Son support tout le long de mon projet de recherche, ses précieux conseils, ainsi que son encadrement serré m'ont permis de finir ma maîtrise.

Je tiens particulièrement à souligner la générosité du Dr Deschepper, sa considération pour la vie familiale et le respect qu'il a pour ses étudiants.

J'ai beaucoup de gratitude envers Ahmad Zahabi avec qui j'ai eu des discussions qui m'ont permis d'apprendre sur la façon de penser scientifique. De plus, Ahmad était toujours présent pour m'écouter.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Ying Li pour son assistance dans toutes les expériences que j'ai faites.

Je voudrais présenter ma reconnaissance à Mme Sylvie Picard qui m'a appris la façon de faire des cultures primaires de cardiomyocytes.

Je voudrais souligner l'aide de Emmanuelle Souzeau et Bastien Llamas dans la critique constructive de ce mémoire.

C'est difficile d'exprimer nos reconnaissances envers les vrais amis. Toute ma vie, je ne peux pas oublier Jennifer Michel, Catherine Legault, Ying Li et Marie-Thérèse Berthier. Leur générosité, leur bonne humeur et leur joie de vivre ont rendu les moments au laboratoire des moments inoubliables.

Je n'aurais jamais pu parvenir à atteindre mes objectifs sans l'appui de mes parents. Je leur remercie beaucoup pour leur motivation et leur soutien tout le long de ma maîtrise.

Finalement, un grand merci pour mon mari, Houssein Hajj Hassan, sans qui je n'aurais plus la capacité de faire une maîtrise et être une maman à la fois.

Merci beaucoup pour Dr Marc Therrien et Gaétan Guillemette d'avoir accepté de corriger la mémoire.

Corps de l'ouvrage

Chapitre I : Introduction

- 1- L'hypertrophie cardiaque
- 2- L'ANF et le GMPc
- 3- Synthèse protéique
- 4- Les voies de signalisation qui régulent l'hypertrophie cardiaque
- 5- Culture des cardiomyocytes
- 6- Projet de recherche

Chapitre II : Matériel et méthodes

Chapitre III : Résultats

1. Effets du GMPc sur l'accumulation des protéines nouvellement synthétisées
2. Effets du GMPc sur la phosphorylation de S6K1 par la PE
3. Effets du GMPc sur la phosphorylation de S6K1 par l'insuline
4. Effets de la rapamycine sur la phosphorylation de S6K1 par la PE
5. Effets de la rapamycine sur la phosphorylation de S6K1 par l'insuline
6. Le GMPc inhibe la voie d'activation mTOR-indépendante de S6K1
7. MKP-1 ne semble pas être impliquée dans l'effet inhibiteur du GMPc
8. PKC δ et PKC ϵ sont des cibles du GMPc

Chapitre IV : Discussion

1. Le GMPc et la synthèse protéique
2. Le GMPc et S6K1
3. En amont de S6K1
4. Expérimentations futures
5. Conclusion

Chapitre I-INTRODUCTION

1. L'hypertrophie cardiaque

Les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de mortalité dans les pays industrialisés (1). Dans ce contexte, l'hypertrophie du ventricule gauche (HVG) apparaît être une condition qui revêt une certaine importance, car elle a été identifiée comme un important facteur de risque de morbidité et de mortalité cardiovasculaire (1;2). Le cœur s'hypertrophie notamment suite à une surcharge de pression artérielle ou de volume veineux (3) qui peuvent accompagner certaines maladies (4). Ceci a amené certains à considérer qu'à court terme, l'HVG constitue un mécanisme d'adaptation aux surcharges (5). Par contre, à long terme, cette condition augmente d'une façon importante le risque d'insuffisance et/ou d'arythmie cardiaque (1).

1.1. Définition de l'hypertrophie

Le terme hypertrophie caractérise en général la croissance d'une cellule en absence d'une division cellulaire et constitue une forme spécifique de la croissance qui se produit dans des cellules différenciées de façon terminale. Dans le cas du cœur, l'augmentation de la masse cardiaque après la naissance est due, en grande partie, à une croissance hypertrophique, car les cardiomyocytes perdent (pour la plupart) la capacité de se diviser après la naissance (6-8).

L'hypertrophie du myocarde est contrôlée par des médiateurs pro-hypertrophiques (facteurs de croissance et stress mécanique) aussi bien que par des facteurs anti-hypertrophiques (9;10). Ainsi, l'hypertrophie peut être due soit à une prédominance des médiateurs pro-hypertrophiques, soit à l'inhibition des actions de facteurs anti-hypertrophiques.

1.2. Les principales causes de l'hypertrophie cardiaque

Ces dernières années, de grands progrès ont été accomplis dans l'identification des multiples facteurs qui exposent une personne au risque d'hypertrophie cardiaque. Entre autres, certaines maladies comme le diabète, l'hypertension, l'hypercholestérolémie, des cardiomyopathies et des problèmes rénaux peuvent être la cause d'une hypertrophie cardiaque. D'autre part, des facteurs comme le sexe, l'âge, le mode de vie, le degré d'activité physique et la consommation de sel, de gras, d'alcool ou de tabac sont aussi des facteurs de risque pour l'hypertrophie (1;2;11;12). Enfin, plusieurs études effectuées chez l'humain ont montré l'héritabilité de la masse cardiaque (13;14) ce qui suggère un rôle très important de facteurs génétiques dans le développement d'une hypertrophie (15;16).

1.3. Caractéristiques des cellules durant le processus d'hypertrophie

Après la naissance, la cellule musculaire cardiaque perd la capacité de se diviser, ce qui fait que le cœur s'adapte à une surcharge en augmentant la taille des cardiomyocytes sans variation dans leur nombre. Il existe deux types de remodelage du cœur aboutissant à des hypertrophies différentes. Une hypertrophie concentrique, observée lors d'une surcharge de pression, se caractérise par une sarcomogénèse en parallèle (augmentation de la largeur des cardiomyocytes) aboutissant à une augmentation de l'épaisseur de la paroi du ventricule (17;18). Parallèlement l'hypertrophie excentrique, observée lors d'une surcharge de volume, se caractérise principalement par une sarcomogénèse en série (augmentation de la longueur des cellules) aboutissant à une cavité ventriculaire plus grande et plus dilatée (17;19;20).

1.4. Induction expérimentale de l'hypertrophie

Différents modèles animaux d'hypertrophie cardiaque ont permis de comprendre de nombreux mécanismes au cours des dernières décennies tant au niveau morphologique que fonctionnel, pharmacologique ou biochimique. Dans les modèles animaux,

l'hypertrophie cardiaque peut être induite soit par une infusion de facteurs hormonaux (tels que les catécholamines ou l'angiotensine) (21;22), soit par une augmentation de la charge de travail cardiaque. Celle-ci peut consister soit en une augmentation de la post-charge (tel que lors d'une constriction aortique), soit en une augmentation de la pré-charge (tel que lors d'une fistule aorto-veineuse) (23;24).

1.5. Expression des gènes durant l'hypertrophie cardiaque

Dans les modèles où l'hypertrophie cardiaque est induite de façon expérimentale, on observe généralement une ré-induction de la synthèse de protéines normalement produites par les cardiomyocytes foetaux (25;26), ainsi que de protéines de la matrice extracellulaire produites par les autres types cellulaires cardiaques (27-29). Ces protéines sont communément considérées comme des marqueurs biochimiques de l'hypertrophie cardiaque. Plusieurs études montrent que différents modes d'induction d'hypertrophie peuvent engendrer différents profils d'expression de gènes dans les cardiomyocytes. Par exemple, après induction d'une hypertrophie par surcharge de pression (hypertrophie concentrique) ou par infusion d'angiotensine II (AngII) ou de norépinéphrine (NE), l'expression du gène de l'actine squelettique α et celle du gène de la chaîne lourde de la myosine β sont induites. Cependant, l'expression de ces deux gènes ne varie pas lorsque l'hypertrophie induite est de type excentrique (30-32). Une augmentation de l'expression du gène qui code pour le facteur natriurétique des oreillettes (ANF) semble toujours être associée à l'induction d'une hypertrophie cardiaque par des facteurs exogènes (25;26;30;31).

2. L'ANF et le GMPc

2.1. Les peptides natriurétiques

Le système des peptides natriurétiques consiste en une famille de trois ligands peptidiques endogènes qui possèdent des similarités de structure. Les peptides natriurétiques de type A (ANP; aussi nommé ANF), de type B (BNP) et de type C (CNP). De plus il consiste en trois récepteurs liés à la membrane : le NPR-A, le NPR-B et le NPR-C (33-35). Deux de ces récepteurs, NPR-A et NPR-B, sont des récepteurs couplés à une guanylate-cyclase (GC-A et GC-B) transduisant les actions biologiques des peptides natriurétiques (36;37). Ces récepteurs forment des tétramères au niveau de la membrane cellulaire. Leurs domaines intracellulaires possèdent un domaine kinase suivi d'un domaine catalytique de la guanylate-cyclase par lequel ils sont reliés à la cascade de signalisation du GMPc (38) (Figure1). Le troisième récepteur, NPR-C, est considéré comme jouant principalement un rôle de clairance.

L'ANF et le BNP sont des hormones cardiaques qui jouent un rôle important dans l'homéostasie cardiovasculaire via GC-A (39;40). Par ailleurs, le CNP peut se trouver dans des variétés des tissus centraux et périphériques (41) où il agit localement d'une façon paracrine/autocrine via GC-B (39;42).

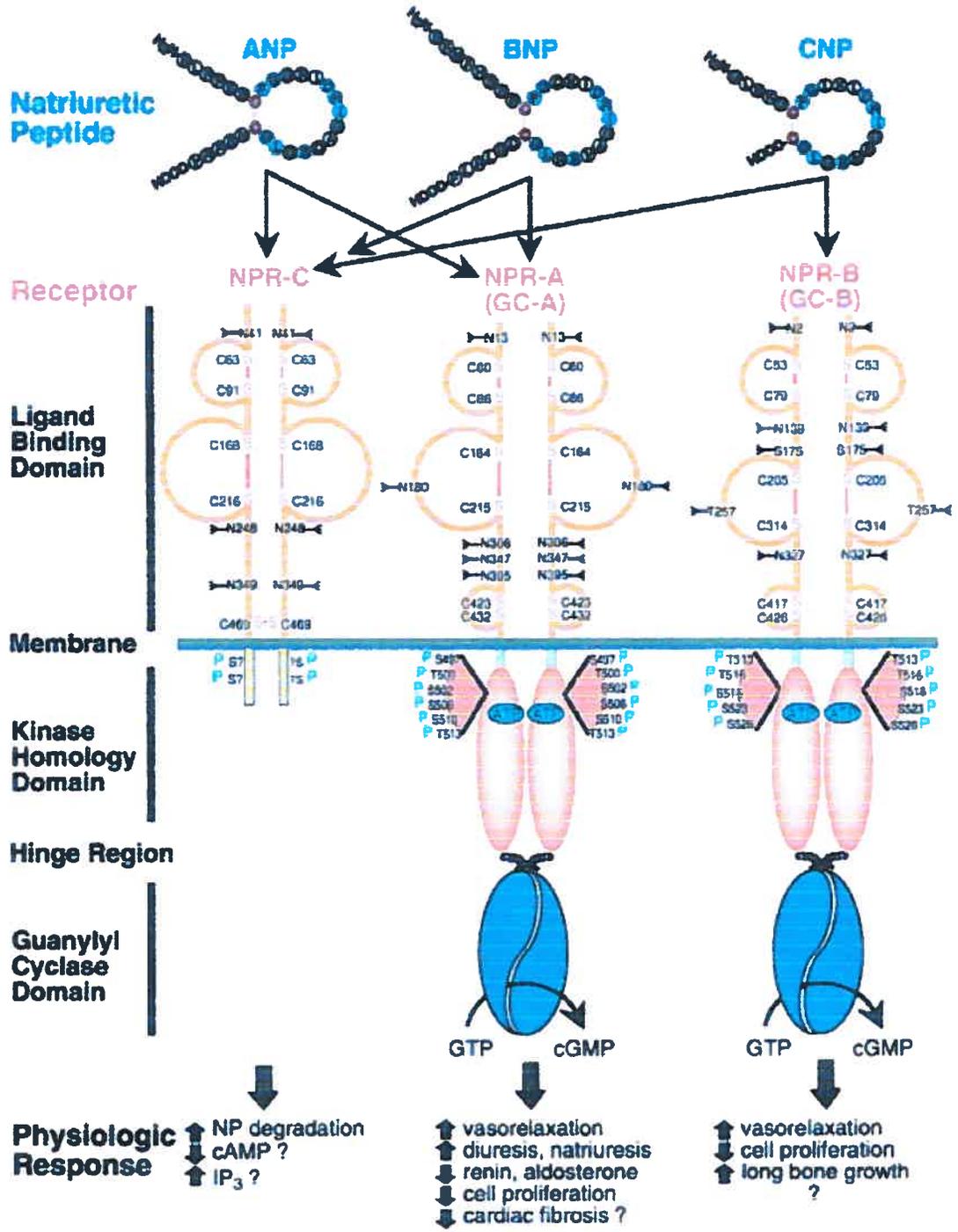


Figure 1 : Structures et fonctions des peptides natriurétiques et de leurs récepteurs (43).

2.2. Le facteur natriurétique des oreillettes [ou *atrial natriuretic factor* (ANF)]

2.2.1. Historique de l'ANF

En 1956, Henry et al. ont observé que l'administration d'extraits d'oreillettes cardiaques à des rats, produisait une diurèse et une hypotension, mais l'administration d'extraits du ventricule n'avait pas d'effets similaires. Cette observation constituait la première évidence que les oreillettes produisent des substances qui régulent le volume sanguin (44). D'autre part, en 1964, l'équipe de Palade et al. a démontré que les oreillettes de toutes les espèces de mammifères contenaient des granules sécrétoires qui pouvaient constituer des organelles entreposant de telles substances (45). Enfin, ce n'est qu'en 1981, que l'équipe de De Bold a suggéré que ces granules contiennent une substance natriurétique à laquelle ils ont attribué le nom de *atrial natriuretic factor* (ANF) (46;202).

Le facteur natriurétique auriculaire est une hormone circulatoire synthétisée et sécrétée par le cœur (47). Ce facteur peut jouer plusieurs rôles incluant ceux : (a) de diminuer la pression artérielle; (b) d'augmenter l'excrétion de l'eau et des sels; (c) de faciliter le passage de l'eau du plasma au milieu interstitiel et (d) d'inhiber la libération ou l'action de plusieurs hormones comme l'aldostérone, l'ANG II, les endothélines (ET), la renine et la vasopressine (48;49).

2.2.2. L'ANF et l'hypertrophie cardiaque

Dans des conditions normales, le peptide ANF est produit surtout par les oreillettes du cœur. En présence de facteurs induisant l'HVG, les ventricules subissent plusieurs modifications qui mènent à une réinduction de l'expression de plusieurs gènes fœtaux, dont l'ANF (47;50;51). Traditionnellement, l'ANF a été considéré comme un marqueur biologique de l'HVG, puisqu'un taux élevé de cette hormone a toujours accompagné les HVGs induites par plusieurs agents exogènes (52). Cependant, une étude récente de coségrégation (faite dans le laboratoire d'accueil) sur la progéniture de rats ayant des pressions artérielles similaires mais des niveaux ventriculaires d'ANF différents a pu

démontrer que des taux élevés d'ANF peuvent être associés à de faibles masses cardiaques ventriculaires (53;54). Une explication permettant de réconcilier ces diverses observations serait que : (a) un taux ventriculaire faible en ANF rend le cœur plus sensible à s'hypertrophier, et (b) un taux élevé, dans un contexte d'HVG induite par un agent exogène, représente un mécanisme de défense cardiaque. Plusieurs autres études, *in vivo*, renforcent cette idée. Ainsi, des souris où le gène *Natriuretic peptide precursor A* (*Nppa*, codant pour le précurseur de l'ANF) est inactif, présentent une augmentation de la masse cardiaque indépendamment de la pression artérielle (55;56). Un effet semblable a été trouvé chez des souris KO pour le gène *Natriuretic peptide receptor* (*Npr1*, codant pour le récepteur NPR-A de l'ANF) (33;57). Cependant, ces études ne permettent pas de conclure si ce phénotype cardiaque résulte d'une action directe de l'ANF sur les cardiomyocytes ou est une conséquence indirecte des effets périphériques de cette hormone (58). A ce sujet, Khichimoto et al. ont croisé des souris KO pour le gène *Npr1* avec des souris transgéniques qui sur-expriment le récepteur de l'ANF spécifiquement dans le cœur. Ils ont démontré que le volume des cardiomyocytes isolés à partir des cœurs des souris double-transgéniques est plus petit par rapport à celui des cardiomyocytes isolés à partir des souris KO (58). Ces résultats sont compatibles avec une action directe de l'ANF sur les cardiomyocytes.

D'autres études faites *in vitro*, ont également démontré un rôle anti-hypertrophique de l'ANF. Ainsi, Calderone et al. ont montré que l'addition d'ANF à des cultures primaires de ventricules des rats néonataux inhibe la synthèse protéique induite par la NE (52). En 2000, Horio et al. ont montré que l'addition d'un antagoniste du récepteur de l'ANF (HS-142-1) augmente le niveau basal de la synthèse protéique ainsi que l'incorporation des protéines induite par la PE (59). Enfin, en 2003, l'équipe de Ritchie et al. a montré que l'ANF pouvait antagoniser les effets hypertrophiques de l'AngII sur des cardiomyocytes adultes de rat en culture primaire (60).

2.3. Le GMP cyclique

Le GMP cyclique (GMPc) est un messager secondaire ubiquitaire. Les enzymes qui catalysent la formation de GMPc sont les guanylate-cyclases, dont il existe deux

classes : les formes solubles et les formes particulières. L'oxyde nitrique (NO) active la guanylate-cyclase soluble située dans le cytoplasme de certaines cellules. Les récepteurs NPR-A et NPR-B des peptides natriurétiques auriculaires sont des exemples des formes particulières (61). Le domaine catalytique de la guanylate-cyclase qu'ils possèdent dans leur région intracellulaire relie les peptides natriurétiques à la cascade de signalisation du GMPc (43).

2.3.1. Les mécanismes d'action du GMPc

Une majorité des études concernant le mécanisme d'action du GMPc a été faite dans des cellules musculaires lisses. Dans ces cellules, il semble que le GMPc ait trois cibles intracellulaires principales: des protéines kinases dépendantes de GMPc, des phosphodiésthérases et des canaux ioniques (61;62). Dans ces cellules, le GMPc induit la relaxation via la phosphorylation de plusieurs molécules, incluant le récepteur de l'IP3 et le phospholamban. Cette phosphorylation a pour effet d'inhiber la libération de Ca^{2+} ou d'augmenter sa séquestration dans la cellule, ce qui résulte en une relaxation de cette dernière (63;64). D'autre part, dans les cardiomyocytes, le GMPc peut avoir plusieurs autres actions telles que celles de: 1) diminuer la contractilité (65;66), 2) réduire la consommation d'oxygène (67), 3) inhiber l'échange Na^+/H^+ (65), 4) diminuer l'utilisation de glucose (68;69) et 5) diminuer l'activité des canaux calciques du type L (70;71).

2.3.2. Le GMPc et l'hypertrophie cardiaque

En utilisant divers types de cardiomyocytes en culture, il a été démontré que :

- 1) Le GMPc atténue l'effet hypertrophique de la NE sur les cardiomyocytes néonataux de rat (52;72).
- 2) L'addition de 8-Bromo-GMPc (un analogue du GMPc) peut atténuer l'effet hypertrophique de l'angiotensine sur les cardiomyocytes adultes de rat (60).
- 3) Une protéine kinase dépendante du GMPc (PKG1) inhibe la voie hypertrophique calcineurine-NFAT (par un effet très en amont de cette voie) (73).

Ces données montrent que le GMPc peut (du moins *in vitro*) antagoniser les effets hypertrophiques de diverses hormones sur les cardiomyocytes. Les travaux effectués dans le laboratoire d'accueil ont confirmé le rôle protecteur du GMPc *in vivo*. Des souris transgéniques qui expriment spécifiquement dans le cœur le domaine actif de la guanylate cyclase ont été faites au laboratoire. Il a été montré que ces souris sont protégées contre l'hypertrophie induite soit par l'isoprotérénol, soit par une constriction aortique abdominale (74).

Prises dans leur ensemble, ces études montrent que l'ANF et son messager secondaire (le GMPc) jouent un rôle anti-hypertrophique dans le cœur. Il existe plusieurs possibilités pouvant expliquer cet effet. Cependant, comme il a été démontré que le GMPc peut inhiber la synthèse protéique induite par la NE, il se peut qu'une partie des effets anti-hypertrophiques du GMPc s'exerce via la régulation de la synthèse protéique.

3. Synthèse protéique

Dans le cœur adulte, les cardiomyocytes sont (pour la plupart) différenciés de façon terminale et ont perdu leur capacité à proliférer. La réponse du cardiomyocyte adulte à un agent hypertrophique représente donc un cas typique d'hypertrophie, où le contenu en protéines augmente en absence de division cellulaire (75).

3.1. Généralités sur la synthèse protéique

Les protéines constituent plus de la moitié de la masse d'une cellule et elles sont les molécules les plus actives de la machinerie cellulaire puisqu'elles sont responsables de la plus grande partie de l'activité biologique. Leur synthèse est nécessaire pour l'homéostasie, la division et la différenciation cellulaire (76).

L'ordre linéaire des acides aminés dans chaque protéine détermine leur fonction. Trois sortes de molécules d'ARN exerçant des rôles différents coopèrent pour aboutir à l'alignement et au montage des acides aminés. L'ARN messager (ARNm) code l'information génétique copiée à partir de l'ADN. L'ARN de transfert (ARNt) permet la

traduction des codons de l'ARNm en acides aminés correspondants. L'ARN ribosomique (ARNr) se combine avec plusieurs protéines différentes pour former les ribosomes, structures possédant des sites de liaison pour toutes les molécules qui interviennent de façon essentielle dans les réactions requises par la synthèse des protéines (77). Les ribosomes, avec leurs protéines spécifiques, et les ARNt qui y sont attachés peuvent physiquement se déplacer le long d'une chaîne d'ARNm pour traduire son information génétique codée. L'extrémité 5' des ARNm eucaryotes est un segment biochimiquement modifié que reconnaissent les protéines qui interviennent dans la liaison aux ribosomes. Cette structure est nommée structure en « capuchon » (5' Cap) (78). La traduction de l'ARNm en protéine est composée de trois étapes : L'initiation, l'élongation et la terminaison, chacune d'elles faisant intervenir des réactions biochimiques distinctes et importantes (76;77). Au total, ces étapes font intervenir plus de 200 molécules dont les ribosomes, les ARNt, les ARNm et des protéines appelées facteurs de traduction. L'initiation est l'étape qui a été plus étudiée. Cette étape nécessite la présence de la structure en capuchon sur l'ARNm qui constitue un site spécifique pour le recrutement de facteurs d'initiation de la traduction qui contrôlent la formation du complexe d'initiation (78).

3.2. Les déterminants du taux de la synthèse protéique

Le taux de la synthèse protéique est déterminé par 2 facteurs : d'une part, l'efficacité de la synthèse protéique qui correspond au nombre de chaînes peptidiques naissantes qu'un ribosome peut synthétiser et d'autre part, la capacité de la synthèse qui correspond à l'abondance relative des ribosomes (75;79).

3.2.1. L'efficacité de la synthèse protéique

L'efficacité de la synthèse protéique est régulée principalement au niveau de l'initiation de la traduction, c'est à dire lors de la formation du complexe d'initiation (80). Chez les eucaryotes, le facteur d'initiation eIF4E reconnaît la modification apportée à l'extrémité 5' de l'ARNm (81). Dans le cas où la demande de la synthèse protéique serait faible,

eIF4E est séquestré par une famille de protéine nommée *eucaryotic initiation 4E binding protein* (4E-BP), ce qui empêche ainsi le recrutement de eIF4G et par conséquent la formation du complexe eIF4F nécessaire à la traduction. La protéine 4E-BP devient phosphorylée en réponse à plusieurs facteurs de croissance, ce qui empêche sa liaison à eIF4E et ainsi le complexe eIF4F peut se former (82).

Dans le cœur le mécanisme moléculaire de la régulation de l'initiation de la traduction est mal connu bien qu'il semble que des voies sensibles à PI3-K sont impliquées dans cette régulation (75).

3.2.2. La capacité de la synthèse protéique

La capacité de la synthèse protéique est déterminée par la régulation de la synthèse des protéines de la machinerie de la traduction, telles que les protéines ribosomales et les facteurs de traduction. Les ARNm qui codent pour ces protéines montrent une structure spécifique: une extrémité d'oligonucléotides riche en pyrimidine qui juxtapose l'extrémité 5'-cap. Cette structure désignée TOP (*terminal oligopyrimidine*), confère une traduction sélective de ces messagers en réponse à une variété de stimuli (83-86). Il existe une grande corrélation entre la sur-expression de TOP ARNm et l'état de phosphorylation de la phosphoprotéine ribosomale S6. En effet, quand celle-ci est phosphorylée, elle recrute au ribosome les ARNm qui codent pour les protéines de la machinerie de la traduction (81). La phosphorylation de la protéine S6 est elle-même régulée par la kinase de la protéine ribosomale S6 (S6K1) (76;87-89).

Dans le cœur l'abondance de ribosomes augmente clairement durant l'hypertrophie (90-92), ce qui indique que la protéine S6K1 joue un rôle très important dans le phénomène d'hypertrophie cardiaque.

3.3. La kinase de la protéine ribosomale S6

3.3.1. Les isoformes de S6K1

La protéine S6K1 existe sous deux isoformes : l'isoforme p70 et l'isoforme p85. Ces isoformes sont exprimés à partir du même messenger et diffèrent seulement par 23 acides aminés à l'extrémité N-terminale de l'isoforme p85; Ces acides aminés jouent le rôle d'un signal de localisation nucléaire. Ainsi, l'isoforme p85 se trouve souvent dans le noyau et l'isoforme p70 dans le cytoplasme (93). Les deux isoformes peuvent phosphoryler la protéine ribosomale S6 et stimuler la biogenèse des composants de la machinerie de la traduction tels que les protéines ribosomales et les facteurs d'élongation (94;95). Des études récentes faites sur des souris KO pour le gène qui code pour la protéine S6K1 ont démontré que l'inactivation de ce gène ne change ni l'état de phosphorylation de la protéine ribosomale S6, ni la traduction des ARNm à extrémité 5'-TOP, mais ces animaux présentent le phénotype d'être de petite taille. Ces études ont mené à la découverte d'une autre kinase de la protéine ribosomale S6 qui est la protéine S6K2. La protéine S6K2 possède une homologie de 70% avec l'isoforme p70 de S6K1, mais elle se trouve principalement dans le noyau grâce à la présence d'un signal de localisation nucléaire à son extrémité C-terminale (93;96-98).

3.3.2. Les sites de phosphorylation de S6K1

La protéine S6K1 est constituée de cinq domaines : le domaine N-terminal, le domaine catalytique, le domaine hydrophobique (*linker*), le domaine auto-inhibiteur et le domaine C-terminal (Figure 2). Plusieurs sites de phosphorylation sont nécessaires pour l'activation de cette kinase. En se basant sur leur sensibilité à la rapamycine (une drogue qui inhibe la voie de *mammalian target of rapamycin* (mTOR)), ces sites sont divisés en deux groupes (94;95). Le premier groupe contient les résidus thr229 et ser371 dans le domaine catalytique et les résidus thr389 et ser404 dans le domaine hydrophobique. La phosphorylation de ces résidus est sensible à la rapamycine. Le résidu Thr389 se trouve immédiatement à l'extrémité C-terminale du domaine catalytique et sa phosphorylation semble très importante pour la phosphorylation du résidu thr229 et l'augmentation de l'activité kinase de la protéine. D'autre part, le résidu thr229 est présent dans la boucle d'activation du domaine catalytique et il est phosphorylé par la kinase dépendante de phosphoinositide, *phosphoinositide dependent kinase* (PDK1) (Figure 2). Le deuxième

groupe comporte les 4 résidus du domaine auto-inhibiteur : ser411, ser418, thr421 et ser424. La phosphorylation de ces sites peut être, dans certains cas, indépendante de la rapamycine (Figure 2). Ces sites de phosphorylation contiennent la séquence consensus « ser/thr-pro », ce qui semble indiquer qu'ils peuvent être phosphorylés par des kinases qui phosphorylent les résidus sérine ou thréonine qui précèdent un résidu proline (*proline-directed protein kinases*) comme les MAPKs (96;99;100).

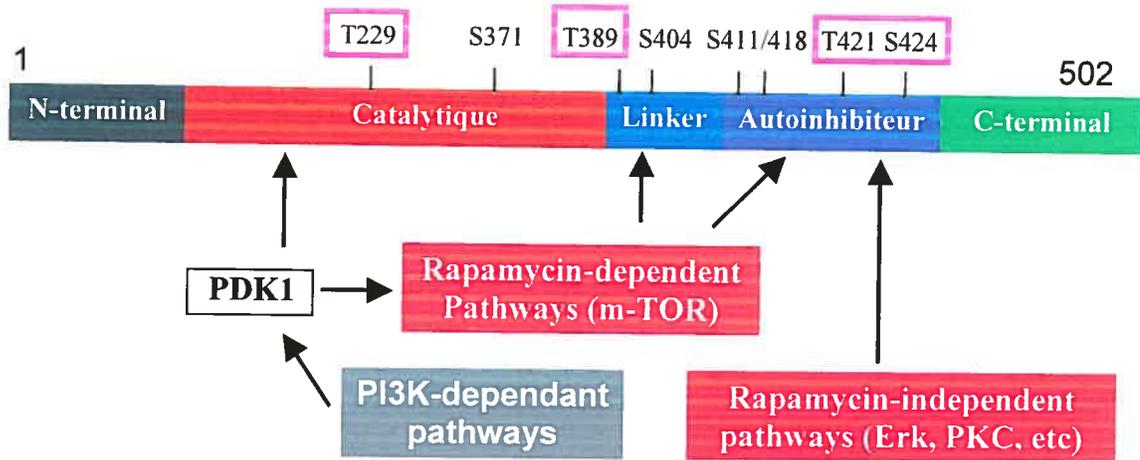


Figure 2 : Les sites de phosphorylation de S6K1. T229 est phosphorylé par PDK1, la phosphorylation du résidu T389 est rapamycine-dépendante et la phosphorylation de résidus T421/S424 peut être rapamycine dépendante ou bien rapamycine-indépendante (101;102).

3.3.3. Modèle d'activation de S6K1

L'activation de S6K1 semble se faire en plusieurs étapes, montrant des phosphorylations séquentielles de sites importantes. Un des modèles proposés est le suivant : une première étape dépendante de calcium serait nécessaire pour libérer l'interaction entre le domaine auto-inhibiteur et l'extrémité N-terminale, ce qui faciliterait ensuite la phosphorylation des 4 résidus du domaine auto-inhibiteur par des kinases dont l'identité exacte n'est pas connue. L'étape suivante impliquerait la phosphorylation des résidus thr389 et ser371 via une voie sensible à la rapamycine, ce qui permettrait enfin la phosphorylation de thr229 par PDK1 (Figure3) (103-105).

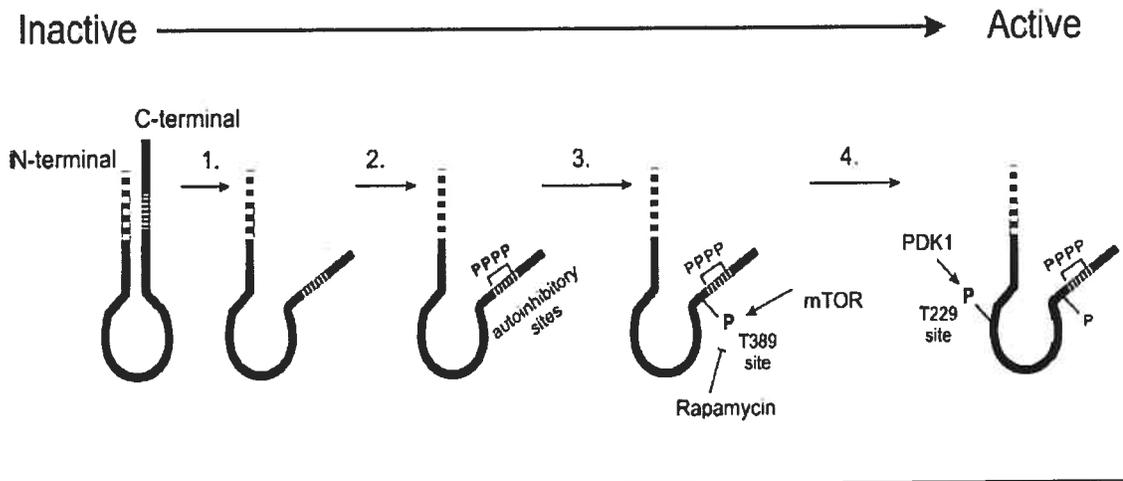


Figure 3 : Modèle d'activation de S6K1. Ce modèle propose une phosphorylation séquentielle de S6K1 : 1) la libération de l'interaction entre le domaine auto-inhibiteur et l'extrémité N-terminale, 2) la phosphorylation des 4 résidus du domaine auto-inhibiteur, 3) la phosphorylation rapamycine-dépendante du résidu thr389 et 4) la phosphorylation du résidu thr229 par PDK1 (103).

3.4. Les principaux régulateurs de la synthèse protéique

En général, plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la régulation de la synthèse protéique. Ces voies peuvent contrôler la traduction principalement via la régulation des activités des kinases de protéines ribosomales ainsi que des facteurs de traduction. Les principaux régulateurs de la synthèse protéique sont : la kinase de la protéine ribosomale (S6K1), le facteur d'élongation (eEF2) et les deux facteurs d'initiation (eIF2B et eIF4E). Ces régulateurs sont activés ou inhibés, en amont, par des molécules telles que les MAPKs, mTOR, PKB, PDK1, 4E-BP, GSK-3 et autres (75) (Figure 4).

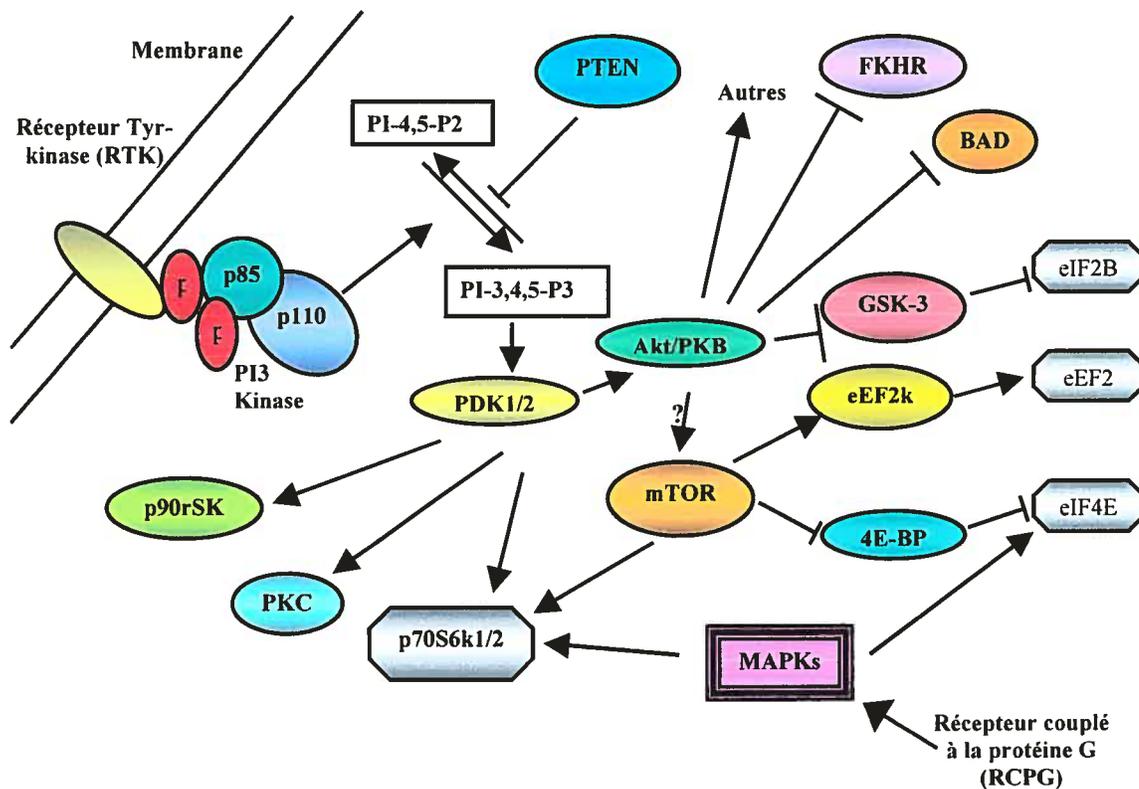


Figure 4 : Les principaux régulateurs de la synthèse protéique (en gris). En général, l'activation d'un récepteur tel que le récepteur doué d'activité de tyrosine kinase ou le récepteur couplé à la protéine G met en action plusieurs molécules qui peuvent affecter positivement ou négativement les régulateurs de la synthèse protéique. Ces molécules incluent les MAPKs, mTOR, PKB, PDK1, 4E-BP, GSK-3 et autres.

4. Les voies de signalisation qui régulent l'hypertrophie cardiaque

Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la transduction des signaux hypertrophiques de stimuli mécaniques et/ou hormonaux, incluant les récepteurs couplés aux protéines G, les GTPases à faible poids moléculaire (Ras, RhoA, Rac), les MAPKs, les PKCs, la voie de calcineurine-NFAT, les cytokines et JAK-STAT et plusieurs facteurs de croissance (IGF, TGF β , FGF) (106-108). Les mécanismes d'action de ces diverses voies de signalisation sont résumés ci-dessous.

4.1. Les récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) comportent sept passages transmembranaires. La liaison du ligand au récepteur met en action une protéine G de transduction de signal, qui, à son tour active ou inhibe un enzyme effecteur, producteur d'un messager second intracellulaire (109;110). Le transducteur protéique G tient le rôle d'interrupteur moléculaire, en position d'arrêt quand il est occupé par GDP. La liaison du ligand au récepteur force la protéine G à libérer son GDP pour fixer du GTP, ce qui met la protéine interruptrice en position de marche. Une fois chargée de GTP, la protéine G activée va se fixer à un enzyme effecteur qui produira le messager second (Figure 5). L'hydrolyse du GTP fixé à la protéine remet cette dernière à l'état inactif (position d'arrêt) (109).

Les protéines G sont formées de trois protomères : α , β et γ . La fixation d'hormone ou d'agoniste au récepteur enclenche la liaison du dernier à la protéine G trimérique de telle sorte que GDP lié est chassé de G_α et remplacé par GTP. Une fois que le complexe G_α .GTP est formé, il se sépare du complexe $G_{\beta\gamma}$. Ces deux complexes peuvent ainsi moduler en aval l'activité des effecteurs différents (Figure 5) (111;112).

Le protomère G_α possède une activité GTPase intrinsèque qui hydrolyse le GTP en GDP. Le complexe G_α .GDP a une affinité très grande pour $G_{\beta\gamma}$ et leur association termine la transduction du signal via un RCPG (113). L'activité GTPase du protomère G_α peut être stimulée par des phosphodiésterases ou la phospholipase C. Récemment d'autres régulateurs de protéines G ont été isolés et ont montré une capacité à stimuler l'activité GTPase de G_α . Ces protéines sont les RGS (*regulator of G protein signaling*), dont la translocation vers la membrane cytoplasmique est nécessaire pour inactiver les protéines G. Chez les eucaryotes, 20 protéines RGS ont été identifiées; ces protéines montrent une certaine spécificité de fonction de telle sorte que des RGS différentes se lient préférentiellement à différentes sous-unités G_α (113).

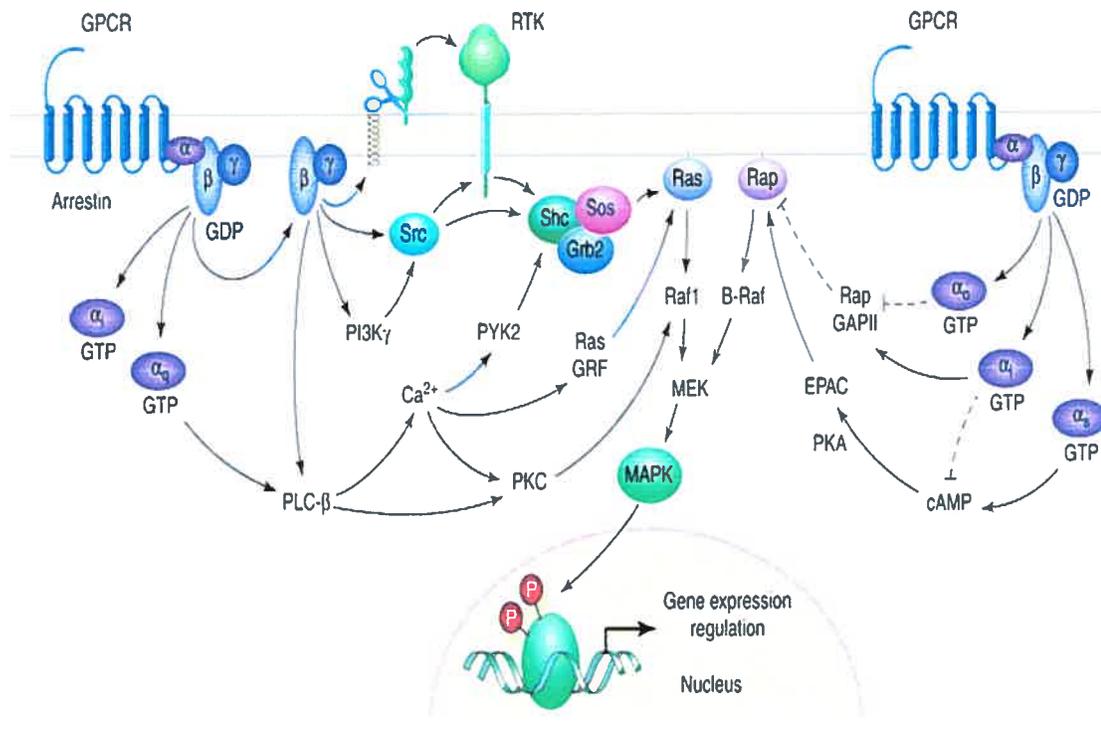


Figure 5 : La voie de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G. La fixation du ligand au récepteur catalyse l'échange du GDP en GTP sur le protomère $G\alpha$ de la protéine G et ainsi la dissociation entre les deux complexes $G\alpha.GTP$ et $G\beta\gamma$. Plusieurs effecteurs en aval sont activés dépendamment de la protéine G en action. La phospholipase C (PLC) est activée par $G\alpha_q$; L'adénylate cyclase, l'enzyme qui catalyse la synthèse de l'AMPc, est activée par $G\alpha_s$ et inhibée par $G\alpha_i$. De plus, $G\beta\gamma$ peut activer la voie de signalisation des MAPKs, de Ras et de PI3-K (124).

Dans le système cardiovasculaire on peut citer trois classes fonctionnelles principales de récepteurs couplés aux protéines G :

- 1) Les récepteurs β -adrénergiques (comme le récepteur de l'isoproterenol) qui sont couplés à la protéine G_{α_s} .
- 2) Les récepteurs cholinergiques (comme le récepteur de l'acétylcholine) qui sont couplés à la protéine G_{α_i} .
- 3) Les récepteurs qui sont couplés à la protéine G_{α_q} incluant les récepteurs α -adrénergiques (comme le récepteur de la phényléphrine (PE) et de la NE), le récepteur de l'AngII et celui de l'Et (109;110).

Malgré le fait que plusieurs protéines G aient été identifiées dans le coeur, plusieurs études semblent montrer que $G_{\alpha q}$ jouerait un rôle prédominant (114;115). *In vitro*, les premières études faites par Simpson et al. pour comprendre le rôle des protéines G ont indiqué que la NE ($G_{\alpha q}$), mais pas l'isoproterenol ($G_{\alpha s}$), induit une augmentation de la taille des cardiomyocytes. Dans ce modèle, une hypertrophie a également été démontré suite à l'administration de PE, AngII et Et-1 (116;117). D'autres études ont observé que la sur-expression de la forme active de la sous-unité $G_{\alpha q}$ dans les cardiomyocytes induit l'hypertrophie. A l'inverse, l'inhibition de cette sous-unité peut prévenir l'hypertrophie médiée par les récepteurs α -adrénergiques (118;119). *In vivo*, plusieurs études ont démontré que des souris transgéniques qui sur-expriment $G_{\alpha q}$ possèdent un phénotype d'hypertrophie similaire à l'hypertrophie induite par une constriction aortique (120;121). A l'inverse, Akhter et al. ont rapporté que la sur-expression d'un dominant négatif du peptide $G_{\alpha q}$ dans le cœur des souris transgéniques rend ces souris plus résistantes à l'hypertrophie induite par une constriction aortique (122). D'autres évidences ont été obtenues à l'aide d'autres modèles de souris transgéniques. Ainsi, la sur-expression de RGS4 (dont l'action consiste à inactiver la protéine $G_{\alpha q}$) spécifiquement dans le cœur a pour effet de réduire l'hypertrophie induite par une constriction aortique (123). Prises dans leur ensemble, ces études montrent l'importance dans la réponse hypertrophique des signaux transmis par le biais de la protéine $G_{\alpha q}$.

4.2. Le facteur de croissance IGF-1

Le facteur de croissance IGF-1 est un peptide qui se lie à un récepteur spécifique doué d'activité de tyrosine kinase (RTK) (125). Les RTKs forment une vaste et importante catégorie de récepteurs cellulaires dont les ligands sont des hormones peptidiques ou protéiques solubles ou membranaires, comme l'insuline ou le facteur de croissance épithélial (75;106). La liaison du ligand aux récepteurs entraîne la dimérisation de ces derniers ainsi que la phosphorylation des résidus tyrosine de leurs propres domaines cytosoliques. Certaines tyrosines phosphorylées de ces RTKs se lient à diverses protéines pourvues de domaines SH2, qui sont soit des enzymes jouant un rôle dans la transmission des signaux (comme la phospholipase C), soit des adaptateurs protéiques

comme GRB2 qui servent de lien physique entre le récepteur et d'autres protéines de signalisation (106). Dans le cas particulier du récepteur de l'IGF-1, il phosphoryle un polypeptide nommé IRS1 qui s'attache au domaine SH2 de plusieurs protéines, dont notamment la PI3-kinase (75).

Il existe 4 types différents de PI3-K; Les isoformes α , β et δ activés par la voie des récepteurs doués d'une activité tyrosine kinase, et l'isoforme γ qui peut être activé par les récepteurs couplés aux protéines G (126;127). La voie PI3-K joue un rôle critique dans la détermination de la taille des cellules, des organes et du corps. Cette voie est inhibée, en aval de PI3-K, par la rapamycine (128).

La rapamycine est un macrolide lipophile qui a été identifié comme un fongicide isolé à partir de la bactérie *streptomyces hygroscopicus* (129). En cherchant les molécules qui peuvent être affectées par la rapamycine, la molécule nommée *target of rapamycin* (TOR) a été identifiée chez la levure (82). Des études de purification et de clonage chez les mammifères ont mis en évidence une protéine de 290-kDa qui joue le même rôle que TOR, d'où son nom *mammalian TOR* (mTOR). La rapamycine peut affecter la croissance cellulaire en formant un complexe inhibiteur avec FKBP12 (FK506-binding protein; MW, 12kDa). Ce complexe se lie avec mTOR et inhibe sa fonction (130;131). En réponse aux facteurs de croissance et aux acides-aminés, mTOR peut réguler la machinerie de la traduction via l'activation de la kinase de la protéine ribosomale S6 (S6K1) et via l'inhibition de l'inhibiteur du facteur d'initiation eIF4E (4E-BP1) (Figure 6) (129).

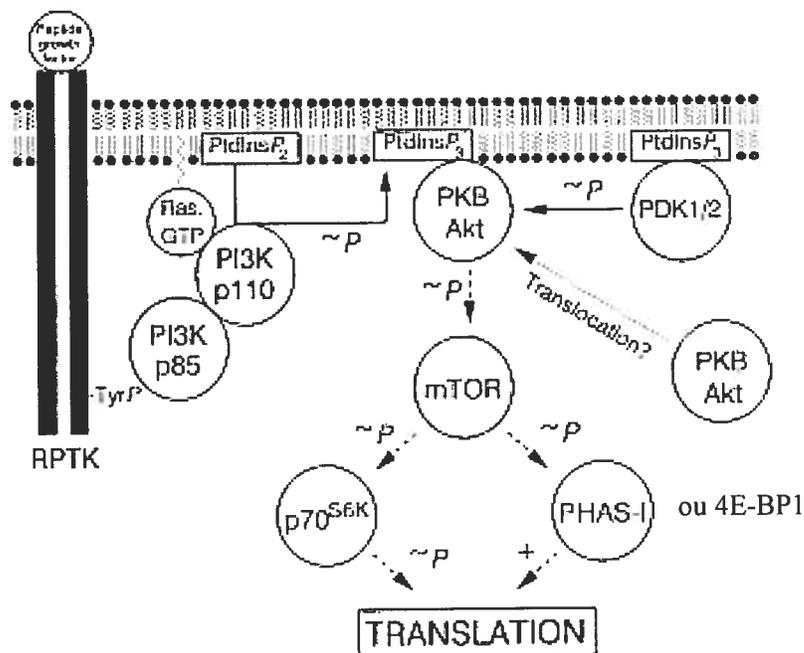


Figure 6 : La voie de PI3-K. La liaison de facteurs de croissances peptidiques à leurs récepteurs (RPTKs) induit une autophosphorylation des résidus tyr dans leurs domaines intracellulaires. La sous-unité régulatrice (p85) de PI3-K se lie aux résidus tyrosines phosphorylés ce qui active la sous-unité catalytique (p110) de PI3-K. A son tour, PI3-K phosphoryle (~P) le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PtdInsP₂) en phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PtdInsP₃). Cette phosphorylation induit la translocation de PKB (Akt) vers la membrane cytoplasmique et sa phosphorylation par PDK1/2. L'activation de PKB mène à la phosphorylation de p70S6K et PHAS-1(4E-BP1) et ainsi la traduction des protéines via une voie qui implique mTOR. Les étapes de la transmission du signal de PKB jusqu'à la traduction ne sont pas très claires (pointillé) (75).

De nombreuses études ont montré que les effecteurs en aval de l'IGF sont impliqués dans l'hypertrophie cardiaque. Ainsi, la sur-expression de la forme active de la sous-unité catalytique de PI3K dans des souris transgéniques entraîne une hypertrophie cardiaque, tandis que la sur-expression d'un dominant négatif de cette même protéine montre des souris qui développent des petits coeurs (132). De plus, la stimulation de la protéine S6K1 par l'insuline est nécessaire pour l'induction d'une réponse hypertrophique (133). L'inhibition de cette même protéine par la rapamycine bloque l'augmentation de la synthèse protéique et la croissance des cellules en culture en

présence d'un agoniste (133-135). Enfin, Shioi et al ont montré que l'administration de la rapamycine à des souris qui ont subi une constriction aortique inhibe complètement la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 ainsi que l'activité de S6K1, et atténue l'augmentation de la taille des cellules (129).

Prise dans leur ensemble, ces études indiquent que la voie de signalisation IGF-PI3K-mTOR-S6K1 joue un rôle très important dans la régulation de l'hypertrophie cardiaque.

4.3. Les GTPases à faible poids moléculaire

Les GTPases sont de petites molécules dont le poids moléculaire est environ de 21kDa. Dans leur forme inactive, elles se trouvent liées à une molécule de GDP. L'activation d'une GTPase implique sa conversion en une forme pourvue de GTP. Les formes mutantes de ces protéines sont utilisées pour investiguer leur rôle dans les processus cellulaires (136).

Les GTPases sont divisées en 5 familles : Ras, Rho, ARF, Rab et Ran. Ras et Rho sont les deux familles les plus étudiées dans le cœur. La famille Ras comporte Ras, Rap et Ral. La famille Rho comporte RhoA, Rac1 et Cdc42 (75;136). Les GTPases peuvent être activées par plusieurs variétés de stimuli. A titre d'exemple, la figure 7 décrit la voie de signalisation de Ras.

La plupart des études semblent indiquer que Ras, Rac et, de façon plus limitée, RhoA sont des molécules prohypertrophiques (106). Ces études ont utilisé la méthode du transfert d'un gène médié par un adénovirus pour étudier l'implication de ces molécules dans le phénomène d'hypertrophie. Autrement dit, ils ont exprimé dans des cardiomyocytes soit une protéine mutante active de façon constitutive, soit une protéine mutante qui joue le rôle d'un dominant négatif pour la protéine en question (106;137;138). Ainsi, l'expression dans les cardiomyocytes d'un dominant négatif de Ras (17N Ras) inhibe l'effet de la PE sur la synthèse protéique (137). L'expression de N17Rac1 atténue également l'hypertrophie observée lors de l'addition de la PE sur des cardiomyocytes en culture (138).

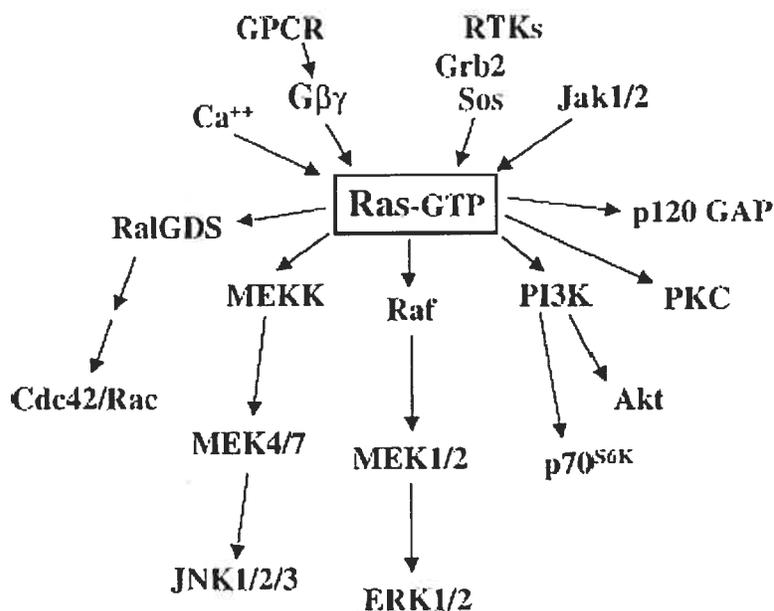


Figure 7: La voie de signalisation de Ras. Dans les cardiomyocytes, Ras peut être activé par des récepteurs couplés à la protéine G (GPCR) et des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). Une fois active, Ras peut activer à son tour plusieurs effecteurs en aval dont JNK, ERK, p70S6K, PKC, PI3-K et autres.(106).

4.4. Les MAPKs

Les *Mitogen activated protein kinase* (MAPKs) sont le point de convergence de nombreux signaux cellulaires initiés à la membrane. Ces protéines sont régulées par une cascade de phosphorylation comportant 3 niveaux (MAPK, MAPKK, MAPKKK). Cette cascade de kinases mène à l'activation de trois sous-groupes de MAPKinases, ERK (*Extracellular-signal-Regulated Kinase*), p38 et JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*). Les activateurs en amont de ERK sont principalement MEK1 et MEK2 qui phosphorylent directement le site (Thr-Glu-Tyr) conservé dans tous les isoformes de ERK. MEK1 et 2 sont eux-mêmes activés par Raf-1, A-Raf, B-Raf et MEKK1-4. Les activateurs en amont de p38 sont MEK3 et MEK6 dont l'activation semble être faite par PAK, TAK1 et MLK3. Enfin, JNK est phosphorylée par MEK4 et MEK7 qui sont eux-mêmes activées par MEKK1 et MEKK2 (Figure 8) (106).

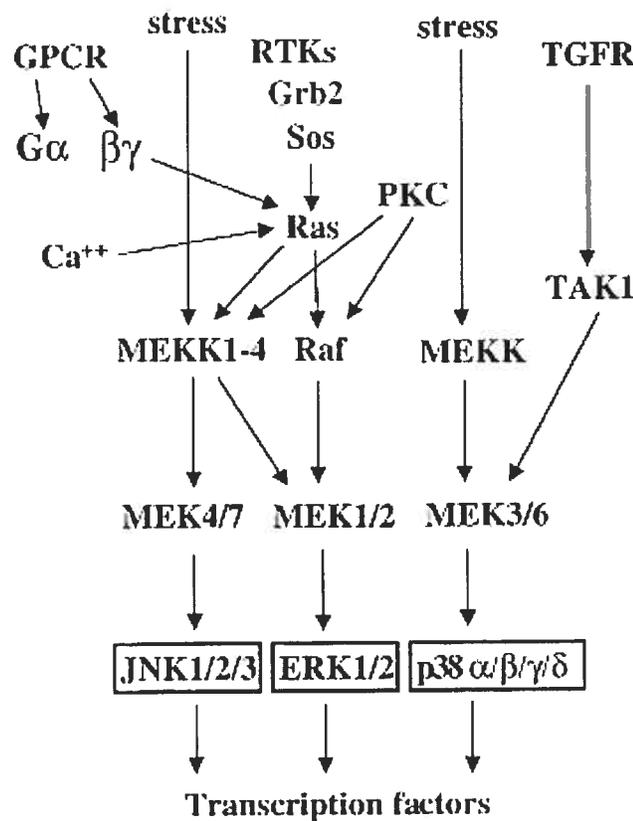


Figure 8: La voie de signalisation des MAPKs. Dans les cardiomyocytes, cette voie est activée par les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), le récepteur du facteur de croissance TGF (TGFR), les protéines kinases C (PKCs), le calcium ou le stress (106).

Plusieurs études ont testé l'hypothèse que les MAPKs étaient impliquées dans le phénomène d'hypertrophie cardiaque. Les diverses approches utilisées ont inclus la transfection des cardiomyocytes avec des MAPK-phosphatases (protéines qui déphosphorylent et inactivent les MAPKs), la transfection des cellules avec des dominants-négatifs pour les composants de la voie des MAPKs et l'utilisation des oligonucléotides anti-sens (139;140). D'abord pour ERK, la plupart des études ont montré que l'activation de cette kinase est nécessaire pour avoir une réponse hypertrophique. En utilisant des oligonucléotides anti-sens, Glennon et al. ont montré que ERK est nécessaire pour l'induction d'une réponse hypertrophique après l'ajout de la PE sur des cardiomyocytes en culture (141). De plus, en utilisant un inhibiteur de MEK1 (PD98059), Clerk et al. ont rapporté que ERK est requis dans le processus

d'hypertrophie (142). Par contre, le groupe de Thorburn et al. ont suggéré un rôle anti-hypertrophique de ERK dans le coeur. Ainsi, ce groupe a montré que l'activation de la voie de Ras-Raf-1-ERK est requise pour augmenter l'activité des promoteurs de c-fos et de l'ANF dans des cardiomyocytes (143-145). Une seule étude a montré que l'activation de ERK suite à un traitement avec l'ANF est un mécanisme de protection contre l'hypertrophie (72). En effet, cette étude a montré que : 1) le traitement des cardiomyocytes néonataux avec l'ANF induit une activation de ERK1/2 et 2) cette activation est requise pour observer l'effet inhibiteur de l'ANF sur les changements morphologiques (de la cellule) induits par la PE (72).

Deuxièmement, concernant p38, la plupart des études ont montré que l'inhibition de l'activité de cette protéine, soit par un inhibiteur pharmacologique (142;146;147) soit par transfert d'un dominant négatif de p38 (148) dans les cardiomyocytes peut inhiber l'hypertrophie de ces cellules. Par contre, deux autres études ont indiqué que l'inhibition de p38 n'est pas suffisante pour atténuer l'hypertrophie des cardiomyocytes induite par un agoniste (149;150). Il semble donc que p38 soit une protéine prohypertrophique, mais que son activation seule ne soit pas suffisante pour induire le processus.

Enfin, plusieurs études ont montré que JNK est un régulateur positif de l'hypertrophie cardiaque tant *in vivo* que *in vitro* (106;146;151). Par contre, deux études ont montré que l'expression de MEKK1, activateur en amont de JNK, dans les cardiomyocytes est requise pour l'activité du promoteur de l'ANF (145;152) et atténue l'effet de la PE sur l'organisation de sarcomères (145).

Pour résumer, il est difficile de tirer une conclusion concernant le rôle des MAPKs durant le processus d'HVG, puisque les études démontrent des effets tant pro-hypertrophiques qu'anti-hypertrophiques.

4.5. Les protéines kinases C

Les protéines kinases C sont des protéines ubiquitaires qui se lient aux lipides, et qui sont douées d'une activité sérine-thréonine kinase (153). La famille PKC consiste en plus de 10 isoformes codés par différents gènes. Ces isoformes se différencient par leur

distribution tissulaire et leur mode d'activation (40;75). En se basant sur leurs propriétés enzymatiques, les isoformes de PKC peuvent être classés en trois groupes :

- 1) Les PKCs classiques ou conventionnelles (cPKC) sont activées par le calcium et le diacyl-glycérol. Ce groupe comporte les isoformes α , β I, β II et γ .
- 2) Les nouvelles PKCs (nPKC) sont activées par le diacyl-glycérol et sont indépendantes de calcium. Ce groupe comporte les isoformes δ , ϵ , η et θ .
- 3) Les PKCs atypiques (aPKC) ne dépendent ni du calcium ni du diacyl-glycérol. Ce groupe comporte les isoformes ξ , λ et ι .

La translocation de ces isoformes vers différents sites de la cellule est un indice de leur activation. Dans son état non stimulé, une protéine kinase C existe en une conformation où le site de liaison du substrat est caché, ce qui rend l'enzyme inactive. Une fois stimulée avec le calcium ou le diacyl-glycérol (dépendamment de l'isoforme de PKC), la protéine change de conformation et expose le site de liaison du substrat qui facilite son activation (154;155).

L'hétérogénéité de l'expression des isoformes de PKCs et les variétés dans leur mode d'activation et de régulation ont rendu très compliquée la définition d'un rôle précis de ces protéines dans le cœur. Par ailleurs, les études ont démontré que la stimulation du récepteur α -adrénergique dans des cardiomyocytes en culture est accompagnée d'une translocation de PKC β 1 du cytosol vers le noyau, de PKC ϵ du cytosol et du noyau vers les myofibrilles et de PKC δ vers la région périnucléaire (154;156).

4.6. La voie calcineurine-NFAT

La calcineurine est une protéine qui possède une activité sérine-thréonine phosphatase. Elle est activée uniquement par la liaison du calcium à la calmoduline. La calcineurine consiste en une sous-unité catalytique de 59 à 61 kDa nommée calcineurine A et une autre sous-unité de 19 kDa qui lie le calcium. La sous-unité catalytique est codée par trois gènes, calcineurine A α , calcineurine A β et calcineurine A γ (157).

La calcineurine peut déphosphoryler plusieurs cibles qui influencent la croissance cellulaire. Entre autres, les facteurs de transcription dépendants du calcium, *Nuclear*

factor of activated T-cells (NFAT) sont régulés par la calcineurine (158). La protéine NFAT comporte un domaine régulateur à son extrémité N-terminale qui contrôle son transport vers le noyau. Dans les cellules non stimulées, ce domaine est phosphorylé, ce qui masque la séquence de localisation nucléaire séquestrant ainsi la protéine dans le cytoplasme (158). Une fois activée, la calcineurine déphosphoryle dans le cytoplasme certains membres de la famille de facteurs de transcription NFAT. Cette déphosphorylation induit la translocation de NFAT dans le noyau et l'activation de la transcription des gènes impliqués dans la réponse hypertrophique. Le mécanisme exact de cette activation n'est pas bien connu. Deux drogues immunosuppressives, la cyclosporine A et FK506, inhibent la calcineurine, prévenant ainsi la translocation de NFAT vers le noyau (157).

Parmi les voies de signalisation dépendantes du calcium qui sont impliquées dans l'hypertrophie cardiaque, la calcineurine est connue comme l'activateur le plus puissant qui peut induire une HVG à la fois *in vivo* et *in vitro* (158;159). Plusieurs études ont démontré que l'activation de la calcineurine est requise pour induire une hypertrophie, étant donné que la cyclosporine A et la FK-506 inhibent l'induction de l'hypertrophie en réponse à des stimuli mécaniques ou hormonaux (158-160). Récemment, plusieurs études ont montré que l'inactivation de NFAT par inhibition de leur accumulation nucléaire peut prévenir l'hypertrophie cardiaque. De ce point de vue, la protéine GSK-3, une protéine ubiquitaire douée d'une activité sérine/threonine kinase, peut phosphoryler le domaine régulateur de NFAT, inhibant ainsi leur transport nucléaire (160). Contrairement à d'autres kinases, GSK-3 est active dans les cellules non stimulées et devient inactive en réponse à des stimuli hypertrophiques. L'activité de cette protéine est régulée par sa phosphorylation au résidu sérine-9. Cette phosphorylation inhibe l'activité de GSK-3 (158). En effet, en utilisant la méthode du transfert d'un gène médié par un adénovirus, Haq et al. ont montré que l'expression dans des cardiomyocytes d'un mutant de GSK-3 β contenant une alanine en position 9, qui empêche l'inactivation de GSK-3 β par des stimuli hypertrophiques, bloque les réponses hypertrophiques induites soit par l'ET soit par la PE (160). Plusieurs kinases impliquées dans le phénomène d'hypertrophie peuvent phosphoryler la protéine GSK-3 en ser-9 inhibant ainsi son

activité. Parmi ces kinases on peut citer : PI3-K, PKB (Akt) et p70S6K (160). Ces observations suggèrent que les effets hypertrophiques de ces kinases puissent être dus, au moins en partie, à l'inhibition de l'activité anti-hypertrophique de GSK-3 (158).

Prises dans leur ensemble, ces données montrent que la voie de la calcineurine-NFAT est un régulateur très puissant de l'hypertrophie cardiaque et l'inactivation de NFAT par inhibition de leur accumulation nucléaire peut prévenir ce processus.

4.7. En aval de la PE

Le paragraphe suivant fait l'inventaire de plusieurs travaux qui discutent des molécules qui peuvent être impliquées dans la réponse hypertrophique en aval de la PE.

La PE se lie sur son récepteur transmembranaire couplé à la protéine Gq. Cette liaison active la phospholipase C qui catalyse l'hydrolyse d'un phospholipide de la membrane plasmique, le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate, en deux messagers seconds : (1) le 1,2 diacylglycérol active la protéine kinase C qui phosphoryle plusieurs protéines importantes régissant la prolifération et le métabolisme cellulaire et (2) l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) se lie à des récepteurs à canal ionique occupant les membranes du réticulum endoplasmique et provoque l'efflux d'ions Ca^{2+} dans le cytosol (162).

La PE est un agent hypertrophique très puissant, tant sur les cardiomyocytes en culture que sur des cœurs perfusés. Cet agoniste peut induire des changements morphologiques (une augmentation de la taille de la cellule et une réorganisation des myofibrilles) ainsi que des changements dans l'expression des gènes (une activation des gènes fœtaux) de la cellule (162;163). L'action de la PE peut être médiée, en aval, par plusieurs molécules dont les PKCs, les MAPKs et les GTPases.

Concernant l'implication des PKCs dans la réponse hypertrophique de la PE, l'étude faite par le groupe de Sugden et al. fut parmi les premières à démontrer l'activation de certaines isoformes de PKC dans des cardiomyocytes. Ce groupe a montré que la PE induit la translocation de PKC δ et de PKC ϵ du cytosol vers la membrane cytoplasmique dans des cardiomyocytes de rats nouveau-nés (164). Ensuite, en utilisant des activateurs spécifiques de différentes voies de signalisation, l'équipe de McDermott et al. a

démontré que l'activation de S6K1 induite par la PE (dans des cardiomyocytes de chat adulte) dépend de la voie de PKC (96). Cette étude n'a pas précisé les isoformes de PKCs impliqués dans l'effet de la PE sur la phosphorylation de S6K1. Récemment, l'équipe de Proud et al. a rapporté que la PE induit la translocation de PKC δ et de PKC ϵ du cytosol vers la membrane cytoplasmique dans des cardiomyocytes de rat adulte. Le plus intéressant dans leur étude était que cette translocation est nécessaire pour observer les effets de la PE sur la synthèse protéique, la phosphorylation de ERK et celle de S6K1 (165). Plusieurs autres études ont également démontré que l'activation de S6K1 par la PE dépend de la voie des PKCs (166-170).

En ce qui a trait aux GTPases, des études ont déjà démontré que : 1) la PE peut activer RhoA et Rac1 dans des cardiomyocytes d'un rat nouveau-né (171); 2) Ras est activé dans les cardiomyocytes stimulés avec la PE et 3) cette activation dépend de PKC (136).

Enfin, plusieurs études visant à étudier l'implication des MAPKs dans la réponse hypertrophique de la PE ont été réalisées. Toutes ces études ont montré que la PE est un activateur de ERK, p38 et JNK (149;172-174). Le groupe de Sugden et al. a démontré que ERK est requis pour induire une réponse hypertrophique (changements morphologiques) par la PE (141). Un autre groupe a rapporté que l'activation de ERK est nécessaire pour induire l'expression de l'ANF suite à une stimulation par la PE (175). Cette induction de l'expression de l'ANF par la PE, dépend plutôt de MEKK que de Raf (152). Finalement, l'équipe de Barron et al. a démontré que la PE peut induire 2 pics d'activation de ERK, un rapide et transitoire après 5 à 10 min d'exposition à la PE et un autre beaucoup plus prolongé après 6h d'exposition. Cette exposition prolongée à la PE est requise pour observer les altérations dans l'expression des gènes, la synthèse des protéines et la taille des cellules qui caractérisent l'hypertrophie, ce qui confirme que le premier pic d'activation de ERK est insuffisant pour une réponse hypertrophique (176).

Concernant la régulation de la synthèse protéique par la PE, les études les plus importantes qui ont été réalisées sont les études faites par le groupe de Proud. En 2002, cette équipe a montré que la voie Ras/ERK est requise pour l'activation de la synthèse protéique et la phosphorylation de S6K1 par la PE (177). D'autre part, en stimulant des cardiomyocytes adultes soit avec l'insuline soit avec la PE, le même groupe a rapporté que : i) mTOR et PI3-K sont requises pour l'activation de S6K2, quelque soit le stimuli; ii) la voie MEK/ERK est nécessaire seulement pour la phosphorylation de S6K2 par la PE et iii) la protéine kinase B est nécessaire seulement pour la phosphorylation de S6K2 par l'insuline (178).

Considérant toutes ces données, la figure 9 résume la régulation de la synthèse protéique soit avec la PE, soit avec l'insuline. En effet, les principaux régulateurs de la synthèse protéique sont : la kinase de la protéine ribosomale (S6K1), le facteur d'élongation (eEF2) et les deux facteurs d'initiation (eIF2B et eIF4E). L'insuline contrôle l'activité de ces régulateurs principalement via la voie PI3-K/PKB/mTOR. D'autre part, la PE peut réguler la synthèse protéique par la même voie que l'insuline ainsi que via les voies mTOR indépendantes. Ces dernières régulent spécifiquement l'activité de S6K1 par la PE. Une fois active, S6K1 phosphoryle la protéine ribosomale S6 qui induit la traduction des ARNm possédant à leurs extrémités 5' la structure TOP. Ces ARNm codent, entres autres, pour les protéines ribosomales augmentant ainsi la capacité de la synthèse protéique.

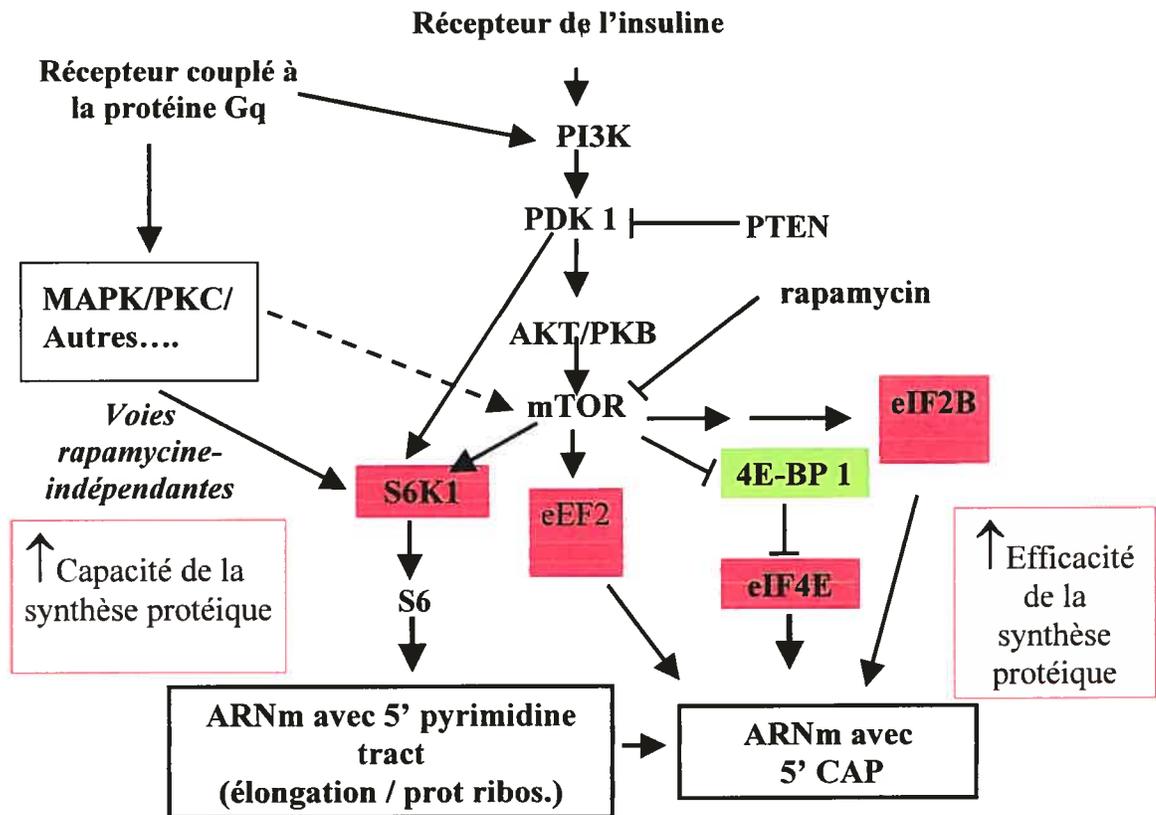


Figure 9 : Régulation de la synthèse protéique par la PE ou par l'insuline. L'insuline contrôle l'activité des principaux régulateurs de la synthèse protéique (en rouge) principalement via la voie PI3K-PDK1-mTOR. En se liant à son récepteur couplé à la protéine Gq, la PE peut réguler la synthèse protéique via deux voies différentes : l'une est mTOR dépendante et l'autre est mTOR-indépendante. La voie m-TOR indépendante que la PE active, régule principalement l'activité de S6K1 et non pas un autre régulateur de la synthèse protéique (179).

5. Culture des cardiomyocytes

Dans le but de déterminer les mécanismes cellulaires de l'hypertrophie cardiaque, des cultures de cardiomyocytes ont été utilisées pour chercher : 1) les déterminants hormonaux ou mécaniques qui augmentent le niveau de la synthèse protéique, 2) les signaux intracellulaires impliqués dans ce processus et 3) les protéines régulées durant le processus d'hypertrophie.

Typiquement, deux variétés de cultures de cardiomyocytes sont utilisées: celles des cellules provenant de rats nouveau-nés et celles provenant de rats adultes. Plusieurs caractéristiques distinguent les cardiomyocytes adultes des cardiomyocytes néonataux (180): 1) la densité des récepteurs couplés à la protéine Gαq diminue avec l'âge de l'animal dont les cardiomyocytes sont issus (181;182); 2) le niveau basal de la synthèse protéique dans les cardiomyocytes adultes est approximativement identique à celui observé *in vivo*, tandis que dans les cellules néonatales, ce niveau est six fois plus élevé par rapport au niveau de la synthèse protéique *in vivo* (164); 3) il existe une différence d'expression d'isoformes de plusieurs protéines entre ces deux types de cellules (183); 4) la stimulation d'un récepteur spécifique peut induire des réponses différentes [comme par exemple la stimulation du récepteur β-adrenérgique qui induit une augmentation de la fréquence de contraction des cardiomyocytes néonataux (116;184) mais pas des cellules adultes (185)]; et 5) en réponse à un agent hypertrophique, les cardiomyocytes de rats nouveau-nés peuvent subir tant une hyperplasie qu'une hypertrophie (186), tandis que les cardiomyocytes adultes ne peuvent pas subir de mitose et réagissent exclusivement en augmentant leur taille (187).

Pour les raisons énumérées ci-dessus, des cultures de cardiomyocytes adultes peuvent être considérées comme un modèle plus proche de la physiologie du cœur adulte que les cardiomyocytes néonataux.

6. Projet de recherche

Vu que l'ANF module de nombreuses fonctions du cœur et semble constituer un inhibiteur endogène de la réponse hypertrophique, un des intérêts du laboratoire de

biologie cardiovasculaire expérimentale du Dr Deschepper est d'étudier la régulation et les mécanismes d'action de l'ANF ou de son messager second, le GMPc.

Des observations précédentes faites au laboratoire avaient démontré que l'augmentation de production de GMPc dans les cardiomyocytes peut inhiber l'hypertrophie induite *in vivo*, soit par l'isoprotérénol, soit par une constriction aortique abdominale. L'hypertrophie étant définie comme une augmentation de la quantité de protéines par unité d'ADN dans une cellule, il est possible que le GMPc puisse moduler la vitesse de la synthèse protéique dans des cardiomyocytes. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé des cultures primaires de cardiomyocytes de rats adultes, avec lesquelles il est possible de produire, *in vitro*, une hypertrophie suite à une stimulation hormonale, soit avec la PE, soit avec l'insuline.

Notre premier objectif a été de déterminer l'effet du GMPc sur l'induction de la synthèse protéique par la PE et l'insuline. Le résultat obtenu nous a orienté sur l'étude des effets du GMPc sur la phosphorylation, soit par la PE soit par l'insuline, des résidus thr421/ser424 et du résidu thr389 de la protéine S6K1. D'autre part, comme plusieurs études suggèrent que la phosphorylation du résidu thr389 est rapamycine-dépendante, alors que celle de résidus thr421/ser424 peut être rapamycine-indépendante, nous avons vérifié les effets de la rapamycine sur la phosphorylation (par la PE ou l'insuline) des deux sites en question. Enfin, en fonction des résultats obtenus et des données publiées dans la littérature, nous avons testé si l'action de GMPc sur la phosphorylation de S6K1 pouvait s'accompagner de changements dans le niveau de translocation des 2 isoformes δ et ϵ de la famille des PKCs suite à une stimulation par la PE.

Ces expériences ont abouti à la détermination d'un des mécanismes d'action du GMPc. En effet, ces études ont permis d'identifier une des voies affectées par le GMPc dans le cadre de son activité anti-hypertrophique. Ce point est d'un intérêt clinique important puisque la compréhension des modes d'action de l'ANF pourrait aider à développer des stratégies anti-hypertrophiques.

Chapitre II- MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Animaux :

Les expérimentations effectuées sur les animaux ont été approuvées par le comité d'éthique animale de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM) et ont été menées en suivant les lignes directrices du *Canadian Council on Animal Care*. La nomenclature des lignées suit les recommandations du *International Rat Genetic Nomenclature Committee*. Les rats WKY/Cfd proviennent d'une colonie gérée à l'IRCM et sont les descendants de parents WKY/Cr en provenance de Charles River (St. Constant, Québec, Canada).

2. Matériel :

Le chlorure de calcium, le chlorure de sodium, le bicarbonate de sodium, le chlorure de potassium, le sulfate de magnésium, le mono-phosphate de potassium, le biphosphate de sodium, le SDS, la glycine et l'hydroxyde de sodium ont été fournis par *Fisher*.

Le glucose, le milieu M199, la créatine, la taurine, la carnitine, le phénol-rouge, la phényléphrine, l'insuline, le 8-Br-GMPc, le bis-benzimide (Hoechst 33258), l'orthovanadate de sodium, le fluorure de sodium, le leupeptin, le pepstatin, l'antipain, le PMSF, le β glycerol-phosphate disodique, l'acide okadaïque, le déoxycholate de sodium, le NP-40, et la thyroglobuline ont été fournis par *Sigma-Aldrich*.

L'acide ascorbique, l'EDTA, l'EGTA, la Penicilline-streptomycine, l'hepes, le FBS, le tris et le DTT ont été fournis par *Invitrogen Corporation*.

La phenylalanine H³ (123Ci/mmol) a été fournie par *Amercham Bioscience*

La collagénase type II a été fournie par *Worthington Biochemical Corporation*.

Le FAF-BSA (*fatty acid-free bovine serum albumine*), la hyaluronidase, la DNAase et la trypsine ont été fournis par *Roche*.

Le BSA a été fourni par *Serologicals Proteins Inc.*

L'acide trichloro-acétique, le tween, le triton et le sucrose ont été fournis par *Anachemia*.

La laminine a été fournie par *VWR International Ltée*.

3. Anticorps

Les anticorps anti-p70S6K, anti-phospho-p70S6K (thr389), anti-phospho-p70S6K (thr421/ser424), l'anticorps secondaire anti-immunoglobuline de lapin et les marqueurs de poids moléculaires ont été fournis par *New England Biolab (Cell Signalling)*.

Les anticorps anti-PKC δ , anti-MKP-1 et anti-PKC ϵ ont été fournis par *Santa Cruz Biotechnology Inc.*

Tous les anticorps primaires sont des anticorps polyclonaux produits chez le lapin par immunisation avec des peptides synthétiques correspondants aux régions d'intérêt (site phosphorylé ou protéine totale) des protéines d'origine humaine. Ces anticorps ont été purifiés par chromatographie d'affinité, et réagissent tous avec des protéines équivalentes chez le rat.

4. Isolation et mise en culture de cardiomyocytes de rats adultes

Des rats femelles âgées entre 8 et 12 semaines sont utilisées comme source de cardiomyocytes adultes. Les animaux ont été préalablement anesthésiés à l'aide de 0,18 mg de chlorydrate de kétamine et de 1,4 mg de Xylazine, administrés d'une façon intra-péritonéale. Les cœurs ont été retirés puis montés sur un système de perfusion (Langerdorff) ajusté à une température de sortie de 37°C et à débit de 7 mL/min. Une première solution de perfusion de Krebs-Henseleit (NaCl 118 mM; KCl 4,7 mM; MgSO₄ 1,19 mM; NaHCO₃ 25 mM; Dextrose 11 mM; KH₂PO₄ 1,0 mM; CaCl₂ 1,25 mM) a été utilisée pour rincer les cœurs pendant 5 minutes. Par la suite, la solution de perfusion a été changée pour une solution identique sans CaCl₂ pour une durée de 5 minutes, ce qui permet l'arrêt des battements cardiaques. Les cœurs ont été finalement perfusés avec une solution de digestion à 37°C (collagénase 80 mg, hyaluronidase 24 mg, BSA 80 mg, pen-strep 80 μ L dans 80 mL de solution KH) pour une durée de 20

minutes. Les ventricules ont été ensuite séparés des oreillettes, transférés dans 15 mL de la solution de digestion (supplémentée de trypsine (0,2 mg/mL) et de DNase (0,2 mg/mL)) émancipés puis incubés à 37°C pour 10 min avec agitation. La suspension cellulaire a été par la suite filtrée à l'aide d'un filtre de 200 µm et centrifugée à 1000 rpm pour 60sec. Les cellules ont été resuspendues dans 10 mL de solution de lavage (KH 22,5 mL, M199 22,5 mL, FBS 5 mL), puis décantées pour 20 minutes à TP (le milieu M199 est supplémenté en mmol/L par : créatine 5 ; taurine 5 ; carnitine 2 ; acide ascorbique 0,1 ; NaHCO₃ 26,2 ; hepes 0,02 ; avec 0,2% BSA fatty acid free, phénol-rouge et pénicilline-streptomycine). Cette opération (lavage) a été répétée deux autres fois. La dernière resuspension a été faite aussi dans 10 mL de tampon de lavage et déposée sur 10 mL de BSA 6% (0,6g BSA dans 10 mL M199). Après une décantation de 20 minutes (qui permet de séparer les cardiomyocytes de tous les autres types de cellules), les cardiomyocytes ont été resuspendus dans 5 mL de M199 supplémenté de 10% FBS et de 1% Pen/Strep. Les cellules ont été comptées à l'hématocymètre, puis transférées dans des plaques de culture cellulaire à 6 puits (Falcon 353046) préalablement tapissées de laminine (0,1 µg/µL) à raison de 35000 cellules/puits. Après 2 heures d'incubation à 37°C et 5% CO₂, le milieu a été changé pour un milieu M199 sans sérum.

5. Incorporation de phénylalanine H³

Les cellules ont été maintenues pour une nuit dans le milieu sans sérum puis ont été stimulées par la phényléphrine (10⁻⁵ M) ou par l'insuline (10⁻⁷ M), avec ou sans 8-Br-cGMP 100 µM et toujours en présence de phénylalanine H³ (0,5 µCi/mL) pour 3, 5 et 15 heures. Après un rinçage au PBS froid, les cellules, dans chaque puits, ont été incubées dans 1 mL d'acide trichloracétique (TCA) 10% pour 30 min à 4 °C, pour précipiter les protéines. Les protéines précipitées ont été ensuite resolubilisées par 1 heure d'incubation dans 500 µL de SDS 1% à 37 °C. Un volume de 300µL a été prélevé de chaque puits et ajouté à 5 mL de liquide de scintillation afin d'être envoyé au compteur. Par ailleurs, un volume variant de 10 à 40 µL a été utilisé pour la quantification de

l'ADN. Pour chaque puits, la quantité de phenylalanine H³ incorporée dans les protéines précipitées par le TCA est normalisée par la quantité d'ADN présente dans chaque puits.

6. Dosage de l'ADN

L'ADN dans chaque puits a été quantifié par fluorométrie en utilisant Hoechst33258 préparé dans du TEN (100 mM Tris, 10 mM EDTA, 2 M NaCl) à une concentration de 100 µg/mL. Ainsi, le volume prélevé de chaque puits a été supplémenté par 2 mL de la solution de TEN+Hoechst afin d'être quantifié au fluoromètre. La quantité d'ADN a été évaluée par rapport à une courbe étalon d'ADN de *salmon sperm* préparé dans le même tampon.

7. Extraction des protéines

7.1. S6K1

Afin d'évaluer le taux de phosphorylation de S6K1, les cellules ont été d'abord privées de FBS pour 24 h, puis elles ont été stimulées soit avec la PE (10^{-5} M), soit avec l'insuline (10^{-7} M) pour 30 minutes, avec ou sans préincubation avec soit 8-Br-GMPc 100µM pour 30 min, soit la rapamycine 50 nM pour 1 h. Les puits ont été ensuite vidés du surnageant, rincés avec du PBS froid et incubés avec 200 µL de tampon de lyse (50 mM tris-HCl pH=7,5 ; 1 mM EDTA ; 1 mM EGTA ; 1 mM ortho- vanadate de sodium ; 50 mM fluorure de sodium ; 270 mM sucrose ; 1 mM DTT ; 1% triton X-100 ; 5 µg/mL leupeptin ; 5 µg/mL pepstatin ; 5 µg/mL antipain ; 200 µM PMSF). Les cellules ont été grattées et les suspensions ont été transférées dans des tubes Eppendorf et laissées sur la glace pour 10 min. Ensuite, les solutions ont été soniquées pour 5s puis centrifugées à 1500 g pour 10 min. Le surnageant a été récolté et un aliquot a été pris pour doser les protéines totales par la méthode de Bradford. Des échantillons contenant de 30 à 50 µg de protéines ont été utilisés pour l'immuno-buvardage.

7.2. PKC (δ/ϵ)

Dans le cas de PKC, les cellules quiescentes ont été stimulées avec la PE (10^{-5} M) pour 10 min, avec ou sans préincubation avec le 8-Br-GMPc 100 μ M pour 30 min. Après rinçage des puits avec le PBS froid, 200 μ l du tampon de lyse ont été ajoutés (20 mM tris-HCl pH=7,5 ; 1 mM EDTA ; 2,5 mM EGTA ; 100 mM fluorure de sodium ; 2 mM DTT ; 2 μ g/mL pepstatin ; 1 mM PMSF). Après avoir gratté les cellules, les suspensions ont été transférées dans des tubes Eppendorf, soniquées pour 20S et centrifugées à 1500g pour 7 min afin d'éliminer les débris. Le surnageant a été récolté et centrifugé à 100000g pour 45 min à 4°C afin de séparer la fraction membranaire de la fraction cytosolique de PKC. Après cette ultra-centrifugation, le surnageant (qui correspond à la fraction cytosolique) a été récolté. Le culot a été solubilisé dans le même tampon de lyse supplémenté de 1% de Triton X-100. Après avoir soniqué et centrifugé à 1500 g pour 15 min à 4°C, le surnageant (contenant la fraction membranaire) a été récolté. Les protéines totales ainsi que la quantité de protéines dans la fraction membranaire ont été évaluées par la méthode de Bradford. Des échantillons contenant 100 μ g de protéines ont été utilisés pour l'immuno-buvarpage.

7.3. MKP-1

Afin d'évaluer l'expression de MKP-1, les cellules ont été d'abord privées de FBS pour 24h, puis elles ont été stimulées avec la PE (10^{-5} M) pour 30 minutes, avec ou sans préincubation avec le 8-Br-GMPc 100 μ M pour 24 h. Après aspiration du milieu de culture, les puits ont été rincés avec du PBS froid, puis incubés avec 200 μ l de tampon de lyse (50 mM tris-HCl pH=7,5 ; 1% NP-40 ; 0,25% déoxycholate de sodium ; 1 mM EDTA ; 150 mM NaCl ; 1% SDS ; 1 μ g/mL leupeptin ; 1 μ g/mL pepstatin ; 1 μ g/mL antipain ; 1 mM PMSF). Les cellules ont été grattées, les suspensions ont été transférées dans des tubes Eppendorf et laissées sur la glace pour 10 min. Ensuite, elles ont été soniquées pour 5 S et centrifugées à 1500 g pour 10 min. Le surnageant a été récolté et un aliquot a été pris pour doser les protéines (Bradford). Des échantillons contenant 50 μ g de protéines ont été utilisés pour l'immuno-buvarpage.

8. Dosage des protéines

Pour doser les protéines, les échantillons ont été préparés de la façon suivante : le volume prélevé de chaque essai a été supplémenté d'eau pour avoir un volume final de 50 μ L. Des volumes de 50 μ L de NaOH 1N, 700 μ L de PBS et 200 μ L de la solution de *Bio-Rad protein assay* ont été ajoutés. Les protéines ont été dosées par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 595 nm. La quantité des protéines a été évaluée par rapport à une courbe étalon de thyroglobuline, préparé dans le même tampon.

9. Immuno-buvardage

Les protéines ont été analysées par SDS-PAGE sur gels de 10% pour S6K1, PKC δ , 8% pour PKC ϵ et 12 % pour MKP-1. Après migration et transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose (*BIORAD*), cette dernière a été bloquée dans une solution 5% de lait écrémé (dans du TBS-T : 0.1% tween-20), puis hybridée ON avec l'anticorps primaire (1/1000, dilué dans du TBS 1X, 5% BSA et 0.05% tween-20). Un lavage (avec du TBS-T : 0.1% tween-20) a fait suite, puis l'hybridation avec l'anticorps secondaire anti-lapin conjugué au *HRP* (1/2000, dilué dans du TBS 1X, 5% lait et 0.1% tween-20) pour 1h. La membrane a été finalement exposée sur un film pour révéler la présence des bandes par la méthode de chemiluminescence. Les bandes ont été quantifiées en utilisant le logiciel « *AlphaImager2200* ».

10. analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été faites en utilisant le logiciel « *GraphPad Prism 4* ». Le test *one way ANOVA* a été utilisé afin de comparer plusieurs groupes (3 et plus) de valeurs entre eux. Le test post-hoc de Tukey a ensuite été utilisé pour examiner les différences significatives observées avec l'*ANOVA*. Le test *two way ANOVA* a été utilisé pour comparer l'effet de deux facteurs sur une seule variable. $p \leq 0,05$ est considéré significatif.

Chapitre III-RÉSULTATS

L'hypertrophie d'un cardiomyocyte peut être définie comme une augmentation de la quantité de protéines cellulaires pour une même quantité d'ADN. Etant donné les évidences que le GMPc peut inhiber l'hypertrophie cardiaque, nous avons voulu tester si le GMPc pouvait altérer l'activité des régulateurs de la synthèse protéique. Pour ce faire, nous avons utilisé des cardiomyocytes adultes mises en culture quiescente et nous les avons exposées à des activateurs de la synthèse protéique comme la PE ou l'insuline.

Le choix de ce modèle d'étude (culture quiescente de cardiomyocytes adultes) est justifié par les raisons suivantes :

1) Pourquoi « adulte »?

Comme les cardiomyocytes adultes ne peuvent plus se diviser, ces cellules représentent un bon modèle pour étudier les mécanismes cellulaires d'hypertrophie indépendamment des autres mécanismes de la cellule. D'autres justifications sont bien démontrées dans l'introduction (180).

2) Pourquoi « *in vitro* » ?

L'analyse *in vivo* du métabolisme de protéines dans des tissus cardiaques est difficile à faire, tandis que *in vitro*, c'est à dire, des cellules en culture, la réponse des cellules à une hormone spécifique peut être étudiée indépendamment d'autres facteurs (180).

3) Pourquoi « quiescente » ?

Typiquement, les régulateurs de la synthèse protéique (tels que S6K1 ou 4E-BP) ne sont activés que de façon transitoire par des activateurs. Ceci s'explique par le fait que ces agents agissent comme des interrupteurs et que leurs effets sont amplifiés en aval par d'autres mécanismes (incluant la synthèse des ribosomes ou la transcription d'autres régulateurs). Pour détecter leur activation, il faut donc se placer dans des conditions où leur activité de base est minimale. Ceci peut s'obtenir dans des cellules quiescentes, qui ont été maintenues dans du milieu sans sérum pour une période d'au moins 18 heures. (188;189).

Il est important de signaler que pour toutes les expériences nous avons utilisé des rats du même sexe et âgés entre 8 et 12 semaines. De plus nous avons toujours utilisé la même densité de cellules en culture.

1. Effets du GMPc sur l'accumulation des protéines nouvellement synthétisées

Le premier objectif dans notre étude était d'étudier l'effet du GMPc sur l'accumulation de protéines nouvellement synthétisées, dans des cardiomyocytes adultes stimulés soit avec l'insuline soit avec la PE. La raison qui nous a motivés à choisir la PE et l'insuline n'était pas nécessairement d'étudier des agents particuliers qui sont impliqués dans l'HVG, mais le fait que ces 2 molécules puissent activer de voies de signalisation distinctes. De plus, l'équipe de Proud se sert toujours de ces 2 agonistes dans ses études sur la synthèse protéique dans des cardiomyocytes adultes et il a démontré des disparités importantes entre les protéines recrutées par la PE et l'insuline pour le contrôle de la synthèse protéique (178). Ainsi, pour bien comprendre les mécanismes d'action du GMPc il était important d'étudier ses effets sur deux voies différentes.

Pour réaliser notre objectif, les cellules ont été privées du sérum pour toute une nuit avant d'avoir été stimulées, en présence de phenylalanine H³, soit avec la PE, soit avec l'insuline. La quantité des protéines nouvellement synthétisées a été déterminée par la mesure de l'incorporation de la phenylalanine H³ dans du matériel précipitable par le TCA, et la valeur trouvée a été normalisée par la quantité d'ADN.

D'abord des expériences préliminaires ont permis d'établir une courbe du temps pour la synthèse protéique induite par l'insuline ou la PE. Ainsi, les cellules ont été stimulées avec l'un ou l'autre agent pour 3h, 5h et 15h. Nous avons observé que la synthèse protéique augmente avec le temps de façon quasi-linéaire (Figure 10A). Les pourcentages d'augmentation de la synthèse protéique par rapport au temps (3, 5 et 15 h) étaient respectivement 16, 26 et 58 %, dans le cas de la PE (Figure 10A). Ce % correspond au rapport de la moyenne de cpm/ug d'ADN des cellules stimulées sur celle des cellules non stimulées multiplié par 100.

L'insuline a montré approximativement la même courbe du temps avec des pourcentages respectifs de 17, 30 et 55% (n =1). En fonction de ces expériences préliminaires, les stimulations subséquentes ont été réalisées avec une incubation de 15 heures.

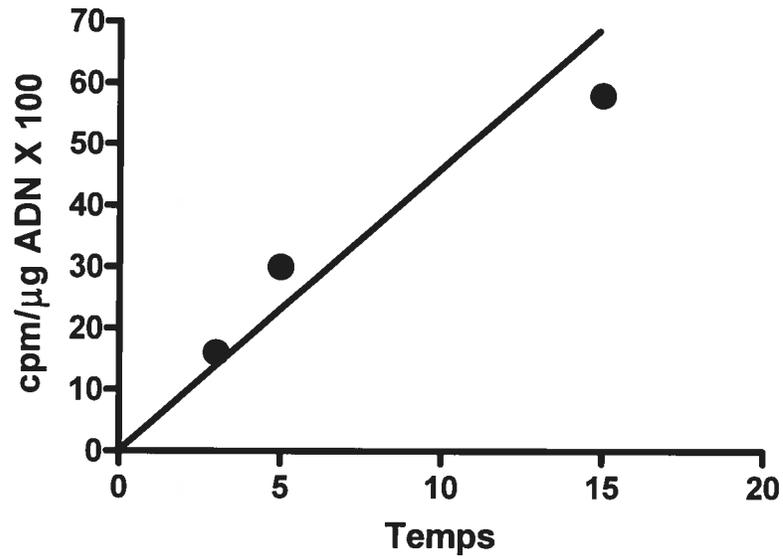
Ensuite, nous avons étudié l'effet du GMPc sur l'incorporation de phenylalanine H³ dans les protéines cellulaires. Pour ce faire, nous avons procédé à une pré-incubation des cardiomyocytes avec le 8-Br-GMPc qui est un analogue stable, non dégradé et

perméable du GMPc. 12 puits de cultures ont été utilisés pour chaque condition :1) des cellules non stimulées (Ctr); 2) des cellules stimulées avec la phényléphrine (PE); 3) des cellules stimulées avec l'insuline (Ins); 4) des cellules traitées avec du 8-Br-GMPc (GMPc); 5) des cellules traitées avec la PE et le 8-Br-GMPc (PE+GMPc); 6) des cellules traitées avec l'insuline et le 8-Br-GMPc (Ins+GMPc). Chaque expérience a été répétée 3 fois, en utilisant des cardiomyocytes provenant d'animaux différents. Après la pré-incubation avec le 8-Br-GMPc pour 24 h, les cellules ont été stimulées soit avec l'insuline, soit avec la PE pour 15 h et l'incorporation de protéines dans chaque condition a été déterminée.

Nous avons trouvé que la synthèse protéique a été augmentée tant par la PE que par l'insuline (47 % d'augmentation dans les 2 cas). Le GMPc seul n'a pas montré d'effet sur la synthèse protéique. Alors que le GMPc a inhibé totalement l'incorporation des protéines induite par la PE, il n'a pas montré d'effet sur celle induite par l'insuline (Figure 10B).

Un des intérêts de ces résultats est qu'ils montrent que le GMPc semble inhiber les régulateurs de la synthèse protéique PE-dépendants, mais non les voies insuline-dépendantes.

A



B

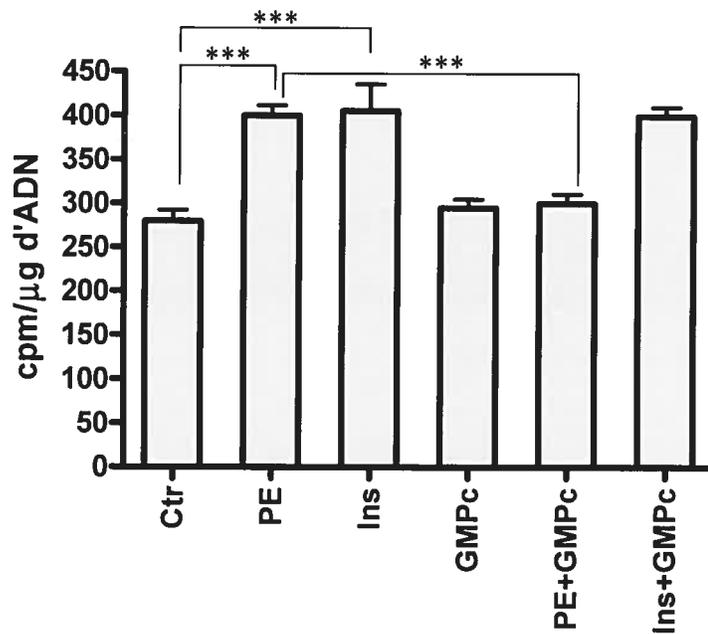


Figure 10: A) Une courbe du temps montrant l'incorporation de la phénylalanine³H induite par la PE. Les temps de stimulation étaient 3, 5 et 15 heures. B) Effets du GMPC sur l'incorporation de la phénylalanine³H induite soit par l'insuline soit par la PE. Les résultats correspondent aux cpm/μg d'ADN. Les barres représentent les moyennes ±SD, (n=3). *** p ≤ 0,001.

Les principaux régulateurs de la synthèse protéique sont : S6K1, eEF2, eIF2B et eIF4E. L'insuline contrôle l'activité de ces régulateurs principalement via la voie PI3-K/PKB/mTOR. Au contraire, la PE peut réguler la synthèse protéique en partie via des voies mTOR indépendantes, spécifiquement en régulant l'activité de S6K1 (Figure 9).

Il a été déjà démontré que plusieurs sites de phosphorylation sont nécessaires pour l'activation de S6K1. En se basant sur leur sensibilité à la rapamycine, ces sites sont divisés en deux groupes : 1) Les résidus thr229, ser371, thr389 et ser404, dont la phosphorylation est sensible à la rapamycine ; Et 2) les résidus ser411, ser418, thr421 et ser424 dont la phosphorylation peut être rapamycine-indépendante. (Figure 2).

Comme le GMPc n'a pas inhibé la synthèse protéique induite par l'insuline mais bien celle induite par la PE, nous avons postulé que le GMPc pourrait exercer ses effets principalement en régulant les effets rapamycine-indépendants de la PE sur S6K1. Nous avons donc poursuivi nos expériences en étudiant l'effet du GMPc sur l'état de phosphorylation de S6K1.

La technique choisie a été l'immuno-buvardage en utilisant des anticorps dirigés contre la protéine totale ou contre des sites phospho-spécifiques de S6K1. Les sites phosphorylés sur lesquels nous avons déterminé l'effet du GMPc étaient : 1) le résidu thr389 (dont la phosphorylation est rapamycine-dépendante) et 2) les deux résidus thr421 et ser424, dont la phosphorylation peut être (du moins en partie) rapamycine-indépendante.

Les protéines ont été quantifiées en utilisant le logiciel « *AlphaImager2200* ». Un désavantage de ce dernier est qu'il n'est pas capable de soustraire tout le bruit du fond, ce qui donne parfois l'impression que les résultats présentés sous forme d'immunoblots ne supportent pas clairement les résultats présentés en histogramme.

2. Effets du GMPc sur la phosphorylation de S6K1 par la PE

Avant d'étudier l'effet du GMPc, nous avons établi une cinétique qui détermine les pics d'activation pour les deux formes phosphorylées de S6K1. En faisant les temps : 0, 10, 20, 30, 40 et 60 min, nous avons observé que les phosphorylations maximales étaient obtenues 30 minutes après la stimulation avec la PE (Figure 11). En fonction du résultat de l'expérience de cinétique, nous avons utilisé des temps de stimulation de 30min pour toutes les expériences ultérieures.

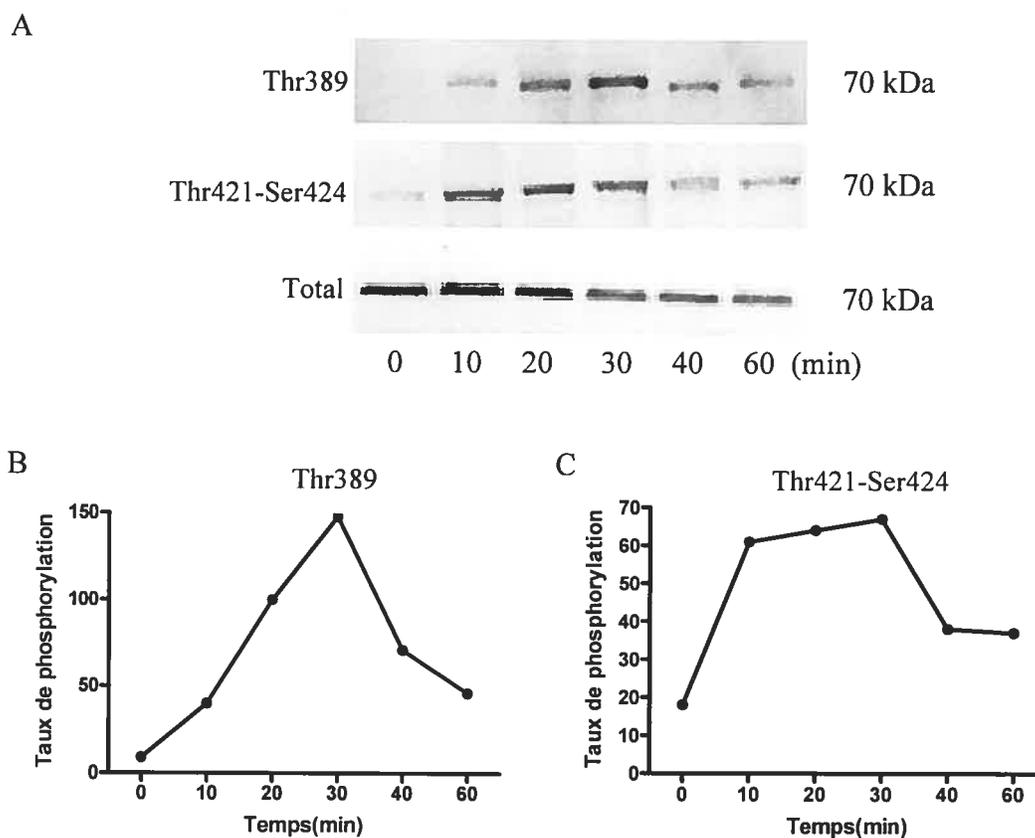


Figure 11 : Courbes des temps pour les deux formes phosphorylées de S6K1 dans des cardiomyocytes adultes stimulés par la PE. A) Images représentatives des immunoblots obtenus avec les anticorps anti phospho-p70S6k (thr389), anti phospho-p70S6k (thr421/ser424) et anti p70-S6k respectivement. B) La courbe montrant le taux quantifié en calculant le rapport de l'intensité du signal de la protéine phosphorylée au niveau du résidu thr389 par rapport à la protéine totale. C) La courbe montrant le taux quantifié en calculant le rapport de l'intensité du signal de la protéine phosphorylée au niveau des résidus (thr421/ser424) par rapport à la protéine totale. (n=1).

Pour étudier l'effet du GMPc, nous avons traité des cellules de la manière suivante : 1) les cellules ont été d'abord privées du sérum pour toute une nuit, 2) elles ont été préincubées pour 30 min, soit en absence, soit en présence de 8-Br-GMPc et 3) elles ont été stimulées pour 30 min avec la PE (toujours en présence ou en absence de 8-Br-GMPc), avant d'avoir extrait les protéines. Six puits de culture ont été utilisés pour chaque condition : 1) des cellules non stimulées; 2) des cellules stimulées avec la PE; 3) des cellules traitées avec du 8-Br-GMPc; 4) des cellules traitées avec la PE et le 8-Br-GMPc. Chaque expérience a été répétée 3 fois, en utilisant des cardiomyocytes provenant d'animaux différents.

Après l'immuno-buvardage avec les trois formes de l'anticorps (total et deux formes phosphorylées), les bandes ont été détectées et quantifiées. La valeur correspondant à la protéine phosphorylée a été normalisée par celle correspondant à la protéine totale.

Nous avons trouvé que la PE a augmenté de 3 fois la phosphorylation de résidus thr421/ser424. Le GMPc n'a pas affecté le taux de phosphorylation de thr421/ser424, mais il a empêché la PE d'augmenter la phosphorylation de façon significative (Figure 12A). De même, la PE a augmenté de 4 fois la phosphorylation du résidu thr389; Le GMPc n'a pas affecté le taux de phosphorylation de thr389, et n'a affecté que très légèrement l'augmentation de la phosphorylation due à la PE (Figure 12B).

Ce résultat nous a indiqués que le GMPc inhibe la phosphorylation de résidus thr421/ser424 (dont la phosphorylation peut être rapamycine-indépendante) induite par la PE, mais pas la phosphorylation du résidu thr389 (connue pour être rapamycine-dépendante).

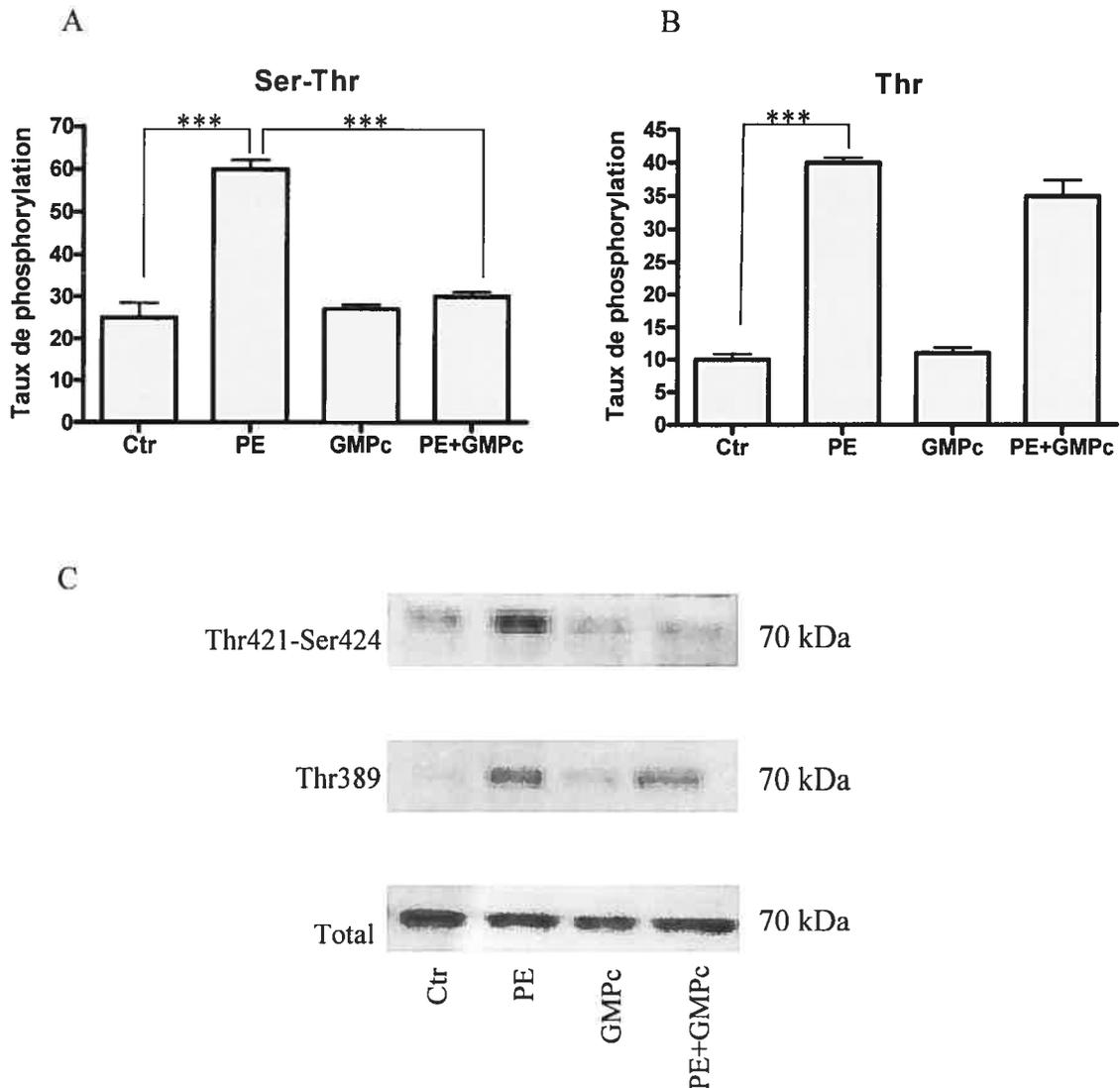


Figure 12: Effets du GMPc sur la phosphorylation de p70S6K1 après stimulation des cardiomyocytes adultes par la PE. A) Les histogrammes montrant le taux quantifié en calculant le rapport de l'intensité du signal de la protéine phosphorylée au niveau des résidus (thr421/ser424) par rapport à la protéine totale. Les conditions utilisées étaient les suivantes : des cellules non stimulées (Ctrl), des cellules stimulées avec la PE (PE), des cellules traitées avec du 8-Br- GMPc (GMPc) et des cellules traitées avec la PE et le 8-Br-GMPc (PE+GMPc). B) Les histogrammes montrant le taux quantifié en calculant le rapport de l'intensité du signal de la protéine phosphorylée au niveau du résidu thr389 par rapport à la protéine totale. C) Images représentatives des immunoblots obtenus avec les anticorps anti phospho-p70S6k (thr421/ser424), anti phospho-p70S6k (thr389) et anti p70-S6k respectivement. Des résultats similaires ont été obtenus à trois reprises indépendantes. Les barres représentent les moyennes \pm SD, (n=3). *** $p \leq 0,001$.

3. Effets du GMPc sur la phosphorylation de S6K1 par l'insuline

De façon semblable aux expériences avec la PE, nous avons établi pour l'insuline une courbe du temps pour déterminer le pic d'activation pour la forme thr421/ser424 phosphorylée de S6K1. Le temps qui correspondait au maximum de phosphorylation était de 30 min.

Pour étudier l'effet du GMPc, les cellules ont été privées du sérum pour toute une nuit, puis préincubées pour 30 min avec le 8-Br-GMPc. Ensuite, les cellules ont été stimulées pour 30 min avec l'insuline, avant d'avoir extrait les protéines. Six puits de culture ont été utilisés pour chaque condition : 1) des cellules non stimulées; 2) des cellules stimulées avec l'insuline; 3) des cellules pré-traitées avec du 8-Br-GMPc; 4) des cellules traitées simultanément avec l'insuline et le 8-Br-GMPc. Chaque expérience a été répétée 3 fois, en utilisant des cardiomyocytes provenant d'animaux différents.

Nous avons trouvé que l'insuline a augmenté de 4 fois la phosphorylation de résidus thr421/ser424. En présence du GMPc, l'insuline a augmenté le taux de phosphorylation au même niveau qu'en son absence (Figure 13A). De façon similaire, l'insuline a augmenté de 3 fois la phosphorylation du résidu thr389, le GMPc n'a affecté ni le taux de phosphorylation basal ni le taux de phosphorylation obtenu après stimulation avec l'insuline (Figure 13B).

Pris dans leur ensemble, les résultats des expériences de stimulation par la PE et l'insuline démontrent que le GMPc inhibe totalement la phosphorylation des résidus thr421/ser424 induite par la PE, mais n'affecte pas la phosphorylation du résidu thr389. Par contre, le GMPc n'a aucun effet sur la phosphorylation des résidus étudiés après stimulation par l'insuline.

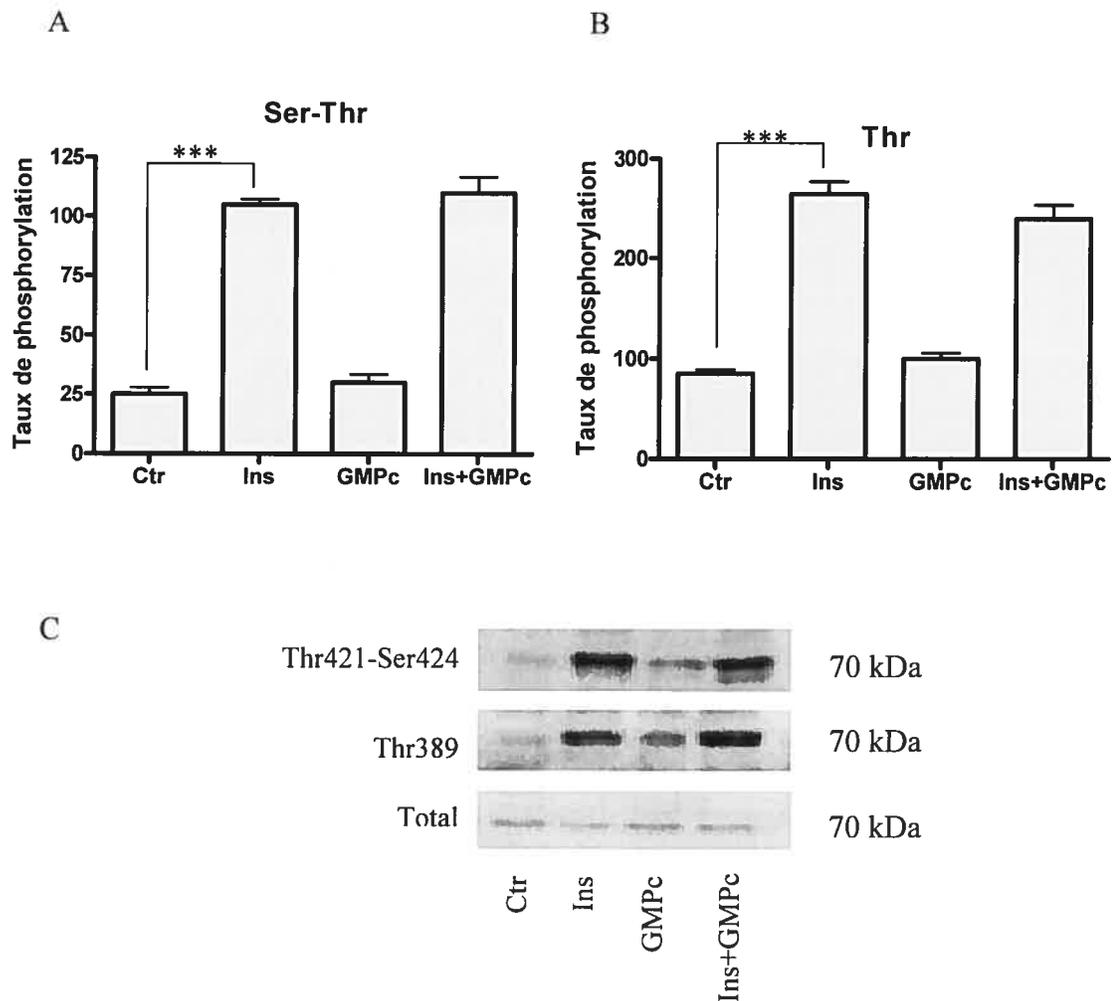


Figure 13: Effets du GMPc sur la phosphorylation de p70S6K1 après stimulation des cardiomyocytes adultes par l'insuline. A) Les histogrammes montrant le taux quantifié en calculant le rapport de l'intensité du signal de la protéine phosphorylée au niveau des résidus (thr421/ser424) par rapport à la protéine totale. Les conditions utilisées étaient les suivantes : des cellules non stimulées (Ctr), des cellules stimulées avec l'insuline (Ins), des cellules traitées avec du 8-Br- GMPc (GMPc) et des cellules traitées avec l'insuline et le 8-Br-GMPc (Ins+GMPc). B) Les histogrammes montrant le taux quantifié en calculant le rapport de l'intensité du signal de la protéine phosphorylée au niveau du résidu thr389 par rapport à la protéine totale. C) Images représentatives des immunoblots obtenus avec les anticorps anti phospho-p70S6k (thr421/ser424), anti phospho-p70S6k (thr389) et anti p70-S6k respectivement. Des résultats similaires ont été obtenus à trois reprises indépendantes. Les barres représentent les moyennes \pm SD, (n=3). *** $p \leq 0,001$.

Etant donnée que la phosphorylation de deux résidus thr421/ser424 peut s'effectuer indépendamment de l'activation de m-TOR, nous avons voulu vérifier que : 1) la rapamycine n'affectait pas la phosphorylation des résidus thr421/ser424 induite par la PE, et 2) l'effet inhibiteur du GMPc sur la phosphorylation de ces deux résidus persistait bien en présence de la rapamycine.

4. Effets de la rapamycine sur la phosphorylation de S6K1 par la PE

Pour cette étape, les cellules ont été stimulées pour 30 min avec la PE après une préincubation de 1h avec la rapamycine. Les échantillons étaient : 1) des cellules non stimulées; 2) des cellules stimulées avec la PE; 3) des cellules traitées avec la rapamycine; 4) des cellules traitées avec la PE et la rapamycine.

Contrairement à ce que nous avons trouvé avec le GMPc, la rapamycine a bloqué très fortement la phosphorylation du résidu thr389 tant en présence qu'en absence de la PE (Figure 14B), mais il n'a pas affecté la phosphorylation des résidus thr421/ser424 (Figure 14A). Ceci démontre que dans des cardiomyocytes adultes, la PE induit la phosphorylation des résidus thr421/ser424 via une voie rapamycine-indépendante.

5. Effets de la rapamycine sur la phosphorylation de S6K1 par l'insuline

Lorsque les cardiomyocytes ont été stimulés par l'insuline, nous avons observé que la rapamycine a atténué la phosphorylation des résidus thr421/ser424 en présence d'insuline, mais que la réponse à l'insuline était conservée (Figure 15A). Ainsi, l'analyse par *2-way ANOVA* a révélé que les effets d'insuline et de la rapamycine étaient significatifs, de même que l'interaction entre les deux traitements. Cependant, en présence de la rapamycine, l'insuline a augmenté la phosphorylation des résidus thr421/ser424 de façon significative (Figure 15A). Par contre, la rapamycine a bloqué très fortement la phosphorylation du résidu thr389 (tant en présence qu'en absence d'insuline) à des niveaux presque indétectables (Figure 15B).

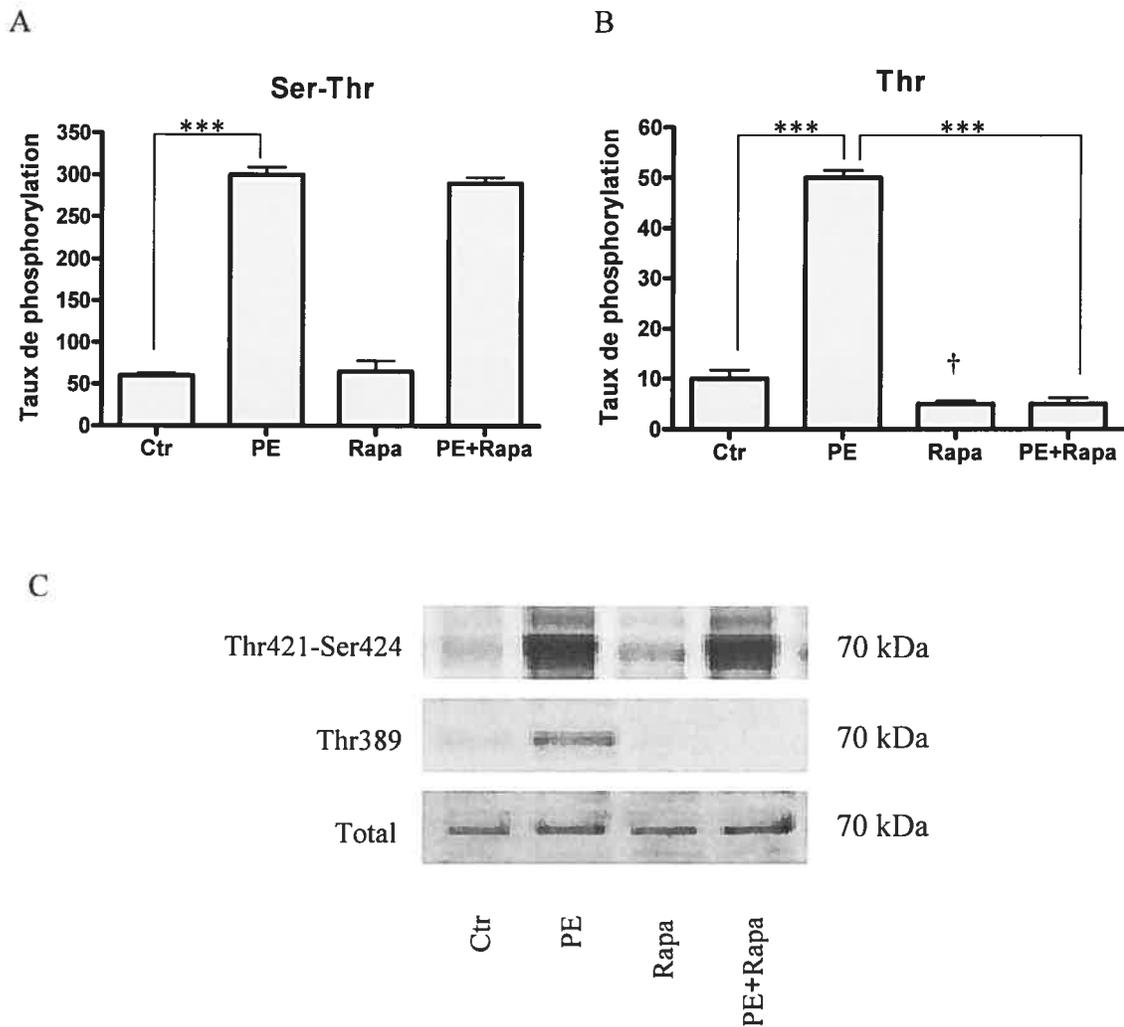


Figure 14: Effets de la rapamycine (Rapa) sur la phosphorylation de p70S6K1 après stimulation des cardiomyocytes adultes par la PE. A) Les histogrammes montrant le taux quantifié en calculant le rapport de l'intensité du signal de la protéine phosphorylée au niveau des résidus (thr421/ser424) par rapport à la protéine totale. Les conditions utilisées étaient les suivantes : des cellules non stimulées (Ctr), des cellules stimulées avec la PE (PE), des cellules traitées avec la rapamycine (Rapa) et des cellules traitées avec la PE et la rapamycine (PE+Rapa). B) Les histogrammes montrant le taux quantifié en calculant le rapport de l'intensité du signal de la protéine phosphorylée au niveau du résidu (thr389) par rapport à la protéine totale C) Images représentatives des immunoblots obtenus avec les anticorps anti phospho-p70S6k (thr421/ser424), anti phospho-p70S6k (thr389) et anti p70-S6k respectivement. Des résultats similaires ont été obtenus à trois reprises indépendantes. Les barres représentent les moyennes \pm SD, (n=3). *** $p \leq 0,001$. † $p \leq 0,001$ comparé avec le Ctr.

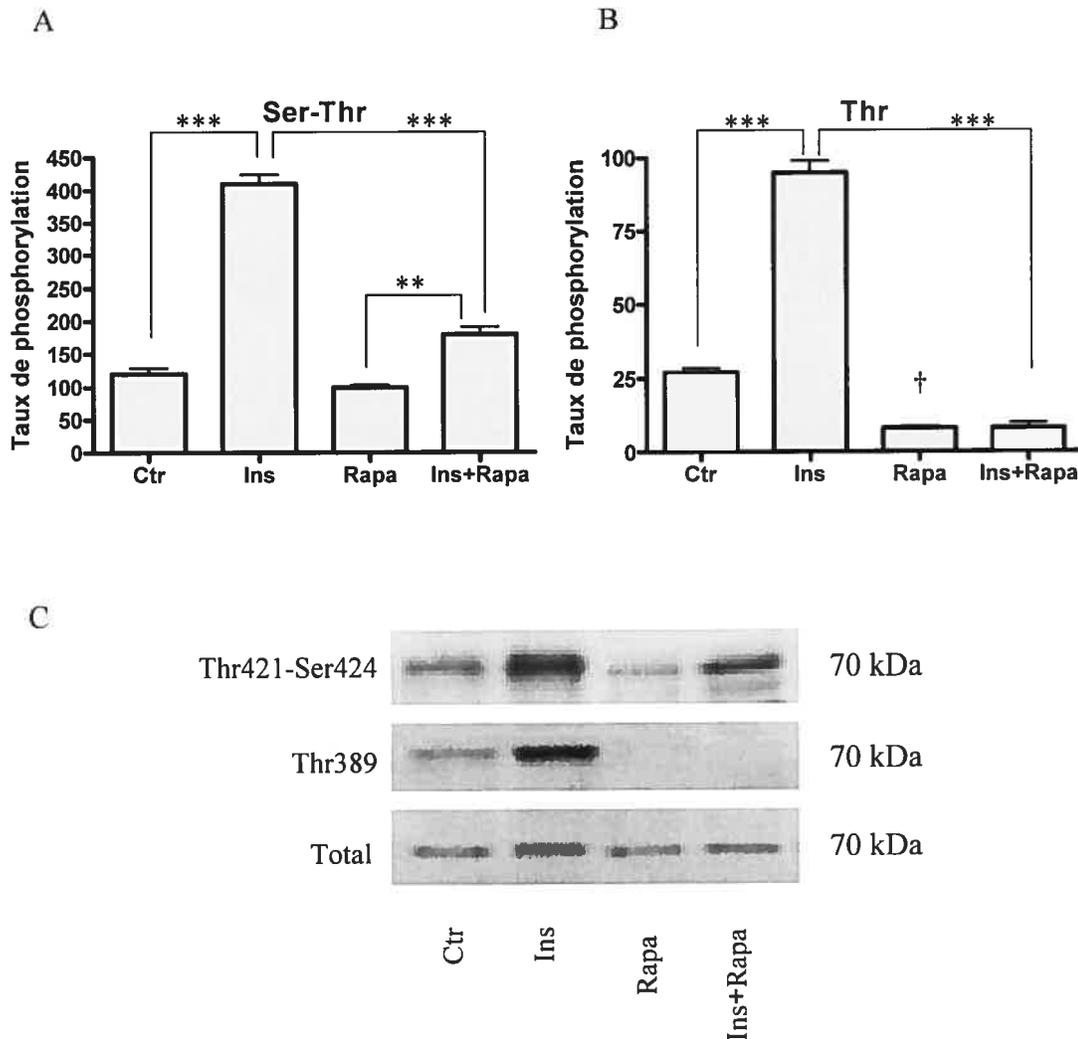


Figure 15: Effets de la rapamycine (Rapa) sur la phosphorylation de p70S6K1 après stimulation des cardiomyocytes adultes par l'insuline. A) Les histogrammes montrant le taux quantifié en calculant le rapport de l'intensité du signal de la protéine phosphorylée au niveau des résidus (thr421/ser424) par rapport à la protéine totale. Les conditions utilisées étaient les suivantes : des cellules non stimulées (Ctr), des cellules stimulées avec l'insuline (Ins), des cellules traitées avec la rapamycine (Rapa) et des cellules traitées avec l'insuline et la rapamycine (Ins+Rapa). B) Les histogrammes montrant le taux quantifié en calculant le rapport de l'intensité du signal de la protéine phosphorylée au niveau du résidu (thr389) par rapport à la protéine totale. C) Images représentatives des immunoblots obtenus avec les anticorps anti phospho-p70S6k (thr421/ser424), anti phospho-p70S6k (thr389) et anti p70-S6k respectivement. Des résultats similaires ont été obtenus à trois reprises indépendantes. Les barres représentent les moyennes \pm SD, (n=3). *** $p \leq 0,001$. ** $p \leq 0,01$. † $p \leq 0,001$ comparé avec le Ctr.

6. Le GMPc inhibe la voie d'activation mTOR-indépendante de S6K1

Le tableau (1) résume de quelle manière le GMPc et la rapamycine affectent la phosphorylation des deux sites de S6K1 après stimulation des cardiomyocytes adultes par la PE ou l'insuline. Nous avons observé que : 1) la rapamycine a diminué l'effet de l'insuline sur la phosphorylation des résidus thr421/ser424 et a totalement bloqué la phosphorylation du résidu thr389; 2) Au contraire de l'insuline, la rapamycine n'a pas affecté la phosphorylation des résidus thr421/ser424 induite par la PE; 3) Le GMPc n'a affecté ni la phosphorylation des résidus thr421/ser424, ni celle du résidu thr389 après stimulation par l'insuline; 4) Au contraire de l'insuline, le GMPc a bloqué la phosphorylation des résidus thr421/ser424 induite par la PE. Au total, ceci laisse conclure que le GMPc inhibe spécifiquement la voie d'activation mTOR-indépendante de S6K1.

Tableau 1 : Résumé des résultats obtenus pour les effets du GMPc et de la rapamycine sur la phosphorylation des résidus thr421/ser424 et du résidu thr389

	Thr421/Ser424			Thr389		
		GMPc	Rapa		GMPc	Rapa
PE	↑	↔	↑	↑	↑	↔
Ins	↑	↑	↓	↑	↑	↔

Nous remarquons que ces deux inhibiteurs ont les mêmes effets sur la phosphorylation du résidu thr389 par la PE ou par l'insuline, cependant, ils ont des effets opposés sur la phosphorylation des résidus ser421/thr424 : 1) le GMPc, non pas la rapamycine, a complètement inhibé la phosphorylation de ces résidus induite par la PE, 2) la rapamycine, non pas le GMPc, a diminué leur niveau de phosphorylation induite par l'insuline.

↑ Induit la phosphorylation. ↓ Diminue le taux de phosphorylation. ↔ Bloque ou inhibe la phosphorylation.

Pour bien démontrer que le GMPc agit via la voie d'activation m-TOR indépendante, nous avons répété l'expérience qui étudie la phosphorylation de résidus thr421/ser424 en montrant sur le même blot les effets du GMPc et de la rapamycine sur l'activation de ce site par la PE.

Les essais utilisés étaient : 1) des cellules non stimulées; 2) des cellules stimulées avec la PE; 3) des cellules traitées avec la rapamycine; 4) des cellules traitées avec la PE et la rapamycine; 5) des cellules traitées avec la rapamycine et le GMPc; 6) des cellules traitées avec la PE, le GMPc et la rapamycine.

Nous avons trouvé que la rapamycine n'a pas inhibé la phosphorylation de résidus thr421/ser424, mais l'addition du GMPc (même en présence de la rapamycine) a pu l'inhiber (Figure 16).

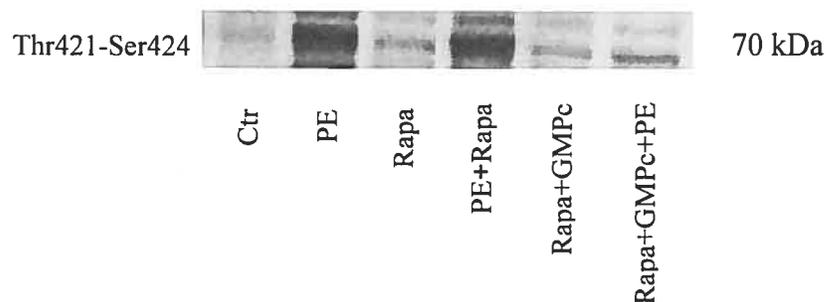


Figure 16 : Image représentative d'un immunoblot obtenu avec l'anticorps anti phospho-p70S6k (thr421/ser424) montrant les effets du GMPc et de la rapamycine (Rapa) sur la phosphorylation des résidus thr421/ser424 dans des cardiomyocytes adultes stimulés par la PE. Les conditions utilisées étaient : des cellules non stimulées (Ctr), des cellules stimulées avec la PE (PE), des cellules traitées avec la rapamycine (Rapa), des cellules traitées avec la PE et la rapamycine (PE+Rapa), des cellules traitées avec la rapamycine et le GMPc (Rapa + GMPc) et des cellules traitées avec la PE, le GMPc et la rapamycine (Rapa + GMPc + PE). Nous pouvons conclure que la rapamycine n'a pas inhibé la phosphorylation du site thr421/ser424 de la S6K1 induite par la PE, mais le GMPc a pu l'inhiber.

Les résultats obtenus nous ont permis de dessiner la figure récapitulative suivante.

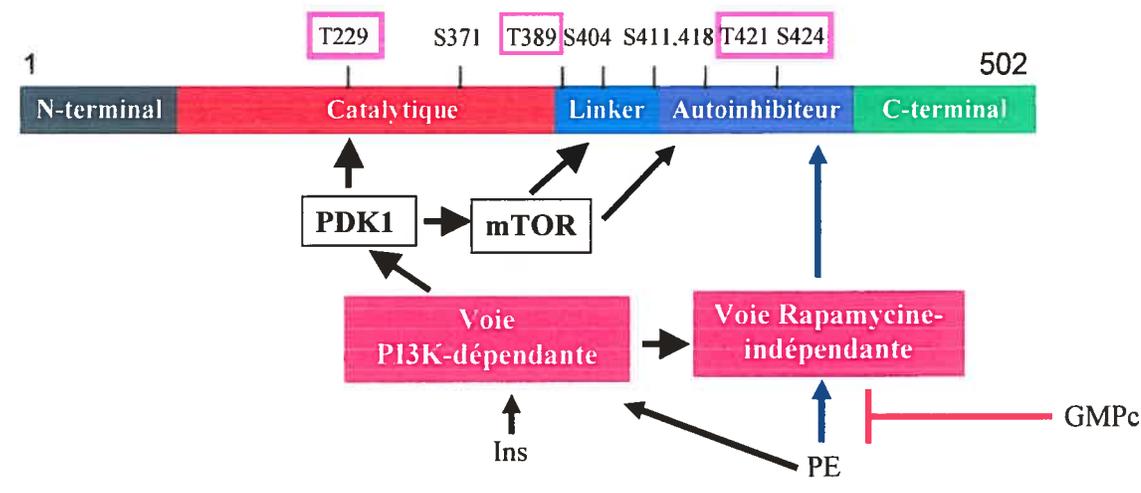


Figure 17 : La voie qui peut être inhibée par le GMPc en amont de S6K1. La phosphorylation du résidu thr389 de la protéine S6K1 suite à la stimulation tant par la PE que par l'insuline est totalement rapamycine-dépendante. D'autre part, L'insuline induit la phosphorylation des résidus thr421/ser424 en partie via une voie rapamycine-dépendante, tandis que leur phosphorylation induite par la PE est totalement rapamycine-indépendante. Le GMPc a inhibé spécifiquement la voie d'activation rapamycine-indépendante de S6K1, induite par la PE.

Ces résultats suggèrent que le GMPc puisse inhiber la synthèse protéique induite par la PE principalement en inhibant la voie d'activation m-TOR indépendante de S6K1, ce qui nous a amenés à poser la question suivante : Quelles sont les molécules qui peuvent être inhibées par le GMPc en amont de S6K1 dans la voie de signalisation activée par un RCPG ?

7. MKP-1 ne semble pas être impliquée dans l'effet inhibiteur du GMPc

Dans l'introduction, nous avons déjà mentionné que les MAPKs pourraient jouer un rôle dans l'induction d'une réponse hypertrophique. D'autre part, plusieurs études ont déjà démontré que L'ANF : 1) induit l'expression de la MAPK-phosphatase (MKP-1) dans les cellules mésangiales de la glomérule rénale (190); 2) atténue l'hypertrophie induite,

dans des cellules tubulaires rénales, par l'AngII via MKP-1 (191); 3) inhibe l'activation de p38MAPK induite, dans les cellules endothéliales des veines ombilicales, par TNF- γ via MKP-1 (192). De plus, une étude récente a montré que la transfection de cardiomyocytes néonataux avec un vecteur exprimant la MKP-1 inhibe l'hypertrophie cardiaque (193). Ceci laisse supposer que l'effet anti-hypertrophique de l'ANF (ou son messager second le GMPc) pourrait (du moins dans certaines cellules et dans certaines conditions) être dû à l'induction de l'expression de MKP-1. Si cette hypothèse est correcte, l'incubation des cellules avec le 8-Br-GMPc devrait induire l'expression de MKP-1.

En partant de ces données, nous avons testé si le GMPc induisait l'expression de MKP-1 dans nos cardiomyocytes adultes. Pour ce faire, l'expression de MKP-1 a été étudiée par immuno-buvardage en utilisant les échantillons suivants : 1) des cellules non stimulées; 2) des cellules stimulées avec la PE; 3) des cellules traitées avec le 8-Br-GMPc pour 24h; 4) des cellules traitées avec la PE et préincubées pour 24h avec le 8-Br-GMPc. Notre contrôle positif était des cellules *HeLa*, dont l'extraction de protéines a été faite dans le même tampon de lyse que les cardiomyocytes (voir matériels et méthodes).

En comparant nos échantillons avec le contrôle positif, nous n'avons pas détecté d'expression de MKP-1 dans les cardiomyocytes, dans aucune des conditions expérimentales, alors que la protéine était bien détectable dans les cellules *Hela* (Figure 18).

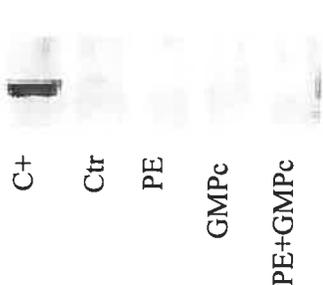


Figure 18: Image représentative d'un immunoblot obtenu avec l'anticorps anti MKP-1. Les conditions utilisées étaient les suivantes : des cellules non stimulées (Ctr), des cellules stimulées avec la PE (PE), des cellules traitées avec du 8-Br-GMPc (GMPc) et des cellules traitées avec la PE et le 8-Br-GMPc (PE+GMPc). C+ : Contrôle positif.

Nous n'avons donc pas obtenu d'évidences que MKP-1 joue un rôle dans l'effet anti-hypertrophique du GMPc dans des cardiomyocytes adultes.

8. PKC δ et PKC ϵ sont des cibles du GMPc

Plusieurs études ont déjà indiqué que les nPKC (surtout les isoformes δ et ϵ) pourraient jouer un rôle dans l'hypertrophie cardiaque. En stimulant un modèle de cardiomyocytes adultes de rats semblables au nôtre, l'équipe de C.G.Proud a rapporté que :

- 1) la PE induit la translocation de PKC δ et de PKC ϵ du cytosol à la membrane cytoplasmique des cardiomyocytes de rat adulte.
- 2) Cette translocation est nécessaire pour que la PE augmente la synthèse protéique et induise la phosphorylation des protéines ERK et S6K1 (165).

Sur la base de ces données, nous avons émis l'hypothèse que le GMPc pourrait inhiber la translocation de ces PKCs, ce qui pourrait ainsi inhiber la voie d'activation rapamycine-indépendante de S6K1.

Dans un premier temps, nous avons établi une cinétique pour déterminer le temps où la translocation de PKC δ et ϵ était maximale. Nous avons ainsi pu déterminer que 10 min correspondait au temps optimal pour induire la translocation de PKC δ et ϵ de façon maximale (Figure 19).

Ensuite nous avons étudié l'effet du GMPc sur la translocation de ces protéines suite à la stimulation par la PE. Six puits de culture ont été utilisés pour chacune des conditions suivantes : 1) des cellules non stimulées; 2) des cellules stimulées avec la PE pour 10 min; 3) des cellules traitées avec du 8-Br-GMPc; 4) des cellules traitées avec la PE et le 8-Br-GMPc. Chaque expérience a été répétée 3 fois, en utilisant des cardiomyocytes provenant d'animaux différents. Une préincubation de 30 min avec le 8-Br-GMPc a précédé certaines des stimulations. Enfin, les protéines totales ont été extraites soit de cellules entières, soit des fractions membranaires préparées à partir de ces cellules, et des immuno-buvarages ont été effectuées pour étudier la quantité relative d'immunoréactivité présente dans les fractions membranaires.

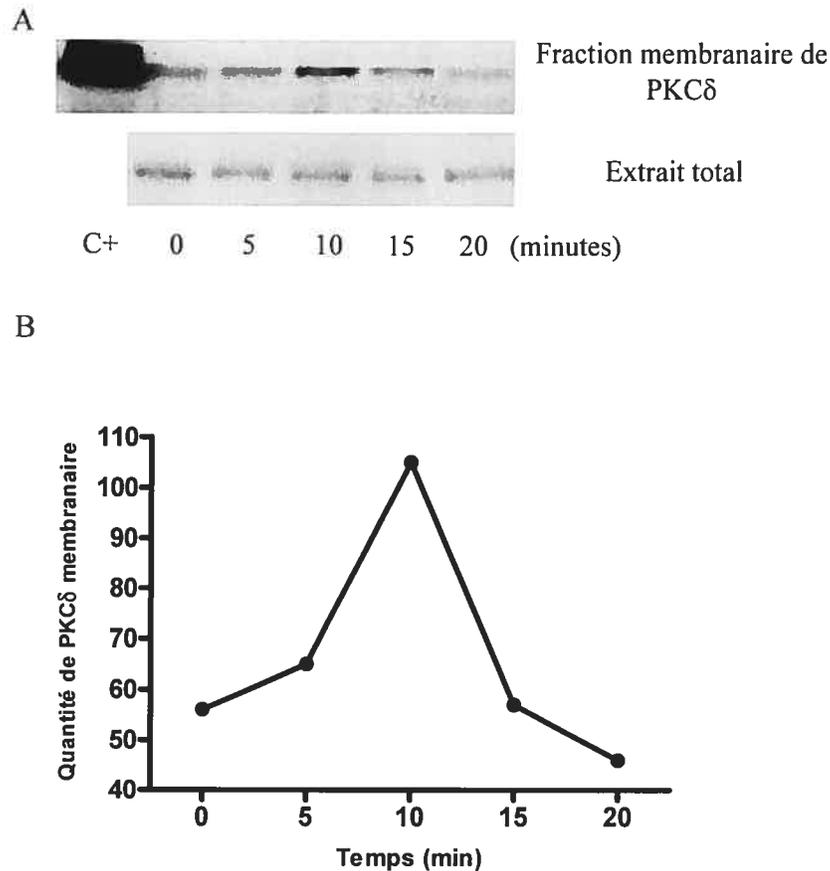


Figure 19: Courbe du temps montrant la translocation de PKC δ . A) Images représentatives des immunoblots obtenus avec l'anticorps anti-PKC δ montrant la fraction membranaire de PKC δ et la protéine totale pour les temps indiqués ci-dessus. B). La courbe montrant le taux quantifié en calculant le rapport de l'intensité du signal de la fraction membranaire par rapport à la protéine totale, (n=1). Nous remarquons qu'à 10 min il y a une activation maximale de la protéine. C+ : contrôle positif.

En ce qui concerne PKC δ , nous avons observé que la PE a induit la translocation de cette protéine du cytosol vers la membrane cytoplasmique. Le GMPc seul n'a pas montré d'effet sur l'activation de PKC δ mais il a inhibé sa translocation induite par la PE (Figure 20).

D'une façon similaire, la PE a induit la translocation de PKC ϵ du cytosol vers la membrane cytoplasmique mais l'addition du GMPc a inhibé cet effet (Figure 21).

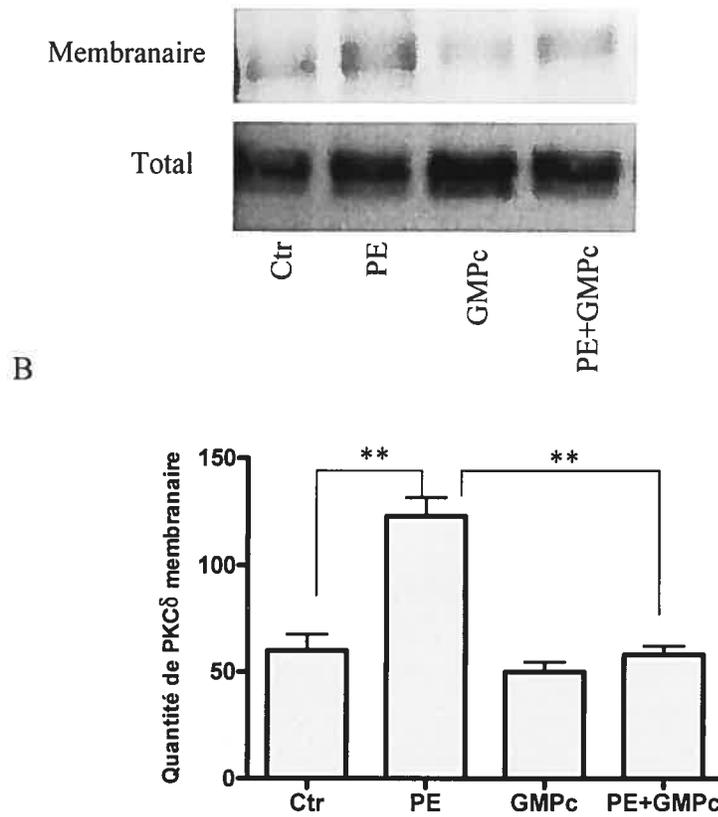
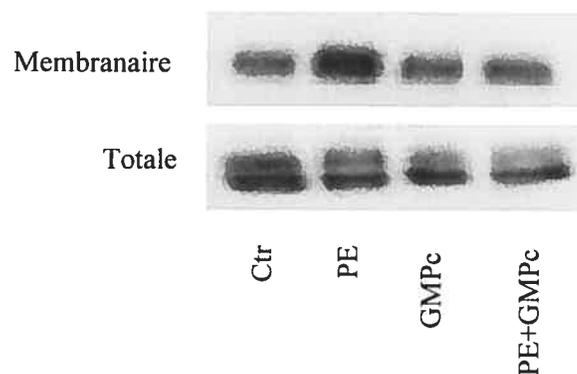


Figure 20: Effets du GMPc sur la translocation de PKC δ après stimulation des cardiomyocytes adultes par la PE. A) Images représentatives des immunoblots obtenus avec l'anticorps anti-PKC δ pour la fraction membranaire et la protéine totale respectivement. Les conditions utilisées étaient les suivantes : des cellules non stimulées (Ctr), des cellules stimulées avec la PE (PE), des cellules traitées avec du 8-Br- GMPc (GMPc) et des cellules traitées avec la PE et le 8-Br-GMPc (PE+GMPc). B) Les histogrammes montrant le taux quantifié en calculant le rapport de l'intensité du signal de la fraction membranaire par rapport à la protéine totale. Des résultats similaires ont été obtenus à trois reprises indépendantes. Les barres représentent les moyennes \pm SD, (n=3). ** $p \leq 0,01$.

A



B

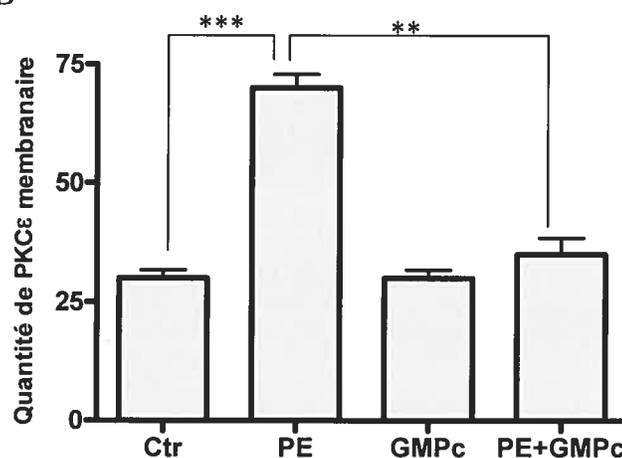


Figure 21 : Effets du GMPc sur la translocation de PKCε après stimulation des cardiomyocytes adultes par la PE. A) Images représentatives des immunoblots obtenus avec l'anticorps anti-PKCε pour la fraction membranaire et la protéine totale respectivement. Les conditions utilisées étaient les suivantes : des cellules non stimulées (Ctr), des cellules stimulées avec la PE (PE), des cellules traitées avec du 8-Br- GMPc (GMPc) et des cellules traitées avec la PE et le 8-Br-GMPc (PE+GMPc). B) Les histogrammes montrant le taux quantifié en calculant le rapport de l'intensité du signal de la fraction membranaire par rapport à la protéine totale. Des résultats similaires ont été obtenus à trois reprises indépendantes. Les barres représentent les moyennes \pm SD, (n=3). *** $p \leq 0,001$. ** $p \leq 0,01$.

Pour résumer, nos résultats indiquent que dans les cardiomyocytes adultes :

- 1) Le GMPc bloque l'accumulation des protéines nouvellement synthétisées induite par la PE, mais pas celle induite par l'insuline.
- 2) La phosphorylation du résidu thr389 de la protéine S6K1 suite à la stimulation tant par la PE que par l'insuline est rapamycine-dépendante.
- 3) Le taux de la phosphorylation des résidus thr421/ser424 par la voie du récepteur de l'insuline est diminué par la rapamycine, ce qui indique que la rapamycine affecte partiellement la phosphorylation de ces résidus par l'insuline.
- 4) Par contre, la phosphorylation des résidus thr421/ser424 par la voie du récepteur de la PE est totalement rapamycine-indépendante.
- 5) Le GMPc bloque spécifiquement la phosphorylation des résidus thr421/ser424 induite par la PE.
- 6) Le GMPc inhibe la voie d'activation rapamycine-indépendante de la protéine S6K1.
- 7) la phosphatase MKP-1 ne semble pas être abondante dans nos préparations de cardiomyocytes adultes.
- 8) Le GMPc inhibe la translocation de PKC δ et de PKC ϵ du cytosol vers la membrane cytoplasmique.

Au total, ces résultats semblent démontrer que l'inhibition des voies qui activent S6K1 de façon rapamycine-indépendante pourrait être un des mécanismes via lequel le GMPc inhibe l'hypertrophie cardiaque induite par activation des RCPGs.

Chapitre IV- DISCUSSION

L'étude présente a investigué un des mécanismes d'action du GMPc dans des cardiomyocytes adultes. Des études récentes ont démontré que l'ANF (ou son messager second, le GMPc) inhibe l'hypertrophie cardiaque tant *in vivo* que *in vitro*.

Étant donné que l'hypertrophie d'un cardiomyocyte peut être définie comme une augmentation de la synthèse protéique de la cellule pour une même quantité d'ADN, nous avons étudié l'effet du GMPc sur la régulation de la synthèse protéique. Pour ce faire, nous avons étudié l'effet de GMPc sur la stimulation des régulateurs de la synthèse protéique par la PE et l'insuline dans des cardiomyocytes adultes de rats.

Pris dans leur ensemble, nos résultats montrent que le GMPc :

- 1) inhibe l'induction de la synthèse protéique par la PE, mais pas par l'insuline.
- 2) inhibe spécifiquement la voie d'activation mTOR-indépendante de S6K1.
- 3) inhibe la translocation de PKC δ et de PKC ϵ du cytosol vers la membrane cytoplasmique.

La figure 22 résume la régulation de la synthèse protéique par la PE dans des cardiomyocytes adultes en culture. Ainsi, la stimulation des cellules avec la PE induit la translocation de PKC δ et de PKC ϵ du cytosol vers la membrane cytoplasmique. D'autres auteurs ont publié que cette translocation était une des étapes requises pour la phosphorylation de la kinase de la protéine ribosomale S6K1 (164; 165). Les protéines qui transduisent le signal de PKC δ et/ou PKC ϵ jusqu'à la phosphorylation de S6K1 ne sont pas encore bien identifiées, bien qu'il semble que les MAPKs puissent intervenir à ce niveau (177;178). Cependant, il n'existe pas des données dans la littérature sur les sites de S6K1 qui peuvent être phosphorylés par l'activation de PKCs. Nos résultats semblent indiquer qu'en inhibant la translocation de PKC δ et de PKC ϵ du cytosol vers la membrane cytoplasmique, le GMPc inhiberait la phosphorylation rapamycine-indépendante des résidus thr421/ser424 de S6K1 et ainsi la stimulation de la synthèse protéique par des agonistes G α_q . Ce qui semble montrer que la phosphorylation de ces résidus par la PE dépend de l'activation des isoformes δ et ϵ des PKCs.

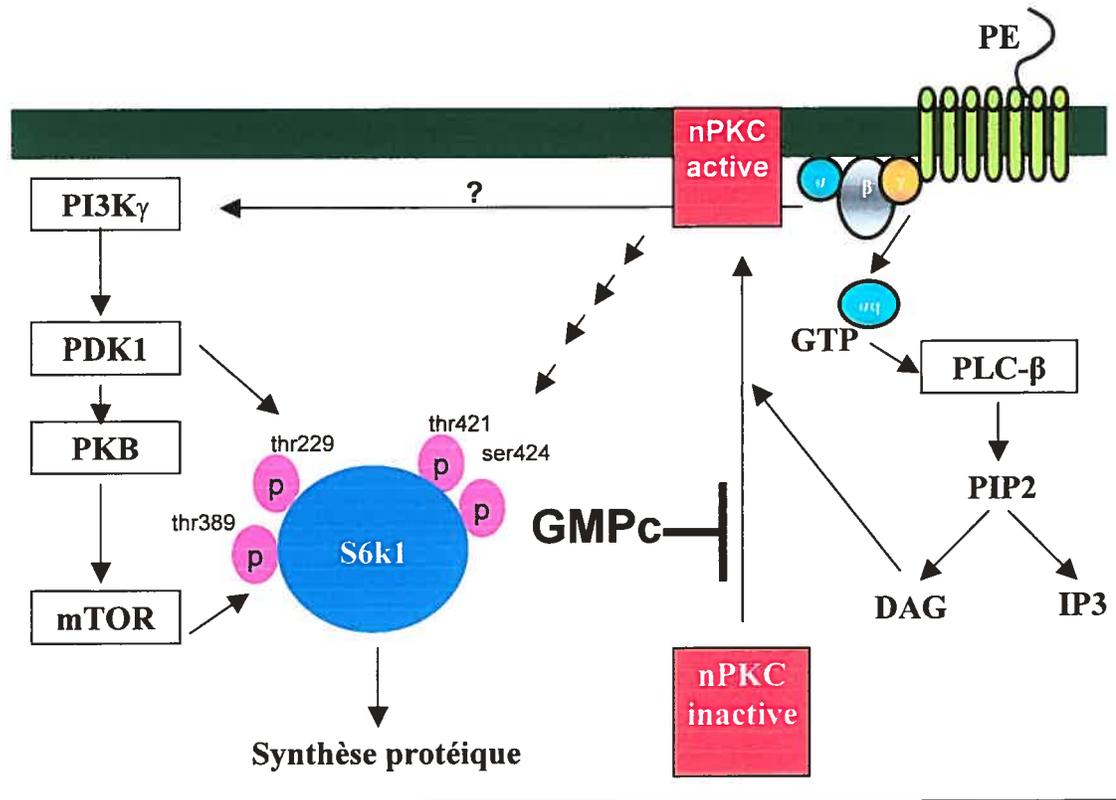


Figure 22 : Régulation de la phosphorylation de S6K1 par la PE et effet du GMPc sur cette phosphorylation. La PE se lie sur son récepteur transmembranaire couplé à la protéine Gq. Cette liaison active la phospholipase C (PLC) qui catalyse l'hydrolyse d'un phospholipide de la membrane plasmique, le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2), en deux messagers seconds : 1) l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) et 2) le 1,2 diacylglycérol (DAG). Le DAG active la protéine kinase C (dans ce cas les nPKC, particulièrement les isoformes δ et ϵ). La translocation de ces deux isoformes à la membrane cytoplasmique semble être requise pour la phosphorylation des résidus thr421/ser424 de la kinase de la protéine ribosomale S6K1. D'autre part, la PE active la voie de PI3-K (l'isoforme γ) qui est requise pour la phosphorylation des résidus thr229 par PDK1 ainsi que la phosphorylation mTOR-dépendante du résidu thr389. Le GMPc inhibe la translocation des isoformes δ et ϵ de PKC, ce qui empêche la phosphorylation des résidus thr421/ser424 de S6K1 inhibant ainsi la synthèse protéique.

1. Le GMPc et la synthèse protéique

Jusqu'à date, notre étude est la première à déterminer les mécanismes d'action du GMPc dans des cardiomyocytes adultes et à comparer son effet sur deux voies de signalisation différentes. Une seule étude a démontré que la préincubation avec le 8-Br-GMPc peut inhiber la synthèse protéique induite par l'ANG-II dans des cardiomyocytes adultes (60). Nos résultats sont en accord avec cette étude, puisque nous avons démontré que le GMPc a inhibé l'induction de la synthèse protéique par la PE. L'ANG-II et la PE se lient tous les deux à des récepteurs couplés aux protéines $G_{\alpha q}$. Un résultat nouveau et intéressant dans notre étude est que le GMPc n'a pas inhibé l'induction de la synthèse protéique par l'insuline. Un des intérêts de ce résultat est qu'il nous a permis de préciser quelle voie de régulation de la synthèse protéique pouvait être une cible du GMPc. En effet, toutes les études au sujet de la régulation de la synthèse protéique, tant dans le même modèle que le nôtre ou bien dans d'autres types cellulaires, ont montré que la synthèse protéique est contrôlée par deux voies distinctes, dont les activateurs prototypiques sont la PE et l'insuline (178). L'insuline contrôle l'activité des régulateurs de la synthèse protéique (S6K1, eEF2, eIF2B et eIF4E) principalement via la voie PI3-K/PKB/mTOR. Par contre, la PE peut réguler la synthèse protéique en partie via de voies mTOR-indépendantes, spécifiquement en régulant l'activité de S6K1 (178;179).

2. Le GMPc et la S6K1

Étant donné que la PE et l'insuline peuvent activer la kinase de la protéine ribosomale S6 (S6K1) par des voies différentes, S6K1 a constitué notre premier choix pour étudier l'effet du GMPc sur les régulateurs de la synthèse protéique.

Plusieurs sites de phosphorylation sont nécessaires pour l'activation de S6K1. En se basant sur leur sensibilité à la rapamycine, ces sites sont divisés en deux groupes : 1) un groupe contenant les résidus thr229, ser371, thr389 et ser404 (dont la phosphorylation est sensible à la rapamycine) et 2) un autre groupe contenant les résidus ser411, ser418, thr421 et ser424 dont la phosphorylation peut être (du moins en partie) rapamycine indépendante. (Voir figure 2).

En comparant les effets du GMPc et de la rapamycine sur la phosphorylation du résidu thr389 (phosphorylation rapamycine-dépendante) et celle des résidus thr421/ser424, nos résultats indiquent que le GMPc inhibe seulement la phosphorylation de ces derniers dans des cardiomyocytes stimulés par la PE. Le GMPc n'a pas affecté ni la phosphorylation des résidus thr421/ser424 par l'insuline, ni la phosphorylation du résidu thr389 tant par la PE que par l'insuline. D'autre part, la rapamycine a inhibé la phosphorylation du résidu thr389 tant par la PE que par l'insuline et il a diminué la phosphorylation des résidus thr421/ser424 par l'insuline. Par contre, la rapamycine n'a pas affecté la phosphorylation des résidus thr421/ser424 par la PE. Plusieurs conclusions s'imposent face à ces résultats. Le paragraphe suivant décrit une interprétation et une comparaison de ces résultats avec les données de la littérature.

D'abord, le fait que le GMPc a totalement inhibé l'induction de la synthèse protéique par la PE ainsi que la phosphorylation rapamycine-indépendante de la protéine S6K1 (et non pas celle qui est rapamycine-dépendante) laisse supposer que la PE régule la synthèse protéique principalement via S6K1 (qui augmente la capacité globale de la synthèse protéique), vu que les voies de eEF2, eIF2B et eIF4E (qui augmentent l'efficacité de la synthèse protéique) semblent toujours être dépendantes de la rapamycine (Voir figure9). Ces résultats sont compatibles avec plusieurs études montrant que l'abondance de ribosomes augmente clairement durant l'hypertrophie (102).

Ensuite, nos résultats ne sont pas entièrement en accord avec le modèle d'activation séquentielle de S6K1 proposé par Hannan et al (Voir figure 3). Ce modèle propose une phosphorylation séquentielle de la protéine S6K1 où une première étape dépendante de calcium serait nécessaire pour libérer l'interaction entre le domaine auto-inhibiteur et l'extrémité N-terminale de la protéine. Ceci faciliterait la phosphorylation de 4 résidus (dont les résidus thr421/ser424) du domaine auto-inhibiteur. Ces phosphorylations induiraient un changement de conformation de la protéine, où un mouvement du domaine inhibiteur démasquerait les sites thr389 et ser371 et les rendrait accessibles à la phosphorylation mTOR-dépendante. Enfin, PDK1 pourrait phosphoryler le résidu thr229

(101). Cependant, nous avons démontré que le GMPc a inhibé la phosphorylation des résidus thr421/ser424 par la PE mais il n'avait aucun effet sur la phosphorylation du résidu thr389. Selon l'hypothèse de Hannan, l'inhibition de la phosphorylation des résidus thr421/ser424 devrait empêcher la phosphorylation du résidu thr389. Par contre, nos résultats montrent qu'en présence de GMPc, la phosphorylation du résidu thr389 reste possible en absence d'une phosphorylation des résidus thr421/ser424. Nos données seront compatibles avec un autre modèle où les phosphorylations des résidus thr421/ser424 et du résidu thr389 collaborent de façon synergique pour permettre les étapes subséquentes d'activation de S6K1.

De plus, nos résultats indiquent que la phosphorylation du résidu thr389 est affectée par la rapamycine, tant dans la voie du récepteur de l'insuline que dans la voie d'un récepteur couplé à la protéine Gq. Ces résultats sont en accord avec toutes les études qui rapportent que la phosphorylation de ce résidu est toujours rapamycine-dépendante.

Enfin, nous avons démontré que les résidus thr421/ser424 peuvent être phosphorylés via des voies différentes. L'insuline régule la phosphorylation de ces résidus en partie par des voies rapamycine-dépendantes qui augmentent le taux global de phosphorylation mais ne semblent pas être entièrement responsables de l'effet de l'insuline. Par contre, la PE régule leur phosphorylation entièrement par des voies rapamycine-indépendantes qui semblent être sensibles au GMPc.

3. En amont de S6K1

Plusieurs études ont montré que l'ANF peut induire l'expression de MKP-1 (MAPK-phosphatase) dans différents types cellulaires et ainsi inhiber ERK. Nous avons cherché à tester si un tel phénomène pouvait expliquer (du moins en partie) l'effet du GMPc sur S6K1. Nos résultats montrent que MKP-1 ne semble pas être abondante dans nos préparations de cardiomyocytes adultes. Nous ne pouvons pas exclure que la quantité de MKP-1 présente dans les cardiomyocytes soit sous le seuil de détection de la technique utilisée. De plus, MKP-1 constitue un membre d'une famille de plusieurs protéines

homologues, et nous n'avons pas testé si ces autres protéines pouvaient jouer un rôle. Par ailleurs, une étude très récente (194), a démontré que le traitement des cardiomyocytes néonataux avec l'ANF ou le 8-Br-GMPc inhibe les effets de l'AngII et l'ET sur la synthèse protéique et la phosphorylation de ERK. De plus, cette étude a rapporté que l'ANF (ou le 8-Br-GMPc) induit l'expression de MKP-1 dans les cardiomyocytes néonataux et la sur-expression de MKP-1, dans ces mêmes cellules, inhibe leur réponse hypertrophique après stimulation par l'AngII ou l'ET. Premièrement, la différence observée entre cette étude et nos résultats peut être expliquée par le type des cellules utilisé (cellules néonataux ou adultes). Deuxièmement, avec les concentrations et les temps de traitements utilisés pour l'ANF et le 8-Br-GMPc, l'étude mentionnée a montré que l'ANF et le GMPc inhibent presque totalement la phosphorylation basale de ERK. Ceci indique que l'effet inhibiteur de ces deux agents n'est pas relié (comme dans notre cas) à l'inhibition de la réponse hypertrophique induite par un agoniste. Cependant cette étude, et d'autres utilisant des cardiomyocytes adultes (177;178), ont ouvert une fenêtre sur la possibilité que la protéine ERK pourrait être activée dans les cardiomyocytes adultes. Alors pour compléter nos expériences, il nous faudra étudier : 1) l'effet d'inhiber ERK (par un inhibiteur pharmacologique spécifique pour ERK) sur l'état de phosphorylation de S6K1 (surtout la phosphorylation des résidus thr421/ser424), et 2) l'effet du GMPc sur la stimulation de ERK par la PE, dans le cas où ERK serait impliquée dans la phosphorylation des résidus en question.

D'autre part, le résultat obtenu avec MKP-1 nous a orientés sur la détermination d'autres effecteurs cellulaires qui peuvent être impliquées dans le mécanisme d'inhibition de la synthèse protéique par le GMPc. Ainsi, le groupe de Proud et al. a démontré que la translocation, du cytosol vers la membrane cytoplasmique, des isoformes δ et ϵ de PKC était une étape nécessaire dans la phosphorylation de S6K1 suite à la stimulation de cardiomyocytes par la PE. L'activation de PKC est aussi reconnue comme une étape prédominante pour la transmission des signaux à partir des récepteurs couplés à la protéine Gq (165). Ainsi, l'inhibition de la translocation de PKC δ et PKC ϵ pourrait expliquer l'effet du GMPc sur la phosphorylation de résidus thr421/ser424 de S6K1 par la PE.

Enfin, pour finir l'histoire, il faut vérifier si la phosphorylation des résidus thr421/ser424 induite par la PE ainsi que leur inhibition par le GMPc, se corrént bien avec l'activité de S6K1. Ainsi, l'activité de la protéine sera déterminée pour les différentes conditions de stimulation.

4. Expérimentations futures.

A long terme, la suite du projet sera consacrée à comprendre les mécanismes à l'origine des effets du GMPc dans le coeur.

4.1. Identifier les effecteurs cellulaires qui peuvent être inhibés par le GMPc dans la voie d'un récepteur couplé à la protéine Gαq.

Plusieurs études ont démontré que l'inactivation du protomère Gαq de la protéine G peut bloquer l'induction de l'hypertrophie *in vivo* par la PE, l'endotheline, l'Ang-II et par une surcharge de pression (195). D'autre part, des publications récentes ont rapporté que plusieurs cascades de signalisation peuvent être impliquées dans la transduction du signal du RCPG jusqu'à l'induction de l'hypertrophie dans des cardiomyocytes en culture (196). La figure 23 résume certaines des voies de signalisation qui peuvent participer à la transduction des effets hypertrophiques de la PE. La PKCδ pourrait être impliquée à différents niveaux de ces voies. Etant donné que nos résultats ont montré que le GMPc inhibe la translocation de PKCδ du cytosol vers la membrane cytoplasmique (Figure 20), cet effet semble constituer une étape importante dans l'action protectrice du GMPc. Cependant, l'inhibition de la translocation des nPKCs pourrait n'être que le résultat d'autres événements moléculaires plus en amont dans la cascade de signalisation. Ainsi, nous avons obtenu des résultats préliminaires montrant que l'apocynine (un inhibiteur spécifique de NADP(H) oxydase) a bloqué l'effet de la PE sur la phosphorylation des résidus thr421/ser424 de la protéine S6K1 (Figure 24).

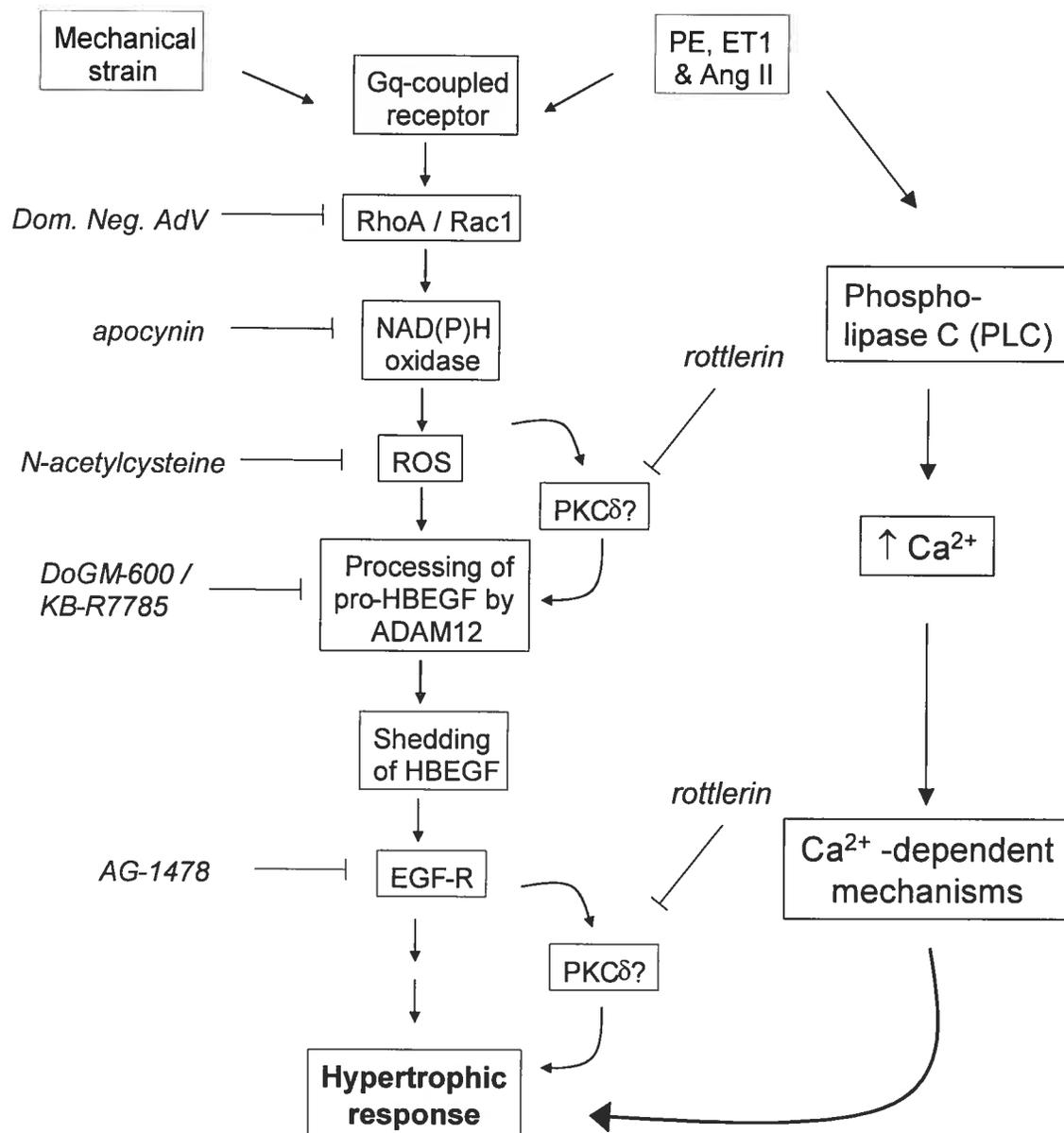


Figure 23: Diagramme montrant les voies de signalisation qui peuvent relier les récepteurs couplés aux protéines Gq à la réponse hypertrophique dans le coeur (195;196).

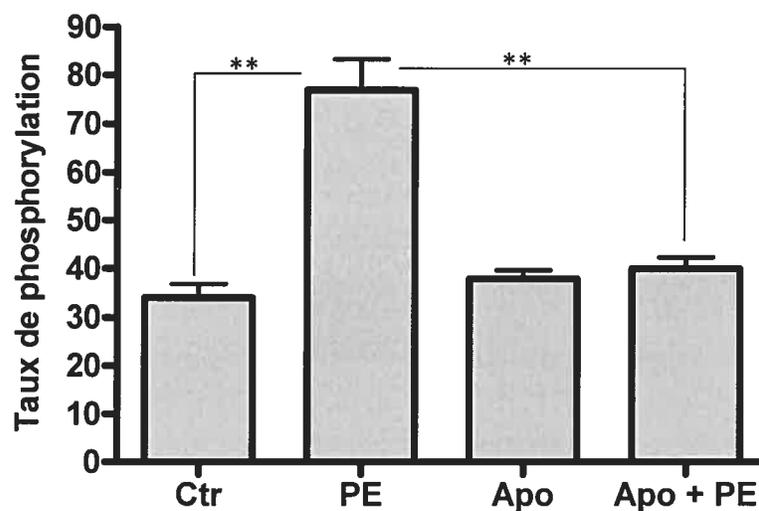


Figure 24 : Effets de l'apocynine sur la phosphorylation des résidus thr421/ser424 de S6K1 après stimulation des cardiomyocytes adultes par la PE. Les histogrammes montrant le taux quantifié en calculant le rapport de l'intensité du signal de la protéine phosphorylée au niveau des résidus (thr421/ser424) par rapport à la protéine totale. Les conditions utilisées étaient les suivantes : des cellules non stimulées (Ctr), des cellules stimulées avec la PE (PE) pour 30min, des cellules traitées avec l'apocynine pour 1h (Apo) et des cellules traitées avec la PE pour 30min après une préincubation avec l'apocynine pour 1h (PE+Apo). Des résultats similaires ont été obtenus à trois reprises indépendantes. Les barres représentent la moyenne \pm SD. ** $p \leq 0,01$.

4.1.1. Les effets du GMPc sur la génération de ROS et l'activation de NADP(H) par la PE dans des cardiomyocytes adultes.

Malgré qu'il existe plusieurs sources de ROS, il semble que la NADP(H) oxydase est la source principale de ROS qui médie les actions de la PE. En effet, nous avons démontré d'une part que l'apocynine (un inhibiteur spécifique de NADP(H) oxydase) bloque l'effet de la PE sur la phosphorylation de la S6K1. D'autre part, le groupe de Sawyer et al. a montré que l'inhibition d'autres systèmes producteurs de ROS (incluant la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie, les cyclooxygénases et les xanthine oxydases) dans des cardiomyocytes adultes n'affecte pas la voie de signalisation de la PE (197). Ainsi, pour déterminer l'implication de NADP(H) oxydase, il nous faudra

(entre autres) mesurer la génération de ROS ainsi que l'activité de NADP(H) dans les mêmes conditions de culture qu'on a utilisées auparavant (\pm PE, \pm 8-Br-GMPc).

La NADP(H) oxydase est un complexe protéique formé de plusieurs sous-unités dont gp91phox et p22phox qui constituent la sous-unité catalytique de l'enzyme. Ces deux sous-unités sont localisées à la membrane cytoplasmique. De plus, le complexe de NADP(H) oxydase comporte les sous-unités p47phox, p67phox et p40phox localisées dans le cytoplasme. L'activation du complexe nécessite la phosphorylation de la sous-unité p47phox et ainsi la translocation de sous-unités cytosoliques vers la membrane cytoplasmique (198). La suite à ce sujet sera donc de tester si : 1) la PE augmente la phosphorylation et la translocation de p47phox et 2) le GMPc peut inhiber cet effet.

4.1.2. Implication de RhoA dans l'effet inhibiteur du GMPc sur la synthèse protéique et la phosphorylation de S6K1 par la PE.

Il a été montré que la protéine à faible poids moléculaire RhoA peut jouer un rôle dans l'induction d'une réponse hypertrophique dans les cardiomyocytes suite à une stimulation par l'ANG-II et la PE (199; 200). Il reste que l'effet de RhoA sur la synthèse des protéines dans les cardiomyocytes n'est pas encore connu. D'autre part, des études ont montré que le GMPc inhibe RhoA dans les cellules musculaires lisses (201). A partir de ces données, une hypothèse qui pourrait être émise est que l'action anti-hypertrophique du GMPc dans les cardiomyocytes adultes puisse être due (du moins en partie) à l'inhibition de RhoA. Afin de vérifier cette hypothèse, il nous faudra déterminer si : 1) le GMPc inhibe RhoA dans les cardiomyocytes adultes; 2) l'expression de la forme active de RhoA dans ces mêmes cellules induit une augmentation de la synthèse protéique ainsi que l'activation et la phosphorylation de S6K1; 3) l'expression d'un dominant négatif de RhoA bloque l'effet de la PE sur la génération de ROS, la phosphorylation de S6K1 et la synthèse des protéines; 4) l'expression de la forme constitutivement active de RhoA abolit les effets du GMPc sur la phosphorylation de S6K1 et la synthèse protéique.

4.2. Tester si le GMPc affecte les régulateurs de la synthèse protéique *in vivo*.

In vitro, l'activation de S6K1 a été étudiée après avoir exposée des cardiomyocytes en culture à la PE ou l'insuline. Les cellules ont été rendues quiescentes par culture en milieu sans sérum. Cette condition expérimentale était nécessaire parce que l'activation des régulateurs de la synthèse protéique se produit typiquement de façon transitoire et qu'il faut au départ des cellules à l'état quiescent pour détecter cette activation. En effet, des régulateurs tels que S6K1 fonctionnent comme des interrupteurs (*switches*) et leurs effets sont amplifiés en aval par des réponses à long terme comme la transcription ou la synthèse des ribosomes (188). A ce sujet, les études ont démontré que S6K1 induit une traduction sélective d'ARNm très particulier possédant à leur extrémité 5' une structure riche en pyrimidine désignée TOP. Ces ARNm codent pour des protéines de la machinerie cellulaire, telles que les protéines ribosomales et les facteurs d'élongation. Ainsi, les effets à long terme de l'activation de S6K1 seront une augmentation du contenu de la cellule en facteurs d'élongation tels que eEF1A et eEF2. Plusieurs études ont mesuré le contenu du coeur en eEF1A et eEF2 dans des conditions expérimentales différentes et ont montré une proportionalité entre le contenu du coeur en ses facteurs, l'activation de S6K1 et le taux de la synthèse de protéines (188;189)

Pour étudier l'effet du GMPc sur les régulateurs de la synthèse protéique *in vivo*, il faudra donc vérifier si le GMPc inhibe la synthèse protéique dans l'environnement natif du coeur. Le modèle qui pourrait être utilisé est celui de souris modifiées génétiquement. En effet, des souris transgéniques qui expriment spécifiquement dans le coeur le domaine actif de la guanylate cyclase ont été faites au laboratoire d'accueil (74). Pour aborder la question posée à cette étape, une HVG sera induite par une surcharge de pression (constriction aortique abdominale) dans les coeurs des souris transgéniques et ceux des souris sauvages. Les animaux vont être tués à des temps différents après la chirurgie pour déterminer le meilleur temps pour détecter une augmentation de la concentration en facteurs d'élongation eEF1A et eEF2. Par la suite, l'expression de ces facteurs dans les souris transgéniques qui ont subi une constriction aortique va être comparée à celle dans les souris sauvages.

5. Conclusion

Les résultats obtenus dans ce mémoire représentent un point de départ pour l'étude des mécanismes d'action responsables de l'effet cardioprotecteur du GMPc. Il existe plusieurs évidences que l'ANF, ou son messenger second le GMPc, inhibent l'hypertrophie cardiaque tant *in vivo* que *in vitro*. Pour identifier comment le GMPc peut inhiber l'hypertrophie, nous avons étudié son effet sur la synthèse de protéines dans des cardiomyocytes de rats adultes. Ainsi, nous avons pu comparer les effets du GMPc sur l'accumulation des protéines nouvellement synthétisées et la phosphorylation de S6K1 soit par la PE, soit par l'insuline. Cette étude nous a permis de conclure que le GMPc inhibe spécifiquement la voie d'activation mTOR-indépendante de S6K1. Des expériences supplémentaires ont montré que le GMPc inhibe la translocation, du cytosol vers la membrane cytoplasmique, de PKC δ et ϵ induite par la PE.

Ces résultats nous ont permis de proposer un des mécanismes par lequel le GMPc peut inhiber l'hypertrophie de cardiomyocytes adultes en culture. En inhibant la translocation de PKC δ et de PKC ϵ du cytosol vers la membrane cytoplasmique, le GMPc inhibe la phosphorylation rapamycine-indépendante de S6K1 et ainsi l'augmentation de la synthèse protéique pouvant survenir après stimulation des récepteurs couplés à G α q. L'implication de deux isoformes de PKC dans la synthèse protéique et la phosphorylation de S6K1 par la PE, sera d'une grande importance à vérifier. Par exemple, il serait intéressant de tester si l'inhibition de PKC δ ou de PKC ϵ , soit par siRNA, soit par un inhibiteur pharmacologique, empêche l'induction de la synthèse protéique par la PE, ainsi que la phosphorylation rapamycine-indépendante de S6K1.

Références

1. Levy,D., Garrison,R.J., Savage,D.D., Kannel,W.B., and Castelli,W.P. 1990. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N.Engl.J.Med.* 322:1561-1566.
2. Devereux,R.B., de Simone,G., Ganau,A., and Roman,M.J. 1994. Left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in hypertension: stimuli, functional consequences and prognostic implications. *J.Hypertens.Suppl* 12:S117-S127.
3. Morgan,H.E., Gordon,E.E., Kira,Y., Chua,H.L., Russo,L.A., Peterson,C.J., McDermott,P.J., and Watson,P.A. 1987. Biochemical mechanisms of cardiac hypertrophy. *Annu.Rev.Physiol* 49:533-543.
4. Frey,N. and Olson,E.N. 2003. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu.Rev.Physiol* 65:45-79.
5. Van Eickels,M., Grohe,C., Cleutjens,J.P., Janssen,B.J., Wellens,H.J., and Doevendans,P.A. 2001. 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation* 104:1419-1423.
6. Selvetella,G., Hirsch,E., Notte,A., Tarone,G., and Lembo,G. 2004. Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: points of convergence and divergence. *Cardiovasc.Res.* 63:373-380.
7. Schluter,K.D. and Wollert,K.C. 2004. Synchronization and integration of multiple hypertrophic pathways in the heart. *Cardiovasc.Res.* 63:367-372.
8. Dorn,G.W., Robbins,J., and Sugden,P.H. 2003. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ.Res.* 92:1171-1175.

9. Takano,H., Zou,Y., Akazawa,H., Toko,H., Mizukami,M., Hasegawa,H., Asakawa,M., Nagai,T., and Komuro,I. 2002. Inhibitory molecules in signal transduction pathways of cardiac hypertrophy. *Hypertens.Res.* 25:491-498.
10. Hardt,S.E. and Sadoshima,J. 2004. Negative regulators of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc.Res.* 63:500-509.
11. Amann,K., Rychlik,I., Miltenberger-Milteny,G., and Ritz,E. 1998. Left ventricular hypertrophy in renal failure. *Kidney Int.Suppl* 68:S78-S85.
12. Lind,L., Andersson,P.E., Andren,B., Hanni,A., and Lithell,H.O. 1995. Left ventricular hypertrophy in hypertension is associated with the insulin resistance metabolic syndrome. *J.Hypertens.* 13:433-438.
13. Post,W.S., Larson,M.G., Myers,R.H., Galderisi,M., and Levy,D. 1997. Heritability of left ventricular mass: the Framingham Heart Study. *Hypertension* 30:1025-1028.
14. Verhaaren,H.A., Schieken,R.M., Mosteller,M., Hewitt,J.K., Eaves,L.J., and Nance,W.E. 1991. Bivariate genetic analysis of left ventricular mass and weight in pubertal twins (the Medical College of Virginia twin study). *Am.J.Cardiol.* 68:661-668.
15. Garner,C., Lecomte,E., Visvikis,S., Abergel,E., Lathrop,M., and Soubrier,F. 2000. Genetic and environmental influences on left ventricular mass. A family study. *Hypertension* 36:740-746.
16. Nunez,D.J., Clifford,C.P., al Mahdawi,S., and Dutka,D. 1996. Hypertensive cardiac hypertrophy--is genetic variance the missing link? *Br.J.Clin.Pharmacol.* 42:107-117.

17. Grossman,W., Jones,D., and McLaurin,L.P. 1975. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J.Clin.Invest* 56:56-64.
18. Smith,S.H. and Bishop,S.P. 1985. Regional myocyte size in compensated right ventricular hypertrophy in the ferret. *J.Mol.Cell Cardiol.* 17:1005-1011.
19. Gerdes,A.M., Campbell,S.E., and Hilbelink,D.R. 1988. Structural remodeling of cardiac myocytes in rats with arteriovenous fistulas. *Lab Invest* 59:857-861.
20. Liu,Z., Hilbelink,D.R., and Gerdes,A.M. 1991. Regional changes in hemodynamics and cardiac myocyte size in rats with aortocaval fistulas. 2. Long-term effects. *Circ.Res.* 69:59-65.
21. Sarsero,D. and Molenaar,P. 1995. Effects of chronic infusion of (-)-isoprenaline on rat cardiac muscarinic (M2)-cholinoceptors and beta 1- and beta 2-adrenoceptors. *J.Auton.Pharmacol.* 15:239-255.
22. Susic,D., Nunez,E., Frohlich,E.D., and Prakash,O. 1996. Angiotensin II increases left ventricular mass without affecting myosin isoform mRNAs. *Hypertension* 28:265-268.
23. Teiger,E., Than,V.D., Richard,L., Wisnewsky,C., Tea,B.S., Gaboury,L., Tremblay,J., Schwartz,K., and Hamet,P. 1996. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J.Clin.Invest* 97:2891-2897.
24. Toffolo,R.L. and Ianuzzo,C.D. 1994. Myofibrillar adaptations during cardiac hypertrophy. *Mol.Cell Biochem.* 131:141-149.
25. Farivar,R.S., Crawford,D.C., Chobanian,A.V., and Brecher,P. 1995. Effect of angiotensin II blockade on the fibroproliferative response to phenylephrine in the rat heart. *Hypertension* 25:809-813.

26. Izumo,S., Nadal-Ginard,B., and Mahdavi,V. 1988. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85:339-343.
27. Chapman,D., Weber,K.T., and Eghbali,M. 1990. Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium. *Circ.Res.* 67:787-794.
28. Michel,J.B., Salzman,J.L., Ossondo,N.M., Bruneval,P., Barres,D., and Camilleri,J.P. 1986. Morphometric analysis of collagen network and plasma perfused capillary bed in the myocardium of rats during evolution of cardiac hypertrophy. *Basic Res.Cardiol.* 81:142-154.
29. Villarreal,F.J. and Dillmann,W.H. 1992. Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF-beta 1, fibronectin, and collagen. *Am.J.Physiol* 262:H1861-H1866.
30. Calderone,A., Takahashi,N., Izzo,N.J., Jr., Thaik,C.M., and Colucci,W.S. 1995. Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation* 92:2385-2390.
31. Kim,S., Ohta,K., Hamaguchi,A., Yukimura,T., Miura,K., and Iwao,H. 1995. Angiotensin II induces cardiac phenotypic modulation and remodeling in vivo in rats. *Hypertension* 25:1252-1259.
32. Omura,T., Kim,S., Takeuchi,K., Iwao,H., and Takeda,T. 1994. Transforming growth factor beta 1 and extracellular matrix gene expression in isoprenaline induced cardiac hypertrophy: effects of inhibition of the renin-angiotensin system. *Cardiovasc.Res.* 28:1835-1842.

33. Chusho,H., Ogawa,Y., Tamura,N., Suda,M., Yasoda,A., Miyazawa,T., Kishimoto,I., Komatsu,Y., Itoh,H., Tanaka,K. *et al.* 2000. Genetic models reveal that brain natriuretic peptide can signal through different tissue-specific receptor-mediated pathways. *Endocrinology* 141:3807-3813.
34. Ogawa,Y., Itoh,H., and Nakao,K. 1995. Molecular biology and biochemistry of natriuretic peptide family. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 22:49-53.
35. Rosenzweig,A. and Seidman,C.E. 1991. Atrial natriuretic factor and related peptide hormones. *Annu.Rev.Biochem.* 60:229-255.
36. Chinkers,M. and Garbers,D.L. 1991. Signal transduction by guanylyl cyclases. *Annu.Rev.Biochem.* 60:553-575.
37. Nakao,K., Ogawa,Y., Suga,S., and Imura,H. 1992. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. II: Natriuretic peptide receptors. *J.Hypertens.* 10:1111-1114.
38. Suzuki,T., Yamazaki,T., and Yazaki,Y. 2001. The role of the natriuretic peptides in the cardiovascular system. *Cardiovasc.Res.* 51:489-494.
39. Koller,K.J., Lowe,D.G., Bennett,G.L., Minamino,N., Kangawa,K., Matsuo,H., and Goeddel,D.V. 1991. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* 252:120-123.
40. Susa,M., Vulevic,D., Lane,H.A., and Thomas,G. 1992. Inhibition or down-regulation of protein kinase C attenuates late phase p70s6k activation induced by epidermal growth factor but not by platelet-derived growth factor or insulin. *J.Biol.Chem.* 267:6905-6909.

41. Komatsu, Y., Nakao, K., Suga, S., Ogawa, Y., Mukoyama, M., Arai, H., Shirakami, G., Hosoda, K., Nakagawa, O., Hama, N. *et al.* 1991. C-type natriuretic peptide (CNP) in rats and humans. *Endocrinology* 129:1104-1106.
42. Suga, S., Nakao, K., Hosoda, K., Mukoyama, M., Ogawa, Y., Shirakami, G., Arai, H., Saito, Y., Kambayashi, Y., Inouye, K. *et al.* 1992. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 130:229-239.
43. Potter, L.R. and Hunter, T. 2001. Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation. *J. Biol. Chem.* 276:6057-6060.
44. Henry, J.P., Gauer, O.H., and Reeves, J.L. 1956. Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow. *Circ. Res.* 4:85-90.
45. Jamieson, J.D. and Palade, G.E. 1964. Specific granules in atrial muscle cells *J. Cell Biol.* 23:151-172.
46. Silberbach, M. and Roberts, C.T., Jr. 2001. Natriuretic peptide signalling: molecular and cellular pathways to growth regulation. *Cell Signal.* 13:221-231.
47. Kishimoto, I., Rossi, K., and Garbers, D.L. 2001. 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.
48. Ruskoaho, H. 1992. Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism. *Pharmacol. Rev.* 44:479-602.
49. Sonnenberg, H., Chong, C.K., and Veress, A.T. 1981. Cardiac atrial factor--an endogenous diuretic? *Can. J. Physiol Pharmacol.* 59:1278-1279.

50. Chien,R. 1992. Signaling mechanisms for the activation of an embryonic gene program during the hypertrophy of cardiac ventricular muscle. *Basic Res.Cardiol.* 87 Suppl 2:49-58.
51. Thibault,G., Amiri,F., and Garcia,R. 1999. Regulation of natriuretic peptide secretion by the heart. *Annu.Rev.Physiol* 61:193-217.
52. Calderone,A., Thaik,C.M., Takahashi,N., Chang,D.L., and Colucci,W.S. 1998. Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J.Clin.Invest* 101:812-818.
53. Deschepper,C.F., Masciotra,S., Zahabi,A., Boutin-Ganache,I., Picard,S., and Reudelhuber,T.L. 2001. Functional alterations of the Nppa promoter are linked to cardiac ventricular hypertrophy in WKY/WKHA rat crosses. *Circ.Res.* 88:223-228.
54. Masciotra,S., Picard,S., and Deschepper,C.F. 1999. Cosegregation analysis in genetic crosses suggests a protective role for atrial natriuretic factor against ventricular hypertrophy. *Circ.Res.* 84:1453-1458.
55. John,S.W., Kregge,J.H., Oliver,P.M., Hagaman,J.R., Hodgins,J.B., Pang,S.C., Flynn,T.G., and Smithies,O. 1995. Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension. *Science* 267:679-681.
56. Knowles,J.W., Esposito,G., Mao,L., Hagaman,J.R., Fox,J.E., Smithies,O., Rockman,H.A., and Maeda,N. 2001. Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice. *J.Clin.Invest* 107:975-984.
57. Oliver,P.M., Fox,J.E., Kim,R., Rockman,H.A., Kim,H.S., Reddick,R.L., Pandey,K.N., Milgram,S.L., Smithies,O., and Maeda,N. 1997. Hypertension,

cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:14730-14735.

58. Tavi,P., Laine,M., Weckstrom,M., and Ruskoaho,H. 2001. Cardiac mechanotransduction: from sensing to disease and treatment. *Trends Pharmacol.Sci.* 22:254-260.
59. Horio,T., Nishikimi,T., Yoshihara,F., Matsuo,H., Takishita,S., and Kangawa,K. 2000. Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. *Hypertension* 35:19-24.
60. Rosenkranz,A.C., Woods,R.L., Dusting,G.J., and Ritchie,R.H. 2003. Antihypertrophic actions of the natriuretic peptides in adult rat cardiomyocytes: importance of cyclic GMP. *Cardiovasc.Res.* 57:515-522.
61. Lincoln,T.M. and Cornwell,T.L. 1993. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J.* 7:328-338.
62. Carvajal,J.A., Germain,A.M., Huidobro-Toro,J.P., and Weiner,C.P. 2000. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J.Cell Physiol* 184:409-420.
63. Hofmann,F., Ammendola,A., and Schlossmann,J. 2000. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J.Cell Sci.* 113 (Pt 10):1671-1676.
64. Lohmann,S.M., Vaandrager,A.B., Smolenski,A., Walter,U., and De Jonge,H.R. 1997. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem.Sci.* 22:307-312.
65. Tajima,M., Bartunek,J., Weinberg,E.O., Ito,N., and Lorell,B.H. 1998. Atrial natriuretic peptide has different effects on contractility and intracellular pH in

normal and hypertrophied myocytes from pressure-overloaded hearts. *Circulation* 98:2760-2764.

66. Wegener, J.W., Nawrath, H., Wolfsgruber, W., Kuhbandner, S., Werner, C., Hofmann, F., and Feil, R. 2002. cGMP-dependent protein kinase I mediates the negative inotropic effect of cGMP in the murine myocardium. *Circ.Res.* 90:18-20.
67. Straznicka, M., Gong, G., Tse, J., Scholz, P.M., and Weiss, H.R. 1997. cGMP level that reduces cardiac myocyte O₂ consumption is altered in renal hypertension. *Am.J.Physiol* 273:H1949-H1955.
68. Bergemann, C., Loken, C., Becker, C., Graf, B., Hamidizadeh, M., and Fischer, Y. 2001. Inhibition of glucose transport by cyclic GMP in cardiomyocytes. *Life Sci.* 69:1391-1406.
69. Depre, C., Gaussin, V., Ponchaut, S., Fischer, Y., Vanoverschelde, J.L., and Hue, L. 1998. Inhibition of myocardial glucose uptake by cGMP. *Am.J.Physiol* 274:H1443-H1449.
70. Kirstein, M., Rivet-Bastide, M., Hatem, S., Benardeau, A., Mercadier, J.J., and Fischmeister, R. 1995. Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human atrial myocytes. *J.Clin.Invest* 95:794-802.
71. Wahler, G.M. and Dollinger, S.J. 1995. Nitric oxide donor SIN-1 inhibits mammalian cardiac calcium current through cGMP-dependent protein kinase. *Am.J.Physiol* 268:C45-C54.
72. Silberbach, M., Gorenc, T., Hershberger, R.E., Stork, P.J., Steyger, P.S., and Roberts, C.T., Jr. 1999. Extracellular signal-regulated protein kinase activation is

required for the anti-hypertrophic effect of atrial natriuretic factor in neonatal rat ventricular myocytes. *J.Biol.Chem.* 274:24858-24864.

73. Fiedler,B., Lohmann,S.M., Smolenski,A., Linnemuller,S., Pieske,B., Schroder,F., Molkentin,J.D., Drexler,H., and Wollert,K.C. 2002. Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:11363-11368.
74. Zahabi,A., Picard,S., Fortin,N., Reudelhuber,T.L., and Deschepper,C.F. 2003. Expression of constitutively active guanylate cyclase in cardiomyocytes inhibits the hypertrophic effects of isoproterenol and aortic constriction on mouse hearts. *J.Biol.Chem.* 278:47694-47699.
75. Sugden,P.H. and Clerk,A. 1998. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J.Mol.Med.* 76:725-746.
76. Bommer,U.A., Noll,F., Lutsch,G., and Bielka,H. 1980. Immunochemical detection of proteins in the small subunit of rat liver ribosomes involved in binding of the ternary initiation complex. *FEBS Lett.* 111:171-174.
77. Hershey,J.W., Asano,K., Naranda,T., Vornlocher,H.P., Hanachi,P., and Merrick,W.C. 1996. Conservation and diversity in the structure of translation initiation factor EIF3 from humans and yeast. *Biochimie* 78:903-907.
78. Clemens,M.J. and Bommer,U.A. 1999. Translational control: the cancer connection. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 31:1-23.
79. Sugden,P.H. and Fuller,S.J. 1991. Regulation of protein turnover in skeletal and cardiac muscle. *Biochem.J.* 273(Pt 1):21-37.
80. Pain,V.M. 1996. Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur.J.Biochem.* 236:747-771.

81. Shah,O.J., Anthony,J.C., Kimball,S.R., and Jefferson,L.S. 2000. 4E-BP1 and S6K1: translational integration sites for nutritional and hormonal information in muscle. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 279:E715-E729.
82. Gingras,A.C., Raught,B., and Sonenberg,N. 2001. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* 15:807-826.
83. Clark,W.A., Rudnick,S.J., Simpson,D.G., LaPres,J.J., and Decker,R.S. 1993. Cultured adult cardiac myocytes maintain protein synthetic capacity of intact adult hearts. *Am.J.Physiol* 264:H573-H582.
84. Erikson,R.L. 1991. Structure, expression, and regulation of protein kinases involved in the phosphorylation of ribosomal protein S6. *J.Biol.Chem.* 266:6007-6010.
85. Moser,B.A., Dennis,P.B., Pullen,N., Pearson,R.B., Williamson,N.A., Wettenhall,R.E., Kozma,S.C., and Thomas,G. 1997. Dual requirement for a newly identified phosphorylation site in p70s6k. *Mol.Cell Biol.* 17:5648-5655.
86. Li,M., Li,C., and Parkhouse,W.S. 2002. Differential effects of des IGF-1 on Erks, AKT-1 and P70 S6K activation in mouse skeletal and cardiac muscle. *Mol.Cell Biochem.* 236:115-122.
87. Terao,K. and Ogata,K. 1979. Proteins of small subunits of rat liver ribosomes that interact with poly(U). II. Cross-links between poly(U) and ribosomal proteins in 40 S subunits induced by UV irradiation. *J.Biochem.(Tokyo)* 86:605-617.
88. Terao,K. and Ogata,K. 1979. Proteins of small subunits of rat liver ribosomes that interact with poly(U). I. Effects of preincubation of poly(U) with 40 S subunits on the interactions of 40 S subunit proteins with aurintricarboxylic acid and with N,N'-p-phenylenedimaleimide. *J.Biochem.(Tokyo)* 86:597-603.

89. Tolan,D.R. and Traut,R.R. 1981. Protein topography of the 40 S ribosomal subunit from rabbit reticulocytes shown by cross-linking with 2-iminothiolane. *J.Biol.Chem.* 256:10129-10136.
90. Hannan,R.D. and Rothblum,L.I. 1995. Regulation of ribosomal DNA transcription during neonatal cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc.Res.* 30:501-510.
91. Saitoh,M., Pullen,N., Brennan,P., Cantrell,D., Dennis,P.B., and Thomas,G. 2002. Regulation of an activated S6 kinase 1 variant reveals a novel mammalian target of rapamycin phosphorylation site. *J.Biol.Chem.* 277:20104-20112.
92. Volarevic,S. and Thomas,G. 2001. Role of S6 phosphorylation and S6 kinase in cell growth. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* 65:101-127.
93. Thomas,G. 2002. The S6 kinase signaling pathway in the control of development and growth. *Biol.Res.* 35:305-313.
94. Laser,M., Kasi,V.S., Hamawaki,M., Cooper,G., Kerr,C.M., and Kuppaswamy,D. 1998. Differential activation of p70 and p85 S6 kinase isoforms during cardiac hypertrophy in the adult mammal. *J.Biol.Chem.* 273:24610-24619.
95. Eguchi,S., Iwasaki,H., Ueno,H., Frank,G.D., Motley,E.D., Eguchi,K., Marumo,F., Hirata,Y., and Inagami,T. 1999. Intracellular signaling of angiotensin II-induced p70 S6 kinase phosphorylation at Ser(411) in vascular smooth muscle cells. Possible requirement of epidermal growth factor receptor, Ras, extracellular signal-regulated kinase, and Akt. *J.Biol.Chem.* 274:36843-36851.
96. Iijima,Y., Laser,M., Shiraishi,H., Willey,C.D., Sundaravadivel,B., Xu,L., McDermott,P.J., and Kuppaswamy,D. 2002. c-Raf/MEK/ERK pathway controls

protein kinase C-mediated p70S6K activation in adult cardiac muscle cells. *J.Biol.Chem.* 277:23065-23075.

97. Phin,S., Kupferwasser,D., Lam,J., and Lee-Fruman,K.K. 2003. Mutational analysis of ribosomal S6 kinase 2 shows differential regulation of its kinase activity from that of ribosomal S6 kinase 1. *Biochem.J.* 373:583-591.
98. Weng,Q.P., Kozlowski,M., Belham,C., Zhang,A., Comb,M.J., and Avruch,J. 1998. Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific anti-phosphopeptide antibodies. *J.Biol.Chem.* 273:16621-16629.
99. Pearson,R.B., Dennis,P.B., Han,J.W., Williamson,N.A., Kozma,S.C., Wettenhall,R.E., and Thomas,G. 1995. The principal target of rapamycin-induced p70s6k inactivation is a novel phosphorylation site within a conserved hydrophobic domain. *EMBO J.* 14:5279-5287.
100. Ferrari,S., Bannwarth,W., Morley,S.J., Totty,N.F., and Thomas,G. 1992. Activation of p70s6k is associated with phosphorylation of four clustered sites displaying Ser/Thr-Pro motifs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:7282-7286.
101. Dufner,A. and Thomas,G. 1999. Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp.Cell Res.* 253:100-109.
102. Pullen,N. and Thomas,G. 1997. The modular phosphorylation and activation of p70s6k. *FEBS Lett.* 410:78-82.
103. Hannan,K.M., Thomas,G., and Pearson,R.B. 2003. Activation of S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1) requires an initial calcium-dependent priming event involving formation of a high-molecular-mass signalling complex. *Biochem.J.* 370:469-477.

104. Wang,X. and Proud,C.G. 1997. p70 S6 kinase is activated by sodium arsenite in adult rat cardiomyocytes: roles for phosphatidylinositol 3-kinase and p38 MAP kinase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 238:207-212.
105. Park,I.H., Bachmann,R., Shirazi,H., and Chen,J. 2002. Regulation of ribosomal S6 kinase 2 by mammalian target of rapamycin. *J.Biol.Chem.* 277:31423-31429.
106. Molkenin,J.D. and Dorn II,G.W. 2001. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu.Rev.Physiol* 63:391-426.
107. Hunter,J.J. and Chien,K.R. 1999. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N.Engl.J.Med.* 341:1276-1283.
108. Yamazaki,T. and Yazaki,Y. 2000. Molecular basis of cardiac hypertrophy. *Z.Kardiol.* 89:1-6.
109. Lefkowitz,R.J. 2000. The superfamily of heptahelical receptors. *Nat.Cell Biol.* 2:E133-E136.
110. Lefkowitz,R.J., Rockman,H.A., and Koch,W.J. 2000. Catecholamines, cardiac beta-adrenergic receptors, and heart failure. *Circulation* 101:1634-1637.
111. Crespo,P., Xu,N., Simonds,W.F., and Gutkind,J.S. 1994. Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 369:418-420.
112. Simon,M.I., Strathmann,M.P., and Gautam,N. 1991. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252:802-808.
113. Pedram,A., Razandi,M., Kehrl,J., and Levin,E.R. 2000. Natriuretic peptides inhibit G protein activation. Mediation through cross-talk between cyclic GMP-

- dependent protein kinase and regulators of G protein-signaling proteins. *J.Biol.Chem.* 275:7365-7372.
114. Koch,W.J., Lefkowitz,R.J., and Rockman,H.A. 2000. Functional consequences of altering myocardial adrenergic receptor signaling. *Annu.Rev.Physiol* 62:237-260.
 115. Esposito,G., Prasad,S.V., Rapacciuolo,A., Mao,L., Koch,W.J., and Rockman,H.A. 2001. Cardiac overexpression of a G(q) inhibitor blocks induction of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase activity in in vivo pressure overload. *Circulation* 103:1453-1458.
 116. Simpson,P., McGrath,A., and Savion,S. 1982. Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circ.Res.* 51:787-801.
 117. Simpson,P. 1983. Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha 1 adrenergic response. *J.Clin.Invest* 72:732-738.
 118. LaMorte,V.J., Thorburn,J., Absher,D., Spiegel,A., Brown,J.H., Chien,K.R., Feramisco,J.R., and Knowlton,K.U. 1994. Gq- and ras-dependent pathways mediate hypertrophy of neonatal rat ventricular myocytes following alpha 1-adrenergic stimulation. *J.Biol.Chem.* 269:13490-13496.
 119. Ramirez,M.T., Post,G.R., Sulakhe,P.V., and Brown,J.H. 1995. M1 muscarinic receptors heterologously expressed in cardiac myocytes mediate Ras-dependent changes in gene expression. *J.Biol.Chem.* 270:8446-8451.
 120. D'Angelo,D.D., Sakata,Y., Lorenz,J.N., Boivin,G.P., Walsh,R.A., Liggett,S.B., and Dorn,G.W. 1997. Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:8121-8126.

121. Sakata,Y., Hoit,B.D., Liggett,S.B., Walsh,R.A., and Dorn,G.W. 1998. Decompensation of pressure-overload hypertrophy in G alpha q-overexpressing mice. *Circulation* 97:1488-1495.
122. Akhter,S.A., Luttrell,L.M., Rockman,H.A., Iaccarino,G., Lefkowitz,R.J., and Koch,W.J. 1998. Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science* 280:574-577.
123. Rogers,J.H., Tamirisa,P., Kovacs,A., Weinheimer,C., Courtois,M., Blumer,K.J., Kelly,D.P., and Muslin,A.J. 1999. RGS4 causes increased mortality and reduced cardiac hypertrophy in response to pressure overload. *J.Clin.Invest* 104:567-576.
124. Marinissen,M.J. and Gutkind,J.S. 2001. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol.Sci.* 22:368-376.
125. Ren,J., Samson,W.K., and Sowers,J.R. 1999. Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease. *J.Mol.Cell Cardiol.* 31:2049-2061.
126. Oudit,G.Y., Crackower,M.A., Eriksson,U., Sarao,R., Kozieradzki,I., Sasaki,T., Irie-Sasaki,J., Gidrewicz,D., Rybin,V.O., Wada,T. *et al.* 2003. Phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient mice are protected from isoproterenol-induced heart failure. *Circulation* 108:2147-2152.
127. Naga Prasad,S.V., Esposito,G., Mao,L., Koch,W.J., and Rockman,H.A. 2000. Gbetagamma-dependent phosphoinositide 3-kinase activation in hearts with in vivo pressure overload hypertrophy. *J.Biol.Chem.* 275:4693-4698.
128. Schluter,K.D., Simm,A., Schafer,M., Taimor,G., and Piper,H.M. 1999. Early response kinase and PI 3-kinase activation in adult cardiomyocytes and their role in hypertrophy. *Am.J.Physiol* 276:H1655-H1663.

129. Shioi,T., McMullen,J.R., Tarnavski,O., Converso,K., Sherwood,M.C., Manning,W.J., and Izumo,S. 2003. Rapamycin attenuates load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation* 107:1664-1670.
130. Schmelzle,T. and Hall,M.N. 2000. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103:253-262.
131. Thomas,G. and Hall,M.N. 1997. TOR signalling and control of cell growth. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9:782-787.
132. Shioi,T., Kang,P.M., Douglas,P.S., Hampe,J., Yballe,C.M., Lawitts,J., Cantley,L.C., and Izumo,S. 2000. The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J.* 19:2537-2548.
133. Sadoshima,J. and Izumo,S. 1995. Rapamycin selectively inhibits angiotensin II-induced increase in protein synthesis in cardiac myocytes in vitro. Potential role of 70-kD S6 kinase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circ.Res.* 77:1040-1052.
134. Boluyt,M.O., Zheng,J.S., Younes,A., Long,X., O'Neill,L., Silverman,H., Lakatta,E.G., and Crow,M.T. 1997. Rapamycin inhibits alpha 1-adrenergic receptor-stimulated cardiac myocyte hypertrophy but not activation of hypertrophy-associated genes. Evidence for involvement of p70 S6 kinase. *Circ.Res.* 81:176-186.
135. Jefferies,H.B., Fumagalli,S., Dennis,P.B., Reinhard,C., Pearson,R.B., and Thomas,G. 1997. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J.* 16:3693-3704.
136. Clerk,A. and Sugden,P.H. 2000. Small guanine nucleotide-binding proteins and myocardial hypertrophy. *Circ.Res.* 86:1019-1023.

137. Abdellatif,M., Packer,S.E., Michael,L.H., Zhang,D., Charng,M.J., and Schneider,M.D. 1998. A Ras-dependent pathway regulates RNA polymerase II phosphorylation in cardiac myocytes: implications for cardiac hypertrophy. *Mol.Cell Biol.* 18:6729-6736.
138. Pracyk,J.B., Tanaka,K., Hegland,D.D., Kim,K.S., Sethi,R., Rovira,I.I., Blazina,D.R., Lee,L., Bruder,J.T., Kovetski,I. *et al.* 1998. A requirement for the rac1 GTPase in the signal transduction pathway leading to cardiac myocyte hypertrophy. *J.Clin.Invest* 102:929-937.
139. Garrington,T.P. and Johnson,G.L. 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr.Opin.Cell Biol.* 11:211-218.
140. Sugden,P.H. and Clerk,A. 1998. "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ.Res.* 83:345-352.
141. Glennon,P.E., Kaddoura,S., Sale,E.M., Sale,G.J., Fuller,S.J., and Sugden,P.H. 1996. Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes. *Circ.Res.* 78:954-961.
142. Clerk,A., Michael,A., and Sugden,P.H. 1998. Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists, endothelin-1 and phenylephrine: a role in cardiac myocyte hypertrophy? *J.Cell Biol.* 142:523-535.
143. Thorburn,J., Frost,J.A., and Thorburn,A. 1994. Mitogen-activated protein kinases mediate changes in gene expression, but not cytoskeletal organization associated with cardiac muscle cell hypertrophy. *J.Cell Biol.* 126:1565-1572.

144. Thorburn,J., McMahon,M., and Thorburn,A. 1994. Raf-1 kinase activity is necessary and sufficient for gene expression changes but not sufficient for cellular morphology changes associated with cardiac myocyte hypertrophy. *J.Biol.Chem.* 269:30580-30586.
145. Thorburn,J., Xu,S., and Thorburn,A. 1997. MAP kinase- and Rho-dependent signals interact to regulate gene expression but not actin morphology in cardiac muscle cells. *EMBO J.* 16:1888-1900.
146. Nemoto,S., Sheng,Z., and Lin,A. 1998. Opposing effects of Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinases on cardiomyocyte hypertrophy. *Mol.Cell Biol.* 18:3518-3526.
147. Zechner,D., Thuerauf,D.J., Hanford,D.S., McDonough,P.M., and Glembotski,C.C. 1997. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in myocardial cell growth, sarcomeric organization, and cardiac-specific gene expression. *J.Cell Biol.* 139:115-127.
148. Wang,Y., Huang,S., Sah,V.P., Ross,J., Jr., Brown,J.H., Han,J., and Chien,K.R. 1998. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J.Biol.Chem.* 273:2161-2168.
149. Choukroun,G., Hajjar,R., Kyriakis,J.M., Bonventre,J.V., Rosenzweig,A., and Force,T. 1998. Role of the stress-activated protein kinases in endothelin-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J.Clin.Invest* 102:1311-1320.
150. Hines,W.A., Thorburn,J., and Thorburn,A. 1999. Cell density and contraction regulate p38 MAP kinase-dependent responses in neonatal rat cardiac myocytes. *Am.J.Physiol* 277:H331-H341.

151. Bogoyevitch, M.A., Gillespie-Brown, J., Ketterman, A.J., Fuller, S.J., Ben Levy, R., Ashworth, A., Marshall, C.J., and Sugden, P.H. 1996. Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ.Res.* 79:162-173.
152. Ramirez, M.T., Sah, V.P., Zhao, X.L., Hunter, J.J., Chien, K.R., and Brown, J.H. 1997. The MEKK-JNK pathway is stimulated by alpha1-adrenergic receptor and ras activation and is associated with in vitro and in vivo cardiac hypertrophy. *J.Biol.Chem.* 272:14057-14061.
153. Nishizuka, Y. 1986. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233:305-312.
154. Disatnik, M.H., Buraggi, G., and Mochly-Rosen, D. 1994. Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes. *Exp.Cell Res.* 210:287-297.
155. Mochly-Rosen, D. 1995. Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* 268:247-251.
156. Disatnik, M.H., Jones, S.N., and Mochly-Rosen, D. 1995. Stimulus-dependent subcellular localization of activated protein kinase C; a study with acidic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta 1 in cardiac myocytes. *J.Mol.Cell Cardiol.* 27:2473-2481.
157. Klee, C.B., Ren, H., and Wang, X. 1998. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J.Biol.Chem.* 273:13367-13370.
158. Antos, C.L., McKinsey, T.A., Frey, N., Kutschke, W., McAnally, J., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Hill, J.A., and Olson, E.N. 2002. Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:907-912.

159. Crabtree,G.R. 1999. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell* 96:611-614.
160. Haq,S., Choukroun,G., Kang,Z.B., Ranu,H., Matsui,T., Rosenzweig,A., Molkentin,J.D., Alessandrini,A., Woodgett,J., Hajjar,R. *et al.* 2000. Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *J.Cell Biol.* 151:117-130.
161. Chien,K.R., Zhu,H., Knowlton,K.U., Miller-Hance,W., van Bilsen,M., O'Brien,T.X., and Evans,S.M. 1993. Transcriptional regulation during cardiac growth and development. *Annu.Rev.Physiol* 55:77-95.
162. Clerk,A. and Sugden,P.H. 1999. Activation of protein kinase cascades in the heart by hypertrophic G protein-coupled receptor agonists. *Am.J.Cardiol.* 83:64H-69H.
163. Schaub,M.C., Hefti,M.A., Harder,B.A., and Eppenberger,H.M. 1997. Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *J.Mol.Med.* 75:901-920.
164. Clerk,A., Bogoyevitch,M.A., Anderson,M.B., and Sugden,P.H. 1994. Differential activation of protein kinase C isoforms by endothelin-1 and phenylephrine and subsequent stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases in ventricular myocytes cultured from neonatal rat hearts. *J.Biol.Chem.* 269:32848-32857.
165. Wang,L., Rolfe,M., and Proud,C.G. 2003. Ca⁽²⁺⁾-independent protein kinase C activity is required for alpha1-adrenergic-receptor-mediated regulation of ribosomal protein S6 kinases in adult cardiomyocytes. *Biochem.J.* 373:603-611.

166. Puceat,M., Hilal-Dandan,R., Strulovici,B., Brunton,L.L., and Brown,J.H. 1994. Differential regulation of protein kinase C isoforms in isolated neonatal and adult rat cardiomyocytes. *J.Biol.Chem.* 269:16938-16944.
167. Romanelli,A., Martin,K.A., Toker,A., and Blenis,J. 1999. p70 S6 kinase is regulated by protein kinase Czeta and participates in a phosphoinositide 3-kinase-regulated signalling complex. *Mol.Cell Biol.* 19:2921-2928.
168. Valovka,T., Verdier,F., Cramer,R., Zhyvoloup,A., Fenton,T., Rebholz,H., Wang,M.L., Gzhegotsky,M., Lutsyk,A., Matsuka,G. *et al.* 2003. Protein kinase C phosphorylates ribosomal protein S6 kinase betaII and regulates its subcellular localization. *Mol.Cell Biol.* 23:852-863.
169. Pawson,T. and Nash,P. 2000. Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev.* 14:1027-1047.
170. Kumar,V., Pandey,P., Sabatini,D., Kumar,M., Majumder,P.K., Bharti,A., Carmichael,G., Kufe,D., and Kharbanda,S. 2000. Functional interaction between RAFT1/FRAP/mTOR and protein kinase cdelta in the regulation of cap-dependent initiation of translation. *EMBO J.* 19:1087-1097.
171. Clerk,A., Pham,F.H., Fuller,S.J., Sahai,E., Aktories,K., Marais,R., Marshall,C., and Sugden,P.H. 2001. Regulation of mitogen-activated protein kinases in cardiac myocytes through the small G protein Rac1. *Mol.Cell Biol.* 21:1173-1184.
172. Komuro,I., Kudo,S., Yamazaki,T., Zou,Y., Shiojima,I., and Yazaki,Y. 1996. Mechanical stretch activates the stress-activated protein kinases in cardiac myocytes. *FASEB J.* 10:631-636.

173. Sugden,P.H. and Clerk,A. 1998. Regulation of mitogen-activated protein kinase cascades in the heart. *Adv.Enzyme Regul.* 38:87-98.
174. Yano,M., Kim,S., Izumi,Y., Yamanaka,S., and Iwao,H. 1998. Differential activation of cardiac c-jun amino-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase in angiotensin II-mediated hypertension. *Circ.Res.* 83:752-760.
175. Fuller,S.J., Davies,E.L., Gillespie-Brown,J., Sun,H., and Tonks,N.K. 1997. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 inhibits the stimulation of gene expression by hypertrophic agonists in cardiac myocytes. *Biochem.J.* 323:313-319.
176. Barron,A.J., Finn,S.G., and Fuller,S.J. 2003. Chronic activation of extracellular-signal-regulated protein kinases by phenylephrine is required to elicit a hypertrophic response in cardiac myocytes. *Biochem.J.* 371:71-79.
177. Wang,L. and Proud,C.G. 2002. Ras/Erk signaling is essential for activation of protein synthesis by Gq protein-coupled receptor agonists in adult cardiomyocytes. *Circ.Res.* 91:821-829.
178. Wang,L., Gout,I., and Proud,C.G. 2001. Cross-talk between the ERK and p70 S6 kinase (S6K) signaling pathways. MEK-dependent activation of S6K2 in cardiomyocytes. *J.Biol.Chem.* 276:32670-32677.
179. Wang,L., Wang,X., and Proud,C.G. 2000. Activation of mRNA translation in rat cardiac myocytes by insulin involves multiple rapamycin-sensitive steps. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 278:H1056-H1068.
180. Schluter,K.D., Millar,B.C., McDermott,B.J., and Piper,H.M. 1995. Regulation of protein synthesis and degradation in adult ventricular cardiomyocytes. *Am.J.Physiol* 269:C1347-C1355.

181. Gu,X.H., Ou,R.C., Casley,D.J., Daly,M.J., and Nayler,W.G. 1992. Effect of age on endothelin-1 binding sites in rat cardiac ventricular membranes. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 19:764-769.
182. Schaffer,W. and Williams,R.S. 1986. Age-dependent changes in expression of alpha 1-adrenergic receptors in rat myocardium. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 138:387-391.
183. Takahashi,T., Schunkert,H., Isoyama,S., Wei,J.Y., Nadal-Ginard,B., Grossman,W., and Izumo,S. 1992. Age-related differences in the expression of proto-oncogene and contractile protein genes in response to pressure overload in the rat myocardium. *J.Clin.Invest* 89:939-946.
184. Simpson,P. and Savion,S. 1982. Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells. Cross-striations, ultrastructure, and chronotropic response to isoproterenol. *Circ.Res.* 50:101-116.
185. Spahr,R., Jacobson,S.L., Siegmund,B., Schwartz,P., and Piper,H.M. 1989. Substrate oxidation by adult cardiomyocytes in long-term primary culture. *J.Mol.Cell Cardiol.* 21:175-185.
186. Kasten,F.H. 1972. Rat myocardial cells in vitro: mitosis and differentiated properties. *In Vitro* 8:128-150.
187. Schwarzfeld,T.A. and Jacobson,S.L. 1981. Isolation and development in cell culture of myocardial cells of the adult rat. *J.Mol.Cell Cardiol.* 13:563-575.
188. Meyuhas,O. 2000. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur.J.Biochem.* 267:6321-6330.

189. Vary,T.C., Nairn,A.C., and Lang,C.H. 2004. Restoration of protein synthesis in heart and skeletal muscle after withdrawal of alcohol. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 28:517-525.
190. Sugimoto,T., Haneda,M., Togawa,M., Isono,M., Shikano,T., Araki,S., Nakagawa,T., Kashiwagi,A., Guan,K.L., and Kikkawa,R. 1996. Atrial natriuretic peptide induces the expression of MKP-1, a mitogen-activated protein kinase phosphatase, in glomerular mesangial cells. *J.Biol.Chem.* 271:544-547.
191. Hannken,T., Schroeder,R., Stahl,R.A., and Wolf,G. 2001. Atrial natriuretic peptide attenuates ANG II-induced hypertrophy of renal tubular cells. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 281:F81-F90.
192. Weber,N.C., Blumenthal,S.B., Hartung,T., Vollmar,A.M., and Kiemer,A.K. 2003. ANP inhibits TNF-alpha-induced endothelial MCP-1 expression--involvement of p38 MAPK and MKP-1. *J.Leukoc.Biol.* 74:932-941.
193. Bueno,O.F., De Windt,L.J., Lim,H.W., Tymitz,K.M., Witt,S.A., Kimball,T.R., and Molkentin,J.D. 2001. The dual-specificity phosphatase MKP-1 limits the cardiac hypertrophic response in vitro and in vivo. *Circ.Res.* 88:88-96.
194. Hayashi,D., Kudoh,S., Shiojima,I., Zou,Y., Harada,K., Shimoyama,M., Imai,Y., Monzen,K., Yamazaki,T., Yazaki,Y. *et al.* 2004. Atrial natriuretic peptide inhibits cardiomyocyte hypertrophy through mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 322:310-319.
195. Xiao,L., Pimentel,D.R., Wang,J., Singh,K., Colucci,W.S., and Sawyer,D.B. 2002. Role of reactive oxygen species and NAD(P)H oxidase in alpha(1)-adrenoceptor signaling in adult rat cardiac myocytes. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 282:C926-C934.

196. Voisin,L., Foisy,S., Giasson,E., Lambert,C., Moreau,P., and Meloche,S. 2002. EGF receptor transactivation is obligatory for protein synthesis stimulation by G protein-coupled receptors. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 283:C446-C455.
197. Touyz,R.M., Yao,G., Viel,E., Amiri,F., and Schiffrin,E.L. 2004. Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *J.Hypertens.* 22:1141-1149.
198. Lassegue,B. and Clempus,R.E. 2003. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 285:R277-R297.
199. Aoki,H., Izumo,S., and Sadoshima,J. 1998. Angiotensin II activates RhoA in cardiac myocytes: a critical role of RhoA in angiotensin II-induced premyofibril formation. *Circ.Res.* 82:666-676.
200. Hoshijima,M., Sah,V.P., Wang,Y., Chien,K.R., and Brown,J.H. 1998. The low molecular weight GTPase Rho regulates myofibril formation and organization in neonatal rat ventricular myocytes. Involvement of Rho kinase. *J.Biol.Chem.* 273:7725-7730.
201. Suematsu,N., Satoh,S., Kinugawa,S., Tsutsui,H., Hayashidani,S., Nakamura,R., Egashira,K., Makino,N., and Takeshita,A. 2001. Alpha1-adrenoceptor-Gq-RhoA signaling is upregulated to increase myofibrillar Ca²⁺ sensitivity in failing hearts. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 281:H637-H646.
202. De Bold, AJ. 1985. Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart. *Science* 230: 767-770.

