

Université de Montréal

Rôles des peptides natriurétiques dans la prolifération  
et le métabolisme des fibroblastes cardiaques

par

Alexandre Lacasse

Département de sciences biomédicales

Faculté de médecine

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

Mai 1997

© Alexandre Lacasse, 1997



W 20 1105

W

4

U58

1998

V.004

Université de Montréal

École de génie des mines et de la métallurgie  
Département de génie des mines et de la métallurgie

par

André L. Lavoie

Le directeur des études universitaires

L'aurait de rédaction

Mémoire présenté à l'École de génie des mines et de la métallurgie  
en vue de l'obtention du grade de  
Maîtrise en génie des mines et de la métallurgie  
en génie des mines et de la métallurgie

\*

Mai 1998



André Lavoie

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Rôles des peptides natriurétiques dans la prolifération  
et le métabolisme des fibroblastes cardiaques

présenté par

Alexandre Lacasse

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président-rapporteur  
Denis Deblois, Ph.D.

Directeur de Recherche  
Gaétan Thibault, Ph.D.

---

Évaluateur externe  
Richard Larivière, Ph.D.

Mémoire accepté le: <sup>06.01.1998</sup>~~13 août 1997~~

## Sommaire

Le coeur est capable de s'adapter aux changements hémodynamiques qui surviennent dans plusieurs pathologies comme l'hypertension artérielle et l'insuffisance cardiaque. En effet, en situations de surcharge de pression et de volume, le coeur ajuste sa masse et sa forme afin de rétablir le débit sanguin à un niveau satisfaisant. Cette hypertrophie compensatoire entraîne un remodelage important au niveau des ventricules, souvent associé à l'hypertrophie cellulaire des cardiomyocytes, la prolifération des fibroblastes et l'accumulation de protéines de la matrice extracellulaire dans le milieu interstitiel, qui mène à une dysfonction mécanique de la pompe cardiaque. En plus de l'étirement de la paroi du myocarde, les peptides vasoactifs comme l'angiotensine II (Ang II) et certains facteurs de croissance peuvent être impliqués dans l'homéostasie morphologique, en partie en contrôlant l'hyperplasie des fibroblastes.

---

Synthétisé au niveau du coeur, le peptide natriurétique auriculaire (ANP) a des propriétés vasodilatatrice, diurétique et natriurétique en plus d'antagoniser les effets physiologiques de l'Ang II et de la vasopressine. Au cours de l'hypertrophie cardiaque, la sécrétion importante d'ANP par les myocytes ventriculaires pourrait agir directement sur le métabolisme des cellules avoisinantes afin de maintenir la fonction cardiaque. Pour vérifier en partie cette hypothèse, nous avons étudié l'effet des peptides natriurétiques sur la prolifération des fibroblastes ventriculaires adultes de rats normaux en cultures primaires.

---

L'ANP et le peptide natriurétique de type-C (CNP) inhibent de 30% la synthèse d'ADN induite par le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) au niveau des fibroblastes. Au niveau cellulaire, les peptides natriurétiques réduisent la progression des fibroblastes vers la phase de synthèse (phase S) du cycle cellulaire. Un analogue de guanosine monophosphate cyclique (GMPc), le 8-Br-GMPc, est aussi capable d'initier ses effets inhibiteurs, suggérant un mécanisme dépendant de l'activation de récepteurs et de la production subséquente de GMPc. De plus, le c-ANP, un agoniste du récepteur de clairance des peptides natriurétiques (NPR-C), ne provoque aucun effet. En condition basale, les fibroblastes cardiaques présentent 95% de récepteur NPR-C, le reste étant les récepteurs natriurétiques couplés à la guanylyl cyclase, NPR-A et/ou NPR-B. De plus, l'ANP et le CNP induisent une augmentation de GMPc d'un facteur 7 et 5 respectivement. Mais après 24h de traitement au PDGF, la densité des récepteurs diminue de moitié et la réponse au GMPc après stimulation à l'ANP augmente d'un facteur 2.7 tandis que celle au CNP reste la même. Cette augmentation de la sensibilité du récepteur NPR-A est cependant insuffisante car, à plus long terme, aucun peptide natriurétique, n'est capable de réduire la prolifération des fibroblastes cardiaques induite par le PDGF. Seulement une concentration élevée de 8-Br-GMPc produit une inhibition modeste de 9%. De plus, aucun peptide natriurétique ne réduit la sécrétion de fibronectine induite par le PDGF, suggérant une dissociation de régulation entre les processus mitotiques et les mécanismes responsables de la sécrétion des protéines de la matrice extracellulaire.

L'ANP semble donc agir dans les premiers instants de la réplique des fibroblastes cardiaques après l'induction de l'hypertrophie. L'ANP peut y

jouer un rôle bénéfique en limitant l'hyperplasie excessive des fibroblastes. Le mécanisme de cette propriété anti-mitogénique de l'ANP découle de sa liaison avec ses récepteurs biologiquement actifs entraînant la génération de GMPc dans la cellule.

## Table des Matières

SOMMAIRE	i
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS	ix
DÉDICACE	xii
CHAPITRE PREMIER: INTRODUCTION	1
<b>1. Organisation cardiaque</b>	<b>1</b>
1.1. Composition cellulaire du myocarde	1
1.2. La matrice extracellulaire	2
1.2.1. Composition moléculaire	2
1.2.2. Arrangement anatomique	3
1.2.3. Rôles des fibroblastes	4
1.3. Structure et fonctions de la matrice extracellulaire	5
1.3.1. Collagènes	5
1.3.2. Fibronectine	6
1.3.3. Lamine	7
1.3.4. Intégrines	7
1.3.5. Protéases	9
<b>2. Hypertrophie cardiaque</b>	<b>10</b>
2.1. Rôles des peptides vasoactifs	13
2.1.1. Angiotensine II	13
2.1.2. Endothéline	18
2.1.3. Peptide natriurétique auriculaire	19
2.1.4. Bradykinine	21

2.2. Rôles des facteurs de croissance et des cytokines	22
2.2.1. Facteur de croissance transformant- $\beta$	22
2.2.2. Facteur de croissance insulino-mimétique-1	23
2.2.3. Facteur de croissance basique du fibroblaste	25
2.2.4. Facteur de croissance dérivé des plaquettes	26
2.2.5. Interleukine-1	27
<b>3. Peptide natriurétique auriculaire</b>	<b>28</b>
3.1. Structure et synthèse	29
3.2. Sécrétion	32
3.3. Actions physiologiques	33
3.4. Métabolisme	38
3.5. Le peptide natriurétique de type-B	39
3.6. Le peptide natriurétique de type-C	40
<b>4. Récepteurs des peptides natriurétiques</b>	<b>41</b>
4.1. Structure	41
4.2. Distribution tissulaire	44
4.3. Sélectivité	44
4.4. Seconds messagers	46
4.5. Actions intracellulaires du GMP cyclique	47
<b>5. Hypothèse de travail</b>	<b>48</b>
CHAPITRE 2. ARTICLE	50
Atrial natriuretic peptide inhibits early replication of adult cardiac fibroblasts following growth factor stimulus.	
CHAPITRE 3. DISCUSSION	88
CONCLUSION	98
RÉFÉRENCES	99

---



## Liste des Figures

*À l'intérieur de la revue bibliographique:*

FIGURE 1.1	Structure et séquence en acides aminés des membres de la famille des peptides natriurétiques humains.	31
FIGURE 1.2	Actions physiologiques de l'ANP.	37
FIGURE 1.3	Représentation schématique des récepteurs des peptides natriurétiques.	43

*À l'intérieur de l'article:*

FIGURE 1	Effet de l'ANP sur la synthèse d'ADN induite par le PDGF dans les fibroblastes ventriculaires adultes.	81
FIGURE 2	Effet du CNP et du c-ANP sur la synthèse d'ADN induite par le PDGF dans les fibroblastes ventriculaires adultes.	82
FIGURE 3	Effet du 8-Br-GMPc sur la synthèse d'ADN induite par le PDGF dans les fibroblastes ventriculaires adultes.	83
FIGURE 4	Effet des peptides natriurétiques sur la progression vers la phase S du cycle cellulaire induite par le PDGF au niveau des fibroblastes ventriculaires adultes.	84
FIGURE 5	Effet du PDGF sur la production de GMPc induite par les peptides natriurétiques.	85
FIGURE 6	Effet des peptides natriurétiques sur la prolifération des fibroblastes ventriculaires adultes induite par la présence de PDGF pendant trois jours.	86

FIGURE 7 Effet des peptides natriurétiques sur la sécrétion de fibronectine induite par le PDGF au niveau des fibroblastes ventriculaires adultes.

87

*À l'intérieur de la discussion:*

FIGURE 3.1 Représentation schématique des effets antiréplicatifs des peptides natriurétiques.

97

## Liste des Tableaux

*À l'intérieur de la revue bibliographique:*

TABLEAU 1 Composantes de la matrice extracellulaire cardiaque. 3

*À l'intérieur de l'article:*

TABLEAU 1 Effet de la présence de PDGF pendant vingt-quatre heures sur les paramètres des récepteurs des peptides natriurétiques au niveau des fibroblastes ventriculaires adultes. 80

---

## Liste des Abréviations

a.a.	:	Acides aminés
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
Ang II	:	Angiotensine II
AMPc	:	Adénosine monophosphate cyclique
ANP	:	Peptide natriurétique auriculaire
ARNm	:	Acide ribonucléique messenger
AT <sub>1</sub>	:	Récepteur à l'angiotensine II de type 1
AT <sub>2</sub>	:	Récepteur à l'angiotensine II de type 2
ATP	:	Adénosine triphosphate
ATPase	:	Activité enzymatique hydrolysant l'ATP
AVP	:	Vasopressine
BK	:	Bradykinine
bFGF	:	Facteur de croissance basique du fibroblaste
BNP	:	<i>Brain natriuretic peptide</i> ou Peptide natriurétique de type-B
cANP	:	Agoniste spécifique du récepteur des peptides natriurétiques de type-C
[Ca <sup>+2</sup> ] <sub>i</sub>	:	Concentration de calcium intracellulaire
CNP	:	Peptide natriurétique de type-C
ECA	:	Enzyme de conversion de l'angiotensine

ECM	:	Matrice extracellulaire
ELISA	:	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ET	:	Endothéline
ET <sub>A</sub>	:	Récepteur à l'endothéline de type A
ET <sub>B</sub>	:	Récepteur à l'endothéline de type B
GMPc	:	Guanosine monophosphate cyclique
iECA	:	Inhibiteur de l'enzyme de conversion
IGF	:	Facteur de croissance insulino-mimétique
IL	:	Interleukine
L-NAME	:	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginine méthyl ester
MAPK	:	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	:	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MHC	:	Chaîne lourde de la myosine
MKP	:	<i>Mitogen-activated protein kinase phosphatase</i>
MMP	:	Métalloprotéases
NEP	:	Endopeptidase neutre
NO	:	Oxyde nitrique
NPR-A	:	Récepteur des peptides natriurétiques de type A
NPR-B	:	Récepteur des peptides natriurétiques de type B
NPR-C	:	Récepteur des peptides natriurétiques de type C
PDGF	:	Facteur de croissance dérivé des plaquettes

PGE <sub>2</sub>	:	Prostaglandine E <sub>2</sub>
PI3K	:	Phosphatidylinositol-3'-kinase
PKA	:	Protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC	:	Protéine kinase C
PKG	:	Protéine kinase dépendante du GMPc
SHR	:	Souche de rat spontanément hypertendu
TGF-β	:	Facteur de croissance transformant-β
VSMC	:	Cellule vasculaire de muscle lisse

---

## Dédicace

Toutes les personnes autour de moi ont contribué, contribuent et contribueront toujours à mes réalisations.

En chacune d'elles, j'espère puiser le meilleur.

En mon *grand-père*, la sagesse et le dépassement intellectuel.

En ma *grand-mère paternelle*, la méthodologie et l'application.

En ma *grand-mère maternelle*, le goût du travail et la volonté.

En mon *père*, la persévérance et la générosité.

En ma *mère*, l'intelligence et la force de caractère.

En *Sabina*, l'amour, la vérité, l'intégrité et la partage.

---

## Chapitre Premier: Introduction

### 1. Organisation cardiaque

#### 1.1. Composition cellulaire du myocarde

Le myocarde cardiaque se divise essentiellement en compartiments musculaires, vasculaires et interstitiels où l'on retrouve plusieurs types cellulaires qui leur sont associés. Les myocytes représentent 75% de la masse cardiaque mais ne contribuent que pour 33% de la population cellulaire totale du coeur. En effet, les deux tiers des cellules cardiaques sont composés de fibroblastes à 90%. Quant aux cellules vasculaires lisses et endothéliales, aux neurones et autres, elles ne forment ensemble que 10% (Frank *et al.*, 1974; Zak, 1973). Les cardiocytes et les fibroblastes sont donc les principales cellules cardiaques. Plus récemment, l'introduction de techniques d'isolement et de culture *in vitro* des cardiomyocytes et des fibroblastes a permis d'étudier le coeur au niveau cellulaire plutôt que de recourir aux homogénats du tissu entier, afin de mieux cerner leur implication intrinsèque dans les fonctions cardiaques.

---



## **1.2. La matrice extracellulaire**

L'espace interstitiel cardiaque est un système complexe formé de diverses protéines et composantes de la matrice extracellulaire qui s'organisent en un réseau tridimensionnel responsable de la fonction cardiaque (Weber *et al.*, 1994; Borg *et al.*, 1981). La matrice extracellulaire (ECM) possède un rôle critique dans la transmission de l'information provenant de l'environnement extracellulaire durant l'apparition et le développement de pathologies affectant la morphologie, la fonction et le phénotype cellulaires (Borg *et al.*, 1996). L'intérêt d'étudier le comportement de l'ECM cardiaque est très récent et apporte des solutions prometteuses dans le traitement de différentes maladies cardio-vasculaires.

### **1.2.1. Composition moléculaire**

Les composantes majeures de l'ECM incluent des protéines fibreuses de type structurale (collagènes), des molécules d'adhésion et d'anti-adhésion cellulaires telles la fibronectine et la laminine, et des protéoglycans, macromolécules composées d'un petit noyau protéique lié à plusieurs chaînes latérales de glycosaminoglycans. De plus, on retrouve des cytokines, des facteurs de croissance et des protéases dans le milieu interstitiel (Tableau 1, d'après Borg *et al.*, 1996, Haisong et Dixon, 1996)

---

Tableau 1. Composantes de la matrice extracellulaire cardiaque. D'après Borg *et al.* (1996).

Famille	Composantes
Collagènes	Collagène fibreux (I et III) Membrane basale (IV) Collagène non-fibreux
Glycoprotéines non-collagéniques	Fibronectine Laminine Tenascine Entactine
Protéoglycans	Sulfate de chondroïtin Sulfate d'héparan Hyaluronate
Facteurs de croissance	IGF-1 bFGF TGF- $\beta$ PDGF
Protéases	Métalloprotéases Protéases à sérine Protéases à cystéine

### 1.2.2. Arrangement anatomique

Les interactions des composantes fibreuses du collagène avec les cellules cardiaques donnent lieu à l'élaboration d'un réseau tridimensionnel qui existe selon trois niveaux fondamentaux visibles en microscopie électronique: l'épimysium, le péri-mysium et l'endomysium (Weber *et al.*, 1994). L'épimysium est localisé le long des couches épocardiales et endocardiales du myocarde où il est en continuité avec le péri-mysium. Ce dernier est composé de plusieurs projections de collagène fibreux qui entourent les fibres musculaires, les regroupent en paquets et forment des interconnexions entre ces derniers regroupements. En continuité anatomique

avec le périnysium, l'endomysium forme un réseau qui entoure individuellement les myocytes avec des entrecroisements qui sont à l'origine des connexions myocyte-myocyte et myocyte-capillaire et qui sont attachés à des sites spécifiques près de la bande Z via les récepteurs de la famille des intégrines (Borg *et al.*, 1996; Weber *et al.*, 1994; Borg *et al.*, 1983).

### **1.2.3. Rôles de fibroblastes**

Comme dans la plupart des organes, les fibroblastes cardiaques sont responsables de la sécrétion des macromolécules de l'ECM (Weber *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1993; Pelouch *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 1989). En plus de synthétiser et de participer à la déposition des composantes de l'ECM, les fibroblastes remplissent deux autres rôles importants: ils synthétisent et relâchent des enzymes responsables de la dégradation et de l'équilibre des protéines de l'ECM et sont à l'origine des tensions mécaniques sur le réseau épisyrial du collagène (Borg *et al.*, 1996; Laurent, 1987). L'investigation de l'implication des fibroblastes cardiaques dans les processus hypertrophiques est plus récente et semble offrir une cible thérapeutique importante (Fareh *et al.*, 1996; Fareh *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1995; Brilla *et al.*, 1994; Burgess *et al.*, 1994; Guarda *et al.*, 1994; Sadoshima et Izumo, 1993).

---

## **1.3. Structure et fonctions des composantes de la matrice extracellulaire**

### **1.3.1. Collagènes**

Dans le tissu cardiaque adulte, on dénombre cinq isoformes moléculaires de collagène: collagène de types I, III, IV, V et VI (Bishop *et al.*, 1995). En fait, les collagènes fibreux de types I et III comptent pour plus de 90% du contenu total de collagène dans le coeur (Pelouch *et al.*, 1993). Le collagène de type I forme des agrégats de fibres épaisses, démontre une capacité d'allongement comparable au fer et compte à lui seul pour 75% du collagène cardiaque tandis que le collagène de type III forme des fibres plus minces et est beaucoup plus élastique (Weber *et al.*, 1991; Weber *et al.*, 1989;). Le collagène se présente de façon relativement insoluble dans le myocardium, probablement à cause des nombreuses interconnexions covalentes qu'il exerce (Iimoto *et al.*, 1988). À cause des pressions continues exercées sur les chambres ventriculaires, la rigidité tissulaire conférée par le collagène est requise et une perte de structure normale peut entraîner la rupture des compartiments cardiaques, comme dans un infarctus aigu (Haisong et Dixon, 1996; Weber *et al.*, 1994). De leur côtés, les collagènes de types IV, V et VI ne forment que 10% du collagène total. Le type IV est localisé au niveau de la membrane basal des myocytes et des fibroblastes où il joue un rôle structural de soutien en plus d'un rôle régulateur de transport et d'adhésion cellulaire (Bishop *et al.*, 1995; Weber *et al.*, 1989). Le type V est co-localisé avec ce dernier et se retrouve aussi dispersé dans le myocardium. Finalement, le type VI se retrouve dans l'espace interstitiel cardiaque et semble recouvrir la surface des collagènes fibreux (Bishop *et al.*, 1995).

### 1.3.2. Fibronectine

La fibronectine est une glycoprotéine dimérique sécrétée par tous les types cellulaires cardiaques (sauf les myocytes) et comporte des sites de liaisons pour le collagène, l'héparine, la fibrine et les protéoglycans (Casscells *et al.*, 1990). Le constituant majeur retrouvé dans l'ECM est sous forme d'un complexe insoluble, après polymérisation de dimères de fibronectines sécrétés localement par les cellules avoisinantes ou celle de dimères solubles circulants synthétisés au niveau du foie (Farhadian *et al.*, 1995). La protéine possède des répétitions de séquences de trois types (I, II et III), indépendamment impliquées dans les liaisons aux autres composants de l'ECM et aux récepteurs cellulaires (intégrines et glycolipides). Ces différentes isoformes présentes dans le tissu cardiaque dérivent d'un épissage alternatif de l'ARNm après la transcription du gène (Farhadian *et al.*, 1995; Farhadian *et al.*, 1994; Hynes *et al.*, 1990; Schwarzbauer *et al.*, 1983). Sa régulation spécifique après l'embryogénèse et l'organogénèse, et sa participation aux phénomènes d'adhésion, de migration et de différenciation *in vitro*, suggèrent une implication importante de la fibronectine dans le développement et l'organisation précoce de l'ECM (Bennett *et al.*, 1991; Gluckova *et al.*, 1990; French-Constant *et al.*, 1989; Gluckova *et al.*, 1989; Akiyama *et al.*, 1989; Hedin *et al.*, 1989; Hedin *et al.*, 1988; Ahumada *et al.*, 1981). Dans le cœur normal adulte, la distribution de fibronectine immunodélectable forme un réseau péricellulaire et est localisée dans l'espace interstitiel autour de la majorité des cellules (Mamuya *et al.*, 1992). Située le long de la surface des myocytes cardiaques, la fibronectine semble servir de pont protéique entre la cellule et les fibres de collagène qui l'entourent, lui conférant un rôle

modulateur important dans l'orientation des fibres de collagène, influençant ainsi la compliance du myocarde (Ahumada *et al.*, 1984).

### 1.3.3. Laminine

La laminine est une glycoprotéine relativement large composée de trois sous-unités: une chaîne A de 400 kDa et deux chaînes B homologues de 200 kDa (Haisong et Dixon, 1996). Au niveau du coeur, la laminine réside le long de la membrane basale des myocytes et des fibroblastes où peuvent se lier les collagènes de type I, III et IV (Price *et al.*, 1992). Dans le coeur adulte, la laminine se retrouve en quantité relativement abondante dans les régions morphologiques spécialisées telles les bandes Z des sarcomères, près des zones de contact entre la membrane sarcolemmale et les agrégats de collagène (Price *et al.*, 1992). La laminine joue un rôle important dans l'adhésion, la migration, la différenciation et la croissance cellulaires retrouvées dans les fonctions de l'organe normal (Haisong et Dixon, 1996). De plus, la laminine semble jouer un rôle primordial dans l'attachement des myocytes cardiaques aux glycoprotéines de la membrane basale, indispensable à leur survie en condition *in vitro* (Lundgren *et al.*, 1988; Lundgren *et al.*, 1985a).

### 1.3.4. Intégrines

Les intégrines sont des récepteurs hétérodimériques à la surface cellulaire qui interagissent avec les différentes composantes de l'ECM et les éléments du cytosquelette (Buck *et al.*, 1987; Hynes, 1987; Ruoslahti *et al.*, 1987). Cette famille de récepteurs est composée d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  qui sont liées ensemble de façon non-covalentes. Jusqu'à présent, il

existe 9 chaînes  $\alpha$  ( $\alpha_1$ - $\alpha_9$ ) et 6 chaînes  $\beta$  ( $\beta_1$ - $\beta_6$ ) et chaque sous-famille  $\beta$  peut s'associer avec différentes sous-unités  $\alpha$  (Hemler *et al.*, 1989; Hemler *et al.*, 1987; Takada *et al.*, 1987;). Les chaînes  $\alpha$  présentent entre elles une homologie de séquence de 20 à 60% et les chaînes  $\beta$ , 40 à 50%. Par contre, il n'existe aucune homologie de séquence entre les deux familles  $\alpha$  et  $\beta$  (Buck *et al.*, 1987; Hynes, 1987; Ruoslahti *et al.*, 1987). Les hétérodimères  $\alpha/\beta$  de la sous-famille  $\beta_1$  semblent responsables des interactions avec les composantes de l'ECM durant le développement et la croissance cellulaire. De plus, des études immunohistochimiques ont démontré la localisation spécifique de la famille  $\beta_1$  près des bandes Z des myocytes cardiaques. (Terracio *et al.*, 1991). Les chaînes  $\alpha$  semblent responsables de la sélectivité d'association avec les différentes protéines de l'ECM. En effet, les sous-unités  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  possèdent une plus grande affinité pour les collagènes I, III et IV et la laminine; les sous-unités  $\alpha_3$  interagissent avec la fibronectine, la laminine, les collagènes de types I, III, et IV; les sous-unités  $\alpha_4$  et  $\alpha_5$  semblent être spécifiques pour la fibronectine et la sous-unité  $\alpha_6$  pour la laminine (Carter *et al.*, 1990; Languino *et al.*, 1989; Gehlsen *et al.*, 1989; Kramer *et al.*, 1989; Takada *et al.*, 1989; Ignatius *et al.*, 1988; Sonnenberg *et al.*, 1988; Takada *et al.*, 1987; Wayner *et al.*, 1987). Au niveau cardiaque, l'expression des différentes sous-unités  $\alpha$  semble être régulée au cours du développement (Borg *et al.*, 1996). Ceci peut se refléter par l'affinité différente d'attachement des myocytes pour certaines composantes de l'ECM lors des stades fœtaux, néo-nataux et adultes (Lundgren *et al.*, 1985a; Lundgren *et al.*, 1985b; Borg *et al.*, 1983). De plus, les fibroblastes cardiaques présentent aussi des expressions différentes des sous-unités  $\alpha$  comparativement aux myocytes, phénomène probablement lié à la fonction cellulaire (Terracio *et al.*, 1991; Gullberg *et al.*, 1990; Gullberg *et al.*, 1989). En effet, les fibroblastes sont des cellules migratoires qui ont des

attachements transitoires et tangentiels aux fibrilles de collagène tandis que les myocytes près des bandes Z s'attachent au collagène de façon perpendiculaire (Terracio *et al.*, 1991; Terracio *et al.*, 1988; Robinson *et al.*, 1987).

### 1.3.5. Protéases

Plusieurs enzymes participent à la régulation des composantes de l'ECM. La classe d'enzymes la plus importante est celle des métalloprotéases de la matrice (MMP), une famille d'enzymes dépendantes du zinc et du calcium qui compte à ce jour neuf membres qui ont été clonés et séquencés (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993). Cette famille de protéines est classée entre trois groupes fonctionnels basés sur leurs affinités pour le substrat: les collagénases interstitielles (MMP-1 et MMP-8); les stromelysines (MMP-3, MMP-10 et MMP-11) et les gélatinases (MMP-2 et MMP-9). Les MMP-1 et MMP-8 peuvent initier la dégradation des collagènes fibreux de types I et III alors que la MMP-2 sert à la dégradation du collagène de type IV. De leur côté, les stromelysines catalysent la dissolution de plusieurs composantes de l'ECM telles les collagènes de types I, III et IV, la fibronectine, la laminine et les protéoglycans (Haisong et Dixon, 1996; Birkedal-Hansen *et al.*, 1993). Dans des conditions physiologiques, les MMP, présentes sous forme latentes, peuvent être activées par des protéases à sérine (plasmine, urokinase) (Dollery *et al.*, 1995). Cette activation est sous le contrôle stricte d'une autre famille de protéines appelée inhibiteurs tissulaires des MMP (TIMP-1, -2 et -3). La TIMP-1 a une affinité relativement élevée pour les formes actives de collagénases, stromelysines et gélatinases et s'y lie de façon irréversible (Dollery *et al.*, 1995). Au niveau cardiaque, des études récentes ont montré la co-expression de MMP-1, MMP-2 et TIMP-1 (Tyagi *et al.*, 1995a). De plus,



l'expression dans le myocarde des MMP et des TIMP semble être localisée au niveau des fibroblastes et des cellules endothéliales (Tyagi *et al.*, 1995b).

## 2. Hypertrophie cardiaque

Le coeur adulte des mammifères est capable de s'adapter aux stress hémodynamiques qui prévalent dans plusieurs pathologies dont l'hypertension, les maladies touchant les valvules (régurgitation valvulaire aiguë) et les problèmes de contractilité tels que rencontrés dans l'infarctus du myocarde et la cardiomyopathie (Grossman, 1980). En effet, le coeur répond en développant une hypertrophie compensatoire dans le but de maintenir un débit sanguin adéquat. Des expressions géniques accrues semblent accompagner ce processus, dont les altérations dans le contenu des protéines contractiles (pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase du réticulum sarcoplasmique,  $\beta$ -MHC), l'induction de différents marqueurs embryonnaires (ANP, actine  $\alpha$ -squelettique) et l'expression précoce et immédiate de proto-oncogènes (*c-fos*, *c-jun*) (Chien *et al.*, 1991). Bien que ces réponses soient plutôt bénéfiques au départ, la baisse de la tension développée sur la chambre ventriculaire par l'épaississement de la paroi en hypertrophie concentrique, ou encore la maintenance d'un volume d'éjection satisfaisant par l'agrandissement de la chambre ventriculaire en hypertrophie volumique ou post-infarctus, mènent à une chute globale de la fonction cardiaque. Le coeur entre alors dans un cercle vicieux où l'hypertrophie amène le remodelage ventriculaire pathologique pouvant conduire à l'insuffisance cardiaque (Booz et Baker, 1995).

L'augmentation de la masse cardiaque peut être la conséquence de plusieurs phénomènes dont l'hypertrophie cellulaire des myocytes cardiaques, la prolifération des cellules musculaires lisses et/ou la prolifération des fibroblastes avec ou sans augmentation du contenu de collagène fibreux (Chapman *et al.*, 1990). En utilisant les techniques de culture de cellules cardiaques isolées, il est possible d'évaluer le rôle que jouent les différents types cellulaires dans plusieurs pathologies telle l'hypertrophie cardiaque. Le phénomène de remodelage du myocarde amène la dysfonction ventriculaire (Weber *et al.*, 1991). L'hyperplasie des fibroblastes et les dépôts de collagène apparaissent après des épisodes ischémiques rencontrés dans l'infarctus du myocarde, ayant pour conséquence le remplacement des myofibrilles nécrotiques par du tissu cicatriciel appelé fibrose réparative (Weber *et al.*, 1995; Lindpaintner *et al.*, 1992). Lorsqu'il y a absence de nécrose cellulaire mais que le cœur est continuellement soumis à des tensions importantes, les fibres de collagène autour des myocytes viables peuvent aussi s'hypertrophier ou leur nombre peut augmenter, phénomène appelé fibrose réactive (Weber *et al.*, 1995).

L'hypertension essentielle se caractérise par une hypertrophie et une défaillance cardiaque en plus d'un épaissement des parois de la vasculature du tronc artériel. Dans l'hypertension génétique et réno-vasculaire, la fibrose cardiaque est un processus progressif (Haisong et Dixon, 1996). Dans les premiers stades, la surcharge de pression provoque une fibrose réactive. Dans le modèle de constriction aortique chez le rat, les expressions d'ARNm de fibronectine et de collagènes de types I, III et IV sont augmentées rapidement au niveau du ventricule gauche et de la vasculature, et ce avant le développement maximal de l'hypertrophie cardiaque (Lipke *et al.*, 1993;

Villareal et Dillmann, 1992; Chapman *et al.*, 1990). De plus, durant la transition de l'hypertrophie stable à l'insuffisance cardiaque, l'abondance significative des ARNm pour les collagènes de types I et III ainsi que pour la fibronectine est remarquable au niveau des deux ventricules de rats spontanément hypertendus (SHR) (Boluyt *et al.*, 1994). L'apparition de foci fibrotiques résultant de la nécrose des myocytes se manifeste dans les stades avancés de l'hypertension. Lorsque la fibrose réparative prévaut, les collagènes totaux sont augmentés de 6 fois et représentent 25% du volume cardiaque total (Brilla *et al.*, 1993). Chez des patients hypertendus présentant de l'insuffisance cardiaque due à une cardiomyopathie primaire, le contenu des protéines de l'ECM est augmenté, dont les collagènes de types I, III, IV et VI, en plus de la fibronectine, la laminine et la vimentine (Boluyt *et al.*, 1994; Schaper *et al.*, 1992). L'accumulation de collagène est reliée positivement à la rigidité musculaire et, au moment de la diastole, le réallongement des myocytes cardiaques peut alors être compromis dans les coeurs défailants à cause de l'abondance du matériel interstitiel (Conrad *et al.*, 1995; Doering *et al.*, 1988). Depuis quelques années, la possibilité de l'implication des facteurs de croissance et des peptides vasoactifs, produits localement au niveau du myocardium en réponse aux stress hémodynamiques, a attiré l'attention. En effet, ces facteurs, produits par les myocytes et/ou les fibroblastes cardiaques, peuvent être impliqués dans la régulation de la transcription de certains gènes de l'appareil contractile ainsi que ceux responsables des procédés de croissance cellulaire, via une cascade de signalisation intracellulaire après leur liaison à des récepteurs spécifiques à la surface de la cellule.

## 2.1. Rôles des peptides vasoactifs

### 2.1.1. Angiotensine II

Le système rénine-angiotensine est un des principaux régulateurs endocriniens du volume intravasculaire et de la pression sanguine systémique. Plusieurs évidences expérimentales montrent la présence des différentes composantes de ce système dans plusieurs organes dont le coeur, suggérant une synthèse locale amenant des mécanismes d'action autocrine/paracrine (Dostal et Baker, 1993). En effet, les ARNm de la rénine et de l'angiotensinogène ont été localisés dans les 4 chambres cardiaques (Dostal *et al.*, 1992a). De plus, l'expression de l'ARNm de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) augmente d'un facteur 4 dans le tissu ventriculaire après l'induction d'une hypertrophie. À l'aide de cultures de coeurs de rats nouveaux-nés, Dostal *et al.* ont détecté la présence d'angiotensine I et II dans les milieux des myocytes et des fibroblastes, suggérant un système rénine-angiotensine intra-cardiaque (Dostal *et al.* 1992b). Par contre, d'autres évidences expérimentales chez le porc tendent à démontrer que la production d'angiotensine est grandement dépendante de la rénine séquestrée de la circulation sanguine, suggérant un apport primordial du système rénine-angiotensine endocrinien (Danser *et al.*, 1994). Diverses études ont montré la présence de récepteurs de l'Ang II dans les cellules cardiaques. Au niveau des myocytes, certains groupes détectent la présence de récepteurs AT<sub>1</sub> et d'autres non (Kim *et al.*, 1995; Matsubara *et al.*, 1994). De plus, dans les cardiomyocytes de rats adultes, on peut noter une élévation de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> après une stimulation à l'Ang II (Fareh *et al.* 1995). De leur côté, les fibroblastes de coeurs de rats nouveaux-nés et adultes présentent le récepteur de type AT<sub>1</sub>

(Crabos *et al.*, 1994; Sadoshima et Izumo, 1993; Villarreal *et al.*, 1993), couplé à l'élévation de  $Ca^{2+}_i$  (Fareh *et al.*, 1995).

Sadoshima *et al.* ont montré la relâche d'Ang II au niveau des myocytes cardiaques de rats nouveaux-nés suite à un étirement mécanique. En effet, l'Ang II semble être contenu dans des vésicules de sécrétion au niveau des cardiomyocytes et, une fois sécrété, peut devenir responsable de la réponse hypertrophique reliée à l'étirement (Sadoshima *et al.*, 1993). Des études au niveau de myocytes adultes ont montré l'induction de *c-fos* et *Erg-1* par l'Ang II, deux proto-oncogènes impliqués dans les phénomènes de croissance et de différenciation (Iwami *et al.*, 1996; Neyses *et al.*, 1993). D'autres évidences expérimentales suggèrent un rôle de l'Ang II comme stimulus hypertrophique, suite à l'induction de synthèse de protéines dans des myocytes cardiaques d'embryons de poulets (Baker et Aceto, 1990). De plus, via le récepteur  $AT_1$ , l'Ang II est capable de phosphoryler des tyrosines kinases cytoplasmiques couplées aux protéines G, la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) et une S6 kinase, dans un mécanisme dépendant du  $Ca^{2+}_i$  mais pas nécessairement de la PKC, tant au niveau des fibroblastes que des myocytes (Sadoshima *et al.*, 1995; Booz *et al.*, 1994; Schorb *et al.*, 1994). En fait, les fibroblastes cardiaques semblent très importants dans le processus hypertrophique qu'engendre l'Ang II au niveau des myocytes puisqu'ils relâchent un facteur transformant dans le milieu extracellulaire en réponse à l'Ang II, qui augmente l'incorporation de [ $^3$ H]-leucine dans les cardiomyocytes (Kim *et al.*, 1995). De plus, l'Ang II est capable d'induire la prolifération des fibroblastes de rats nouveaux-nés et augmente le nombre de cellules de 138% après 48 heures (Schorb *et al.*, 1993). L'Ang II est responsable de l'induction rapide de divers proto-oncogènes tels *c-fos*, *c-jun*, *c-myc* et *Erg-1*, en plus de favoriser la

réexpression de marqueurs embryonnaires tels l'actine  $\alpha$ -squelettique et l'ANP au niveau des myocytes ventriculaires, effets via le récepteur AT<sub>1</sub> (Sadoshima et Izumo, 1993). Dans les fibroblastes de rats nouveaux-nés, Booz *et al.* ont montré la formation d'acide phosphatidique (PA) après stimulation à l'Ang II (Booz *et al.*, 1994). Cette formation de PA ne semble pas être sous le contrôle restreint des phospholipases C et D et pourrait servir de second messager dans les phénomènes prolifératifs.

L'Ang II participe activement aux processus de remodelage ventriculaire ainsi qu'à la fibrose qui y est souvent associée. Chez le rat, Tan *et al.* ont infusé de l'Ang II à des concentrations non-hypertensives et ont observé un effet cardiotoxique étroitement lié à une fibrose. En effet, durant le premier jour de traitement, une myocytolyse s'est produite et a été suivie d'une hyperplasie des fibroblastes, accompagnées de cicatrisation au deuxième et troisième jour de traitement (Tan *et al.* 1991). D'autres études utilisant des doses chroniques et pressives d'Ang II ont montré des changements importants dans l'expression des divers constituants de l'ECM, non entièrement reliés aux effets sur la pression sanguine. De plus, dans les régions développant une fibrose, l'expression de fibronectine semble constituer un index précoce et sensible aux changements phénotypiques des fibroblastes cardiaques, avant l'augmentation de collagène fibreux (Crawford *et al.*, 1994). Des études *in vitro* sur les fibroblastes fœtaux et néo-nataux ont aussi montré plusieurs effets de l'Ang II: une régulation à la hausse de l'expression d'angiotensinogène et de facteur de croissance transformant- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Fisher *et al.*, 1995; Sadoshima et Izumo, 1993; Sharma *et al.*, 1994), une augmentation de l'expression de fibronectine et de laminine sans changement dans les collagènes de types I, III et IV (Iwami *et al.*, 1996; Butt *et al.*, 1995), et une

contraction des gels tridimensionnels de collagène via les intégrines de type  $\beta_1$  (Burgess *et al.*, 1994). Une étude récente a aussi montré l'implication de l'ostéopontine, du motif peptidique RGD (arginine-glycine-aspartate) et de la famille d'intégrines  $\beta_3$  dans la synthèse d'ADN et la contraction de gels tridimensionnels de collagène induites par l'Ang II (Ashizawa *et al.*, 1996). Au niveau des fibroblastes de rats adultes, l'Ang II semble capable d'inhiber l'activité de la collagénase MMP-1 seulement via le récepteur  $AT_2$  tandis que la stimulation de la synthèse de collagène se fait via les deux récepteurs  $AT_1$  et  $AT_2$  (Brilla *et al.*, 1994). Plus récemment, le rôle du récepteur  $AT_2$  a été plus étudié, en utilisant des souris déficiente pour le gène du récepteur  $AT_2$ . Ce récepteur semble antagoniser les effets presseurs de l'Ang II médiés par le sous-type  $AT_1$ , en plus d'être impliqué dans les processus gouvernant le comportement au niveau du système nerveux central (Ichiki *et al.*, 1995; Hein *et al.*, 1995). D'autres études ont montré l'implication du récepteur  $AT_2$  dans les voies apoptotiques et dans les processus anti-prolifératifs via les tyrosines phosphatases (Tsuzuki *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 1996). Par contre, au niveau des fibroblastes cardiaques, le récepteur  $AT_2$  ne semble pas présent (Fareh *et al.*, 1996).

*In vivo*, l'implication de l'Ang II semble dépendre de la nature et de la sévérité de l'hypertrophie. Une infusion d'Ang II chez des rats normaux provoque une augmentation de la masse ventriculaire (indexée au poids corporel) d'environ 20% après 7 jours (Dostal et Baker, 1992). De plus, les sites de fibrose péricardiale suivant un infarctus du myocarde chez le rat montrent un changement phénotypique des fibroblastes par l'expression d'actine  $\alpha$ -squelettique, associé à une augmentation de l'expression de l'ECA (Sun *et al.*, 1996). Aussi, après l'induction d'une hypertrophie bi-ventriculaire

eccentrique de volume par fistule aorto-cavale, l'expression d'ARNm de l'ECA est augmentée contrairement à celle des récepteurs AT<sub>1</sub>. Cette augmentation est atténuée en présence d'un inhibiteur de l'ECA (iECA), en plus de diminuer la production de collagène de type I $\alpha$  et de vimentine (Iwai *et al.*, 1995). De plus, Fareh *et al.* ont montré des changements du calcium intracellulaire en réponse à l'Ang II. En effet, les myocytes cardiaques adultes de coeurs hypertrophiés ont démontré une réactivité calcique plus élevée tandis que les fibroblastes sont devenus moins sensibles aux effets de l'Ang II (Fareh *et al.*, 1995). Cependant, dans un modèle de *pacing* ventriculaire chez le chien, l'augmentation de l'Ang II immunodélectable dans le tissu myocardique, le rein et la circulation n'est significative qu'en présence d'insuffisance cardiaque, suite aux épisodes de dysfonction ventriculaire gauche (Luchner *et al.*, 1996). D'autres observations intéressantes suggèrent le rôle indirect de l'Ang II dans la cardiotoxocité. En effet, le propranolol, un antagoniste non-sélectif des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, bloque la nécrose des myocytes ainsi que les dommages sur la vasculature coronaire causés par l'Ang II (Henegar *et al.*, 1995). Farivar *et al.* ont montré les effets du losartan, un antagoniste spécifique du récepteur AT<sub>1</sub>, ainsi que le prazosin, un bloqueur du récepteur  $\alpha_1$ -adrénergique, sur une fibrose cardiaque induite par la phényléphrine. Ces deux antagonistes ont été capables de réduire la prolifération des fibroblastes et l'expression de fibronectine, tout en diminuant l'expression du gène de l'ANP (Farivar *et al.*, 1995). De plus, de récentes évidences expérimentales ont montré une relation directe entre l'Ang II et l'oxide nitrique (NO), suggérant un rôle important du NO en tant qu'inhibiteur des effets délétaires que peut produire l'Ang II. En effet, le losartan et le L-arginine ont renversé les modulations cardiaques dramatiques engendrées par un traitement au N<sup>G</sup>-nitro-arginine-méthyl-ester (L-NAME), un inhibiteur de



la NO synthase, telles les expressions de collagène, de fibronectine et d'ANP (Hou *et al.*, 1995). Enfin, les études cliniques tendent à montrer un effet cardioprotecteur en utilisant les iECA, réduisant la mortalité et la morbidité des patients (Pfeiffer *et al.*, 1992).

### 2.1.2. Endothéline

Peptide vasoconstricteur puissant au niveau de la vasculature, l'endothéline-1 (ET-1) s'avère un stimulus important de la croissance des cellules cardiaques avec des actions hypertrophiques et hyperplasiques sur les myocytes et les fibroblastes (Lembo *et al.*, 1995). En effet, l'ET-1 est capable d'augmenter la synthèse de protéine dans les cardiomyocytes de rats nouveaux-nés via un processus dépendant de l'influx de  $Ca^{2+}_i$  (Suzuki *et al.*, 1990). Au niveau des myocytes cardiaques adultes, l'ET-1 est capable d'induire l'expression de *Erg-1* et *c-fos* (Neyses *et al.*, 1993). De plus, au niveau des fibroblastes adultes, l'ET-1 et l'ET-3 favorisent l'accumulation des collagènes fibreux de types I et III via l'activation des deux sous-types de récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$  alors que seulement l'ET-1 semble capable d'inhiber la collagénase via un processus impliquant le récepteur  $ET_A$  (Guarda *et al.*, 1994). Aussi, Fareh *et al.* ont montré une proportion relative de 50% de récepteur  $ET_A$  et 50% du type  $ET_B$  au niveau des fibroblastes adultes (Fareh *et al.*, 1996). Après l'induction d'une hypertrophie ventriculaire gauche par coarctation de l'aorte, l'expression d'ARNm du préproET-1 augmente dans les premiers 24 heures et revient à la normale après 4 jours. De plus, un antagoniste sélectif du récepteur  $ET_A$ , le BQ-123, a ramené à la normale les niveaux d'expressions des ARNm des principaux marqueurs génétiques de l'hypertrophie tels l'actine  $\alpha$ -squelettique et l'ANP (Ito *et al.*, 1994). Par

contre, en surcharge de volume, les myocytes et les fibroblastes cardiaques de coeurs hypertrophiés ne présentent pas de modifications significatives dans la réponse calcique à l'ET-1 (Fareh *et al.*, 1996).

### 2.1.3. Peptide natriurétique auriculaire

La production et la sécrétion du peptide natriurétique auriculaire (ANP) dans le ventricule gauche de coeurs en situations hypertrophiques ne dépendent pas seulement d'une élévation de pression sanguine mais aussi d'une production locale de facteurs humoraux (Ogawa *et al.*, 1996). De plus, il existe une corrélation directe entre l'augmentation d'expression de l'ANP et l'apparition d'hypertrophie ventriculaire associée au vieillissement (Younes *et al.*, 1995). Bien que la réexpression du gène de l'ANP au niveau des myocytes ventriculaires soit reconnue comme un marqueur fiable et une réponse génique tardive dans plusieurs modèles d'hypertrophie, peu d'études existent sur le rôle physiologique que cela peut entraîner (de Bold *et al.*, 1996; Fareh *et al.*, 1995; Yokota *et al.*, 1995; Ogawa *et al.*, 1991; Izumo *et al.*, 1988). Les composantes du système natriurétique cardiaque sont ultérieurement détaillées dans ce chapitre, puisqu'il en constitue le principal sujet d'étude au niveau du métabolisme des fibroblastes cardiaques de rats adultes.

Au niveau des myocytes ventriculaires adultes, l'ANP est capable de potentialiser l'effet de l'Ang II sur la contractilité (Neyses et Vetter, 1989). Par contre, un autre étude a démontré que le guanosine monophosphate cyclique (GMPc) réduit la réponse relative des myofilaments au  $Ca^{2+}$ , par un mécanisme dépendant de la protéine kinase G (PKG) (Shah *et al.*, 1994). Cao et Gardner ont montré un effet anti-prolifératif de l'ANP au niveau des

fibroblastes cardiaques de rats nouveaux-nés via les trois sous-types de récepteurs (NPR-A, NPR-B et NPR-C). Même un agoniste spécifique du récepteur de clairance (NPR-C), sans action biologique connue sauf la dégradation de l'ANP circulant, a diminué l'incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine dans l'ADN (Cao et Gardner, 1995). De plus, l'ANP et le BNP sont capables de bloquer la réponse hyperplasique engendrée par l'Ang II en diminuant l'expression du préproET-1, montrant la complexité des interactions qui peuvent exister entre les peptides vasoactifs (Fujisaki *et al.*, 1995). Aucune étude connue n'a montré l'effet de la relâche de l'ANP sur les cellules cardiaques adultes en ce qui concerne les phénomènes hypertrophiques et hyperplasiques. L'implication de l'ANP dans le développement de l'hypertrophie cardiaque est encore inconnue et des conclusions au sujet de l'hypertrophie cardiaque pathologique ne doivent pas s'appuyer uniquement sur les résultats obtenus à l'aide de cultures de cellules cardiaques de rats nouveaux-nés.

Chez l'adulte, les propriétés anti-prolifératives de l'ANP ont été démontrées dans d'autres types cellulaires autres que cardiaques. Dans les cellules musculaires lisses de rats, l'ANP diminue la prolifération cellulaire et l'activité de la thymidine kinase via le récepteur NPR-C (Cahill et Hassid, 1994). L'ANP semble aussi agir au niveau des cellules endothéliales en diminuant leur prolifération et leur migration, probablement par un processus dépendant de la génération de GMPC (Ikeda *et al.*, 1995; Morishita *et al.*, 1994; Itoh *et al.*, 1992). À l'aide de co-culture de cellules musculaires vasculaires (VSMC) et de cellules endothéliales (EC), Komatsu *et al.* ont démontré que la relâche de CNP des EC est induite en présence des VSMC via un processus dépendant de TGF- $\beta$ . De plus, cette relâche endothéliale de CNP

est capable d'empêcher la prolifération des VSMC voisines (Komatsu *et al.*, 1996). Au niveau des reins, l'ANP antagonise la prolifération des cellules mésangiales glomérulaires induite par le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) (Kohno *et al.*, 1993). Cette inhibition peut se faire en partie par un processus impliquant l'expression d'une MAPK phosphatase, la MKP-1, qui supprime l'activité de la MAPK par déphosphorylation, sous la régulation intracellulaire du second messenger GMPC (Sugimoto *et al.*, 1996). Un autre mécanisme peut être la relâche subséquente de TGF- $\beta$ , ayant des propriétés anti-prolifératives intrinsèques (Wolf *et al.*, 1995). Enfin, au niveau des thymocytes de rat, l'ANP montre aussi des propriétés anti-prolifératives, probablement via le récepteur NPR-A (Voolmar *et al.*, 1996).

#### **2.1.4. Bradykinine**

Un traitement aux iECA potentialise l'accumulation de la bradykinine (BK) autour de cellules de différents organes. Au niveau des fibroblastes cardiaques, la BK ainsi que la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) sont capables d'influencer la formation et la dégradation du collagène (Zhou *et al.*, 1993). Des fibroblastes cardiaques isolés de sites d'infarctus démontrent une augmentation d'expression de cyclooxygénase et de synthèse de PGE<sub>2</sub> (Weber *et al.*, 1989). De plus, 4 semaines après l'induction d'un infarctus chez le lapin, la relâche de PGE<sub>2</sub> induite par la BK est augmentée au niveau du coeur, bien après la phase inflammatoire de la fibrose réparative (Evers *et al.*, 1985; Weber *et al.*, 1995).

## 2.2. Rôles des facteurs de croissance et des cytokines

### 2.2.1. Facteur de croissance transformant- $\beta$

Le facteur de croissance transformant- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) semble être un élément modulateur important dans l'expression des protéines de l'ECM, le collagène en particulier, dans le développement cardiaque ainsi que dans l'apparition d'une hypertrophie pathologique (Engelmann, 1993; Villareal et Dillmann, 1992; Choy *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 1988). Dans les fibroblastes cardiaques, le TGF- $\beta$  augmente les ARNm des collagènes de types I et III ainsi que les protéines des collagènes totaux, probablement en augmentant le taux de transcription génique (Butt *et al.*, 1995; Eghbali *et al.*, 1989). Dans d'autres types cellulaires de rats et de souris, le TGF- $\beta$  agit au niveau d'éléments en *cis* en amont du promoteur des gènes codant pour les collagènes fibreux afin d'en activer la transcription (Ritzenthaler *et al.* 1993). Aussi, d'autres études ont montré un effet sur la stabilité de l'ARNm du procollagène (Slack *et al.*, 1993).

Villareal et Dillmann ont montré l'augmentation cardiaque de l'ARNm de TGF- $\beta_1$  en réponse à une surcharge de pression. De plus, cette induction d'expression s'est manifestée très rapidement après le début de la constriction aortique, précédant l'expression de fibronectine et la production subséquente de collagène, et montrant ainsi une relation temporelle entre ce facteur de croissance et les protéines de l'ECM (Villareal et Dillmann, 1992). Au niveau cellulaire, les myocytes cardiaques mais non les fibroblastes, produisent une augmentation d'expression de TGF- $\beta_1$  en réponse à deux stimuli hypertrophiques, soient la surcharge de pression et l'administration de

norépinéphrine. Dans ce dernier, le processus peut se faire via le récepteur  $\alpha_1$ -adrénergique (Takahashi *et al.*, 1994). De plus, au niveau des cardiomyocytes de rats nouveaux-nés, le TGF- $\beta$  participe à l'expression de nombreux gènes cardiaques, régule les rythmes et les taux des battements cardiaques des cellules mises en culture et antagonise les effets presseurs de l'interleukine-1 $\beta$  (Roberts *et al.*, 1992; Parker *et al.*, 1990). Des études récentes semblent impliquer le TGF- $\beta$  dans les réponses hypertrophique et hyperplasique de l'Ang II au niveau des fibroblastes cardiaques. Durant des processus hypertrophiques induits par l'Ang II, le TGF- $\beta$  y joue un rôle inducteur prépondérant probablement via un mécanisme autocrine/paracrine (Lee *et al.*, 1995; Koibuchi *et al.*, 1993). Par contre, le TGF- $\beta_1$  inhibe la prolifération des fibroblastes cardiaques, phénomène qui coïncide avec sa capacité d'initier des changements phénotypiques par l'expression de gènes spécifiques aux cellules musculaires, dont l'actine  $\alpha$ -squelettique (Sigel *et al.*, 1996). Récemment, Herrera *et al.* ont montré l'implication de la protéine rétinoblastome dans les propriétés hypertrophiques, montrant une régulation importante des effets tantôt hyperplasiques, tantôt anti-prolifératifs au niveau des fibroblastes fœtaux (Herrera *et al.*, 1996). De plus, des études *in vivo* ont montré une régulation contrôlée des effets du TGF- $\beta$  sur l'accumulation de protéines de l'ECM par un protéoglycan, la décorine. En effet, la décorine pourrait être un élément clinique important dans les maladies associées à la production excessive de TGF- $\beta$ , telle la glomérulonéphrite (Border *et al.*, 1992).

---

### 2.2.2. Facteur de croissance insulino-mimétique-1

Dans différents modèles d'hypertrophie cardiaque par surcharge de pression, les augmentations d'ARNm et de la protéine du facteur de croissance

insulinomimétique-1 (IGF-1) au niveau du ventricule gauche, lui confèrent un rôle dans la réponse adaptative du coeur (Donohue *et al.*, 1994). Récemment, Andronico *et al.* ont montré une relation directe entre la surcharge de pression et le taux plasmatique d'IGF-1 chez des patients hypertendus (Andronico *et al.*, 1996). De plus, une administration *in vivo* de l'IGF-1 provoque une hypertrophie cardiaque (Lembo *et al.*, 1995). La production locale d'IGF-1 et la signalisation subséquente qu'il entraîne peuvent jouer un rôle important dans la réponse des cardiomyocytes au stress. Au niveau cellulaire, l'IGF-1 augmente la synthèse protéique ainsi que l'expression de  $\beta$ -MHC dans les myocytes ventriculaires adultes (Ito *et al.*, 1993). Dans ces derniers, il semble que l'IGF-1 peut augmenter de manière importante la production de nouvelles myofibrilles (Donath *et al.*, 1994). Au niveau des fibroblastes, une région submembranaire du récepteur de l'IGF-1 semble être impliquée dans leur prolifération (Hsu *et al.*, 1994). L'IGF-1 s'est montré capable d'augmenter la production des collagènes totaux dans des fibroblastes cardiaques fœtaux, sans influencer leur nombre (Butt *et al.*, 1995).

Depuis quelques années, des études ont été entreprises afin d'investiguer la possibilité d'une application clinique du traitement à l'IGF-1 en insuffisance cardiaque. En effet, l'administration d'IGF-1, dans un modèle de défaillance cardiaque après infarctus du myocarde chez le rat, a amélioré les performances cardiaques par un agrandissement ventriculaire, une augmentation de la pression en fin de diastole sans changement dans la pression en fin de systole et une augmentation de la fraction d'éjection (Pfeiffer *et al.*, 1991). Récemment, Duerr *et al.*, par l'administration simultanée d'IGF-1 et d'hormone de croissance (GH), ont constaté un

remodelage ventriculaire mineur avec l'augmentation du débit cardiaque et diminution de la résistance vasculaire systémique (Duerr *et al.*, 1996).

### 2.2.3. Facteur de croissance basique du fibroblaste

Les myocytes cardiaques semblent être capables de synthétiser le facteur de croissance basique du fibroblaste (bFGF) et de le relâcher dans le milieu extracellulaire (Bastagli *et al.*, 1995; Cummins, 1993). Cette synthèse locale de bFGF peut participer aux processus régénératifs du cœur en défaillance ou après des épisodes de stress (Bastagli *et al.*, 1995). En effet, le bFGF pourrait avoir des effets cardioprotecteurs après des épisodes d'ischémie et de reperfusion (Padua *et al.*, 1993). L'expression de bFGF semble plus abondante dans les oreillettes que les ventricules en plus d'être localisée autour du noyau, près des bandes Z et en association avec les jonctions cellulaires de type gap (Kardami *et al.*, 1991a; Kardami *et al.* 1991b). De plus, l'expression de bFGF semble augmenter chez l'adulte, comparativement au nouveau-né ou chez l'embryon. Dans le myocarde immature, la forme de 18 kDa du bFGF, associée à des phénomènes hyperplasiques, est plus abondante tandis que dans le myocarde adulte, on retrouve une plus grande quantité de la forme de 22 kDa, responsable de processus hypertrophiques (Kardami *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1993).

Des études *in vitro* au niveau des myocytes ventriculaires adultes ont montré l'augmentation de la relâche de bFGF en réponse à des contractions induites par *pacing* électrique, à une exposition brève de concentrations fortes d'agoniste  $\beta$ -adrénergique et à une exposition au sérum (Kaye *et al.*, 1996; Padua et Kardami, 1993; Speir *et al.*, 1992; Weiner et Swain, 1989). De plus,



l'Ang II, l'ET-1, l'IL-1 $\beta$  et même le bFGF ont augmenté l'expression de l'ARNm du bFGF dans les cardiomyocytes et dans les cellules endothéliales de la microvasculature cardiaque, montrant une régulation spécifique reliée aux types cellulaires par des mécanismes autocrine/paracrine (Fisher *et al.*, 1997). Enfin, le bFGF semble participer à la sécrétion de collagène au niveau des fibroblastes cardiaques en plus d'initier leur réplication (Butt *et al.*, 1995).

#### **2.2.4. Facteur de croissance dérivé des plaquettes**

Il n'existe pas beaucoup d'études qui ont investigué le rôle du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) dans les processus hypertrophiques au niveau du coeur. Dans le coeur adulte normal, on retrouve la chaîne B du PDGF, qui pourrait suggérer son rôle important dans le développement cardiovasculaire normal (Long *et al.*, 1990). En effet, des embryons de souris déficientes en chaîne B du PDGF présentent des dilatations importantes au niveau des grosses artères et du coeur (Leveen *et al.*, 1994). Chez ceux qui n'expriment plus la chaîne A du PDGF, on peut aussi noter des anomalies épiscopiale et endocardiale (Schattmann *et al.*, 1994).

Une étude récente de Simm *et al.* a révélé la présence de récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  biologiquement actifs et spécifiques au PDGF au niveau des fibroblastes cardiaques adultes. De plus, les deux isoformes du PDGF (homodimères AA et BB) engendrent une prolifération cellulaire via un mécanisme impliquant la MAPK et l'activation de la p70<sup>S6</sup> kinase, toutes deux impliquées dans la régulation de la croissance (Simm *et al.*, 1997). D'autres études ont montré l'implication de processus dépendant de la PKC pour la synthèse d'ADN mais indépendant de celle-ci pour l'activation de la MAPK (Booz *et al.*, 1994;

Schorb *et al.*, 1994; Schorb *et al.*, 1993). Le PDGF amène aussi la phosphorylation de résidus tyrosine retrouvés sur des protéines impliquées dans la cascade intracellulaire menant à la croissance, dont le récepteur au PDGF, la PLC $\gamma$ , la phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K), la p46<sup>SHC</sup> et la p56<sup>SHC</sup> (Schorb *et al.*, 1994). Souvent en quantité plus importante aux sites présentant des lésions, le PDGF pourrait jouer un rôle important dans la fibrose cardiaque car il peut induire la production de collagène (Booz et Baker, 1995; Butt *et al.*, 1995). Il a aussi été montré que le PDGF peut provoquer l'hypertrophie des cardiomyocytes (Long *et al.*, 1991). Dans les cellules vasculaires musculaires lisses, le PDGF agit comme facteur de compétence nécessaire aux effets mitotiques qu'engendrent l'Ang II et l'ET-1 (Jahan *et al.*, 1996).

### **2.2.5. Interleukine-1**

Dans un modèle d'hypoxie myocardiale en culture, Long *et al.* ont démontré la production d'IL-1 par les fibroblastes cardiaques (Long *et al.*, 1993). De plus, l'IL-1 est exprimée au niveau du coeur après des épisodes ischémiques induits par un infarctus du myocarde (Booz et Baker, 1995). Au niveau cellulaire, l'IL-1 est capable de provoquer l'hypertrophie des cardiomyocytes de rats nouveaux-nés (Thaik *et al.*, 1995). Récemment, une nouvelle cytokine, appelée cardiotrophin I, a été décrite et semble promouvoir l'hypertrophie des myocytes cardiaques (Pennica *et al.*, 1995).

---

### 3. Peptide natriurétique auriculaire

Le peptide natriurétique auriculaire (ANP) est une hormone peptidique principalement synthétisée au niveau du coeur, participant à l'homéostasie de la pression artérielle et à la régulation du volume des fluides extravasculaires. Il est bien connu pour ses actions vasodilatatrice, diurétique et natriurétique. Bien qu'en concentration élevée dans le tissu auriculaire de plusieurs espèces incluant l'humain, l'ANP se retrouve aussi en quantité plus faible dans certains organes, dont le cerveau, la moëlle épinière, l'hypophyse, le rein, les surrénales et le plasma (Rodeheffer *et al.*, 1993; Yandle *et al.*, 1993; Imura *et al.*, 1992; Ritter *et al.*, 1992; Inagaki *et al.*, 1986a; Inagaki *et al.*, 1986b; Yandle *et al.*, 1986).

Conférant au coeur un nouveau rôle d'organe endocrinien, la découverte d'un facteur natriurétique et diurétique par de Bold en 1981 a mené à l'isolement, au clonage génique et aux caractérisations structurales et fonctionnelles d'une nouvelle famille peptidique: les peptides natriurétiques (Sudoh *et al.*, 1990; Sudoh *et al.*, 1988a; Sudoh *et al.*, 1988b; de Bold, 1985; de Bold *et al.*, 1981). En effet, on compte maintenant trois membres, soient l'ANP, le *brain natriuretic peptide* (BNP) et le peptide natriurétique de type-C (CNP), qui possèdent une grande homologie relative et dont les actions biologiques s'effectuent via les mêmes récepteurs membranaires et la génération du même second messager.

---

### 3.1. Structure et synthèse

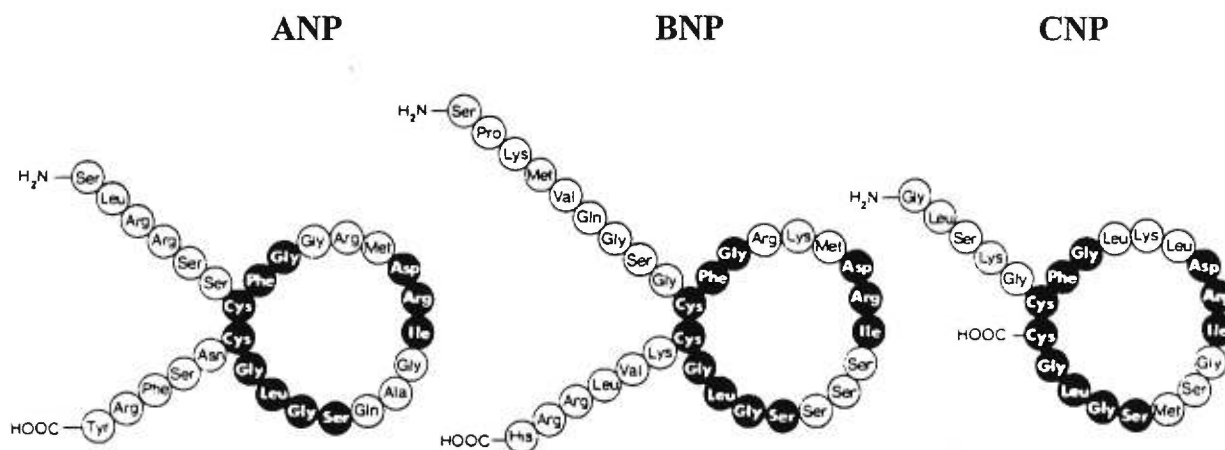
L'ANP est un peptide circulant sous plusieurs formes, dont la principale est l'ANP<sub>(99-126)</sub>, aussi appelé  $\alpha$ -ANP. Composé de 28 acides aminés (a.a.), l'ANP présente une boucle de 17 a.a. formée par un pont disulfure entre les cystéines en position 105 et 121 et qui s'avère indispensable pour la liaison à son récepteur et donc à sa fonction biologique (Figure 1.1) (Atlas et Laragh, 1986; Schwartz *et al.*, 1985; Currie *et al.*, 1984). De plus, la séquence primaire de l'ANP est hautement conservée entre les espèces étudiées de mammifères, à l'exception d'une substitution à la position 110. En effet, chez les espèces humaine, bovine, porcine et canine, une méthionine occupe cette position contrairement à une isoleucine chez les rongeurs tels le lapin, le rat et la souris (Yandle *et al.*, 1991; Needleman *et al.*, 1989). Toutes les formes d'ANP circulant originent d'un même précurseur de 126 a.a., le pro-ANP (ou  $\gamma$ -ANP), provenant de la forme codée du gène, le prépro-ANP, un précurseur de 152 a.a.

La séquence génique de l'ANP a été déterminée par l'isolement de son ADN complémentaire et directement de son gène (Greenburg *et al.*, 1984; Nakayama *et al.*, 1984, Nemer *et al.*, 1984; Oikawa *et al.*, 1984). Le gène de l'ANP comporte trois exons séparés de deux introns et contient des éléments régulateurs en aval de la séquence codante qui pourraient conférer son expression spécifique au niveau des cardiomyocytes (Lapointe *et al.*, 1988). Ce gène possède aussi une région homologue aux régions AP-1 capable de lier les proto-oncogènes *c-fos* et *c-jun*, une région répondant à l'AMPc de même qu'une région sensible aux glucocorticoïdes (Kovacic-Milivojevic et Gardner, 1992; Argentin *et al.*, 1991; Rosenzweig *et al.*, 1991). Le transcrit primaire est

un prépro-peptide de 152 a.a. (Kangawa *et al.*, 1984; Nakayama *et al.*, 1984). La séquence du peptide signal de ce dernier est ensuite clivée par une endopeptidase pour donner naissance au pro-ANP, qui est emmagasiné dans des granules de sécrétion au niveau des cardiomyocytes auriculaires (Miyata *et al.*, 1985; Thibault *et al.*, 1987). Lors de sa relâche, le pro-ANP est scindé pour produire un fragment N-terminal de 98 a.a. (ANP<sub>(1-98)</sub>) et un fragment biologiquement actif de 28 a.a. (ANP<sub>(99-126)</sub>) (Sei *et al.*, 1992; Corthorn *et al.*, 1991; Glembotski *et al.*, 1991; Michener *et al.*, 1986; Schwartz *et al.*, 1985; Thibault *et al.*, 1985). De plus, le fragment N-terminal (1-98), cosécrété en quantité équimolaire avec l'ANP<sub>(99-126)</sub> mais dont on ne connaît pas l'importance physiologique, a une demie-vie plus longue et une élimination plus faible, d'où sa concentration plasmatique 10 fois plus élevée (Thibault *et al.*, 1988). Chez l'homme, on retrouve une autre forme dimérique antiparallèle d'ANP<sub>(99-126)</sub> dans la circulation que l'on appelle  $\beta$ -ANP, et qui s'avère anormalement élevée chez des patients en insuffisance cardiaque (Sugawara *et al.*, 1988).

Chez l'adulte, l'ANP est principalement synthétisé au niveau des oreillettes. Dans le ventricule normal adulte, les concentrations d'ARNm sont environ 100 fois inférieures aux concentrations auriculaires alors que celles du peptide immunoréactif sont 1000 fois plus faibles (Mercadier *et al.*, 1989; Gardner *et al.*, 1986; Nemer *et al.*, 1986). Des quantités faibles d'ARNm de prépro-ANP sont aussi retrouvées dans les cellules ventriculaires normales (Gutkowska et Nemer, 1989; Forssman *et al.*, 1986). De plus, en conditions hémodynamiques où le coeur répond à une situation de stress telles les surcharges de volume et de pression, les myocytes ventriculaires réexpriment le gène de l'ANP. Cela constitue un excellent marqueur de l'hypertrophie

cardiaque dans différents modèles expérimentaux mais son importance physiologique est encore mal comprise (Calderone *et al.*, 1995).



*Figure 1.1* Structure et séquence en acides aminés des membres de la famille des peptides natriurétiques humains. Les formes matures sont l'ANP, le BNP-32 et le CNP-22. Les cercles noirs représentent les acides aminés qui sont communs pour les trois membres de cette famille. D'après Yandle (1994).

### 3.2. Sécrétion

La distension mécanique exercée sur la paroi des oreillettes est un facteur important dans la régulation de la sécrétion d'ANP (Ruskoaho *et al.*, 1992; Rosenzweig et Seidman, 1991). En plus du rôle de l'étirement, la relâche d'ANP peut être contrôlée par des facteurs humoraux provenant de la circulation sanguine. En effet, des études ont démontré l'effet sécrétagogue intrinsèque et potentialisateur de plusieurs substances vasoactives, dont l'angiotensine II, l'endothéline-1, la vasopressine et les prostaglandines (Thibault *et al.*, 1994; Itoh *et al.*, 1987; Klemm *et al.*, 1987; Westenfelder et Baranowski, 1987; Manning *et al.*, 1985). Les minéralocorticoïdes, les glucocorticoïdes, les androgènes et les hormones thyroïdiennes stimulent aussi la sécrétion d'ANP (Gardner *et al.*, 1988; Matsubara *et al.*, 1987; Ballerman *et al.*, 1986; Garcia *et al.*, 1985). D'autres produits influencent sa concentration plasmatique comme le diéthyl éther, un agent anesthésiant, et la morphine (Gutkowska *et al.*, 1986). Plus récemment, Focaccio *et al.* ont démontré l'importance de la température sur la relâche d'ANP lors d'épisodes ischémiques dans le coeur de lapin (Focaccio *et al.*, 1995). Au niveau cellulaire, l'activation de la PKC stimule la sécrétion d'ANP alors que celle de la PKA l'atténue (Shields et Glembotski, 1989).

Le mécanisme intracellulaire responsable de la libération de l'ANP semble être régulé par les flux transmembranaires de  $Ca^{2+}$ . En effet, une augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$ , provoquée soit par une inhibition de la pompe  $Na^+/K^+$  ATPase, une activation des canaux calciques ou une augmentation de la calcémie, amène la relâche de l'ANP (Hirata *et al.*, 1988; Hu *et al.*, 1988; Yamamoto *et al.*, 1988). L'ANP repose dans les granules de sécrétion sous la

forme de la pro-hormone. Plus récemment, Canaff *et al.* ont démontré l'importance des paires de résidus acides en positions 23 et 24 du pro-ANP pour sa liaison avec la  $\text{Ca}^{2+}$ , son aggrégation subséquente et sa séquestration dans les granules de sécrétion de la voie régulée (Canaff *et al.*, 1996). Entre la sécrétion et l'entrée du peptide mature dans le sinus coronaire, des mécanismes enzymatiques sont requis pour le clivage du pro-ANP car les coeurs perfusés de rats sécrètent seulement l'ANP sous sa forme mature de 28 a.a. (Thibault *et al.*, 1986). Ces mécanismes demeurent pour le moins obscurs bien que deux enzymes peuvent catalyser *in vitro* cette réaction de clivage (Wypij et Harris, 1992; Imada *et al.*, 1988).

### 3.3. Actions physiologiques

L'ANP possède de fortes activités diurétique, natriurétique et vasorelaxante (Figure 1.2) (Cantin et Genest, 1985; Laragh, 1985). Ses activités reposent en partie sur les différentes actions antagonisant les effets physiologiques du système rénine-angiotensine et de la vasopressine (AVP). Tout d'abord, l'ANP agit comme modulateur du système rénine-angiotensine et en contrôle sa production. En effet, l'ANP est capable d'inhiber la sécrétion de rénine au niveau des cellules de l'appareil juxtaglomérulaire rénal (Henrich *et al.*, 1987; Kurtz *et al.*, 1986). En plus d'inhiber l'effet hypertenseur périphérique de l'Ang II, l'ANP réduit ses effets constricteurs glomérulaire et mésangiale, la réabsorption des électrolytes et de l'eau qu'elle induit au tube contourné proximal et son effet sécrétagogue d'aldostérone (Barrio *et al.*, 1987; Casto *et al.*, 1987; Naruse *et al.*, 1987; Atarashi *et al.*, 1985). Cet effet inhibiteur sur la relâche d'aldostérone représente aussi un effet direct de l'ANP sur la synthèse basale de tous les stéroïdes corticosurréaliens en plus de la



réduction de l'activité du système rénine-angiotensine (Laragh, 1985; Racz *et al.*, 1985; Goodfriend *et al.*, 1984). Par ailleurs, l'ANP inhibe les effets vasoconstricteurs de l'AVP sur les fibres musculaires lisses, son effet antidiurétique sur le tubule collecteur de la médulla rénale en plus d'en empêcher directement la synthèse au niveau du système nerveux central (Meyer-Lehnet *et al.*, 1988; Nonoguchi *et al.*, 1988; Standaert *et al.*, 1987).

L'ANP montre des propriétés hémodynamiques intrinsèques à différents niveaux. Au niveau de la circulation, l'ANP est capable d'augmenter la pression osmotique dans les capillaires et de provoquer une vénéodilatation, ce qui diminue respectivement le volume plasmatique et la pression de remplissage, résultant en une diminution significative de la pré-charge (Espiner, 1994). L'ANP diminue le débit cardiaque à court terme tandis que son effet hypotenseur artériolaire semble persister, suggérant son rôle important à plus long terme dans la réduction de la résistance vasculaire périphérique (Mizelle *et al.*, 1992; Parkes *et al.*, 1988). Au niveau cellulaire cardiaque, l'ANP possède des propriétés vagoexcitatrice et sympathoinhibitrice, entraînant respectivement une augmentation dans l'activité des récepteurs muscariniques et une diminution au niveau de celle des récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques. En effet, l'ANP, via une potentialisation du courant potassique couplé à l'acétylcholine, augmente la vitesse de conduction et réduit la phase 4 de dépolarisation au niveau du tissu auriculaire en plus de diminuer la génération de potentiels d'actions dans les cellules *pacemaker* du noeud sinusal (Clemo *et al.*, 1996). De plus, l'ANP inhibe le canal calcique et l'entrée successive de calcium dans les cellules du noeud auriculo-ventriculaire, qui se traduit par une diminution de la vitesse de conduction (Clemo *et al.*, 1996). Au niveau des myocytes ventriculaires et des cellules des

muscles papillaires, l'ANP semble en diminuer la contractilité (Neyes et Vetter, 1989; Meulemans *et al.*, 1988).

Au niveau rénal, l'ANP peut stimuler la natriurèse et la diurèse de façon directe en agissant au niveau de plusieurs mécanismes. En effet, l'ANP produit une augmentation de la filtration glomérulaire en provoquant une dilatation des artérioles afférentes et une constriction des artérioles efférentes (Huang *et al.*, 1985). L'ANP agit aussi au niveau des tubules collecteurs afin d'empêcher la réabsorption de sodium (Atlas et Laragh, 1986; Needleman et Greenwold, 1986). De plus, l'ANP peut causer une redistribution du flot sanguin vers les néphrons plus distaux où la réabsorption de sodium est faible (Buckalew *et al.*, 1987). L'ANP participe également dans la balance positive d'excrétion d'autres ions, notamment en augmentant les concentrations de chlore urinaire ainsi que des ions calcium, magnésium et phosphates, tout en n'affectant pas l'excrétion des ions potassium (Maack et Kleinert, 1984). Chez l'homme, on note clairement une augmentation dans l'excrétion de sodium et de GMPc après des infusions brèves d'ANP qui génèrent des niveaux plasmatiques plus élevés mais toujours physiologiques (Richards *et al.*, 1988). Chez des patients plus âgés, cette réponse natriurétique diminue bien que le niveau plasmatique de GMPc reste le même (Or *et al.*, 1993).

Des études plus récentes à l'aide de souris n'exprimant pas le gène du pro-ANP ou encore celui du récepteur de type A ont montré l'implication du système natriurétique dans l'hypertension. En effet, les souris homozygotes déficientes en pro-ANP ont montré une pression sanguine significativement supérieure alors que chez les souris hétérozygotes, seule une diète riche en sodium a provoqué ce même effet. Cette expérience montre qu'une baisse de

production d'ANP peut mener à l'hypertension chez des individus présentant une sensibilité accrue au sel (John *et al.*, 1995). De plus, chez des souris homozygotes n'exprimant pas le récepteur de type A, l'élévation de pression sanguine s'est manifestée dans tous les types de diètes en sel, ce qui peut expliquer les formes de résistance au sel rencontrées chez des patients hypertendus (Lopez *et al.*, 1995).

---

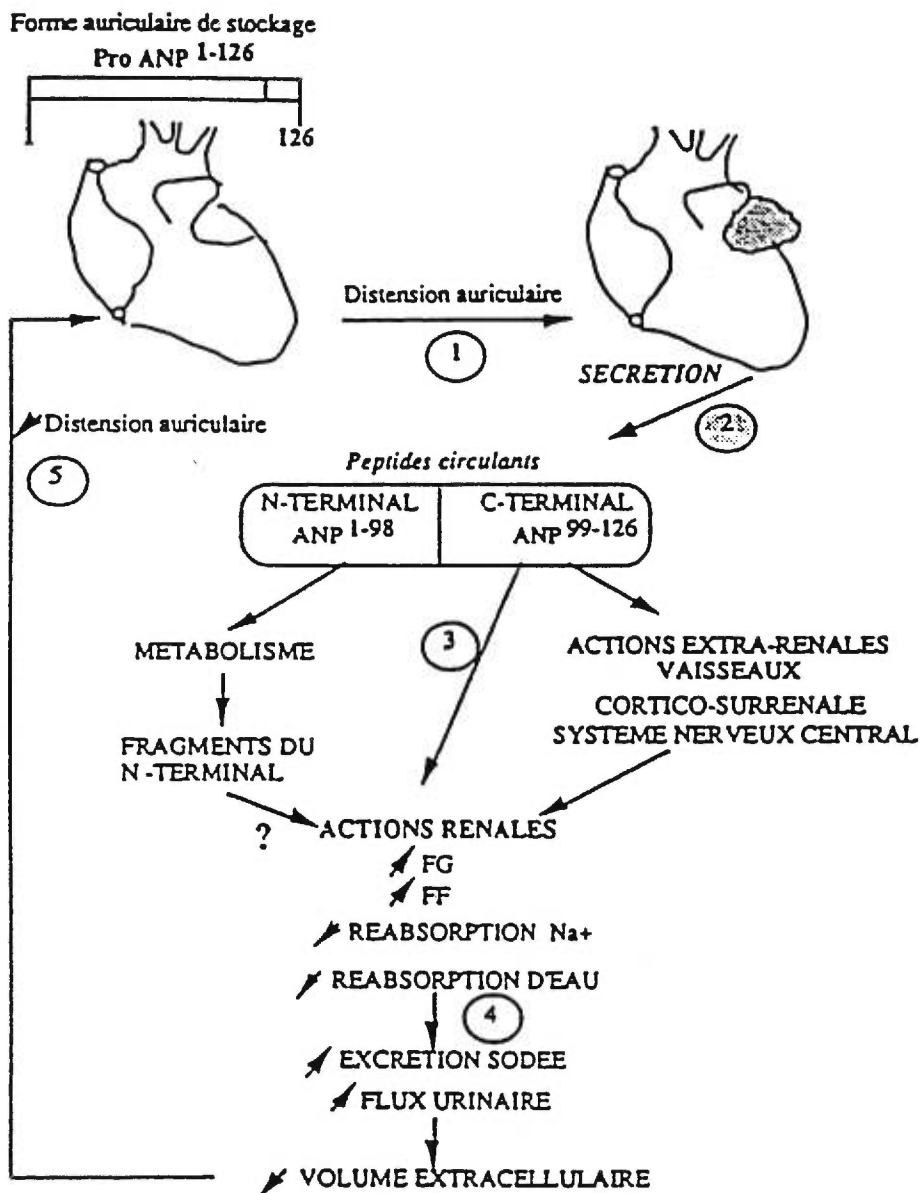


Figure 1.2 Actions physiologiques de l'ANP. L'expansion du volume extracellulaire entraîne une distension auriculaire (1), stimulant la sécrétion d'ANP (2). Via la liaison à des récepteurs au niveau de différents tissus, l'ANP agit directement (3) ou indirectement sur la fonction rénale. L'augmentation de l'excrétion hydrique et sodée (4) provoque une réduction du volume extracellulaire. Les volorécepteurs auriculaires perçoivent la diminution volumique (5). D'après Peterson et Benjamin (1992).

(1) FG : Filtration glomérulaire  
FF : Fraction filtrée

### 3.4. Métabolisme

La demi-vie de l'ANP chez l'homme est de l'ordre de 2 à 3 minutes dans la circulation sanguine après sa sécrétion au niveau des oreillettes (Yandle *et al.*, 1986). Les processus cataboliques sont donc très actifs et comportent deux mécanismes principaux: les récepteurs de clairance (NPR-C) et l'endopeptidase neutre EC 24.11 (NEP).

Maark *et al.*, en 1987, ont suggéré l'existence des récepteurs de clairance à l'ANP. En effet, en bloquant l'activité du récepteur NPR-C avec un agoniste spécifique, il se produit une diminution significative de la clairance de l'ANP (Maark *et al.*, 1987). Après la liaison à ce sous-type de récepteur, l'ANP est internalisé pour être acheminé vers les lysosomes où s'effectue sa dégradation (Nussenzveig *et al.*, 1990). Le récepteur NPR-C est abondant dans beaucoup de tissus: entre autres, il représente 95% des sites de liaisons des peptides natriurétiques dans les cellules endothéliales et rénales, 90% dans les cellules musculaires lisses et 73% dans les poumons (Olins *et al.*, 1988). De plus, des transcrits du récepteur NPR-C sont présents au niveau du coeur, du cerveau, de l'hypophyse, du rein, et des surrénales (Canaankuhl *et al.*, 1992; Nunez *et al.*, 1992; Wilcox *et al.*, 1991).

De son côté, la NEP (ou enképhalinase) est capable de cliver l'ANP entre les résidus Cys<sup>105</sup>-Phe<sup>106</sup> et Ser<sup>123</sup>-Phe<sup>124</sup>, de façon à rompre la boucle indispensable à son activité (Olins *et al.*, 1987; Stephenson et Kenny, 1987). La NEP est une ecto-enzyme transmembranaire contenant un site actif extracellulaire qui est capable d'agir sur différents substrats hormonaux dont l'Ang II, l'endothéline, l'enképhaline et la gastrine, en plus de cataboliser

l'ANP (Roques *et al.*, 1993; Gafford *et al.*, 1983). De plus, elle peut moduler les niveaux de peptides natriurétiques dans différents organes puisqu'elle est présente dans le tissu vasculaire, les glomérules, les cellules musculaires lisses rénales et dans les cellules épithéliales du tube contourné proximal (Tamburini *et al.*, 1989; Dickinson *et al.*, 1991; Dussaule *et al.*, 1993; Landry *et al.*, 1993).

### 3.5. Le peptide natriurétique de type-B

Le BNP présente une structure homologue à l'ANP et contient aussi une boucle de 17 a.a. (Figure 1.1) (Yandle, 1994). Originellement identifié dans le cerveau porcin, le BNP se trouve en fait en plus grande quantité au niveau du coeur (Sudoh *et al.*, 1988a; Hino *et al.*, 1990). Ce dernier est maintenant accepté comme la source principale de synthèse du BNP circulant, qui se présente sous la forme principale du BNP de 32 kD chez l'homme (Yandle, 1994; Sudoh *et al.*, 1988b).

L'organisation fonctionnelle du gène du BNP est similaire à celle de l'ANP bien qu'il présente des différences importantes au niveau de la régulation d'expression. Aussi, la maturation du pro-BNP se fait au niveau de sites distincts, ce qui peut expliquer une homologie de 59% entre les deux peptides (Rosenzweig et Seidman, 1991). Au niveau des oreillettes, le BNP et l'ANP se trouvent dans les mêmes granules et sont co-sécrétés en réponse à l'étirement de la paroi (Thibault *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1991). Bien qu'en quantité plus élevée au niveau des oreillettes, 60% du BNP circulant provient de sa sécrétion dans les ventricules normaux (Ogawa *et al.*, 1991; Abuyara *et al.*, 1989). De plus, sa sécrétion ventriculaire est significativement augmentée dans les processus de surcharges hémodynamiques. En fait, le BNP

agirait comme hormone d'urgence par sa synthèse ventriculaire rapide lorsque le coeur se trouve en épisodes de stress (Nakagawa *et al.*, 1995).

L'administration de BNP induit des changements hémodynamiques apparentés à ceux qu'entraînent l'ANP (McGregor *et al.*, 1990). Ainsi, le BNP inhibe l'activité de la rénine plasmatique, supprime la relâche d'aldosérone induite par l'Ang II, augmente l'excrétion de sodium via un mécanisme impliquant le GMPc en plus de potentialiser l'action vasorelaxante de l'ANP (Espiner, 1994; Hashiguchi *et al.*, 1988).

### **3.6. Le peptide natriurétique de type-C**

À l'origine isolé dans le cerveau porcin où il est le peptide natriurétique le plus abondant, le CNP et son transcrite se retrouvent aussi au niveau des cellules endothéliales, musculaires vasculaires lisses et cardiaques (Suga *et al.*, 1992; Sudoh *et al.*, 1990). Le CNP, tout comme l'ANP et le BNP, présente une structure avec un boucle de 17 a.a. (Figure 1.1). La structure de son gène n'est pas entièrement élucidée ainsi que sa maturation produisant la forme majeure atteignant la circulation (Espiner, 1994). Chez le chien, le CNP provoque une baisse de la pression artérielle et une diminution du débit cardiaque sans action natriurétique (Clavell *et al.*, 1993). D'autres études montrent cependant aucun effet du CNP sur la pression sanguine mais une augmentation des taux plasmatique et urinaire de GMPc (Espiner, 1994). Par contre, le CNP diminue la concentration d'aldostérone dans le plasma sans changer l'activité de la rénine, provoque une relaxation des artère coronaires en plus de manifester une action vénodilatatrice plus importante que l'ANP (Espiner, 1994; Wei *et al.*, 1993).

## 4. Récepteurs des peptides natriurétiques

L'ANP agit au niveau des différents organes par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires. Les récepteurs des peptides natriurétiques (NPR) se divisent en deux catégories fonctionnelles: les récepteurs qui sont dits biologiquement actifs et couplés à la génération de GMPc intracellulaire, les NPR-A et NPR-B, et les récepteurs biologiquement non actifs qui participent au métabolisme de l'ANP, les récepteurs de clairance appelés NPR-C.

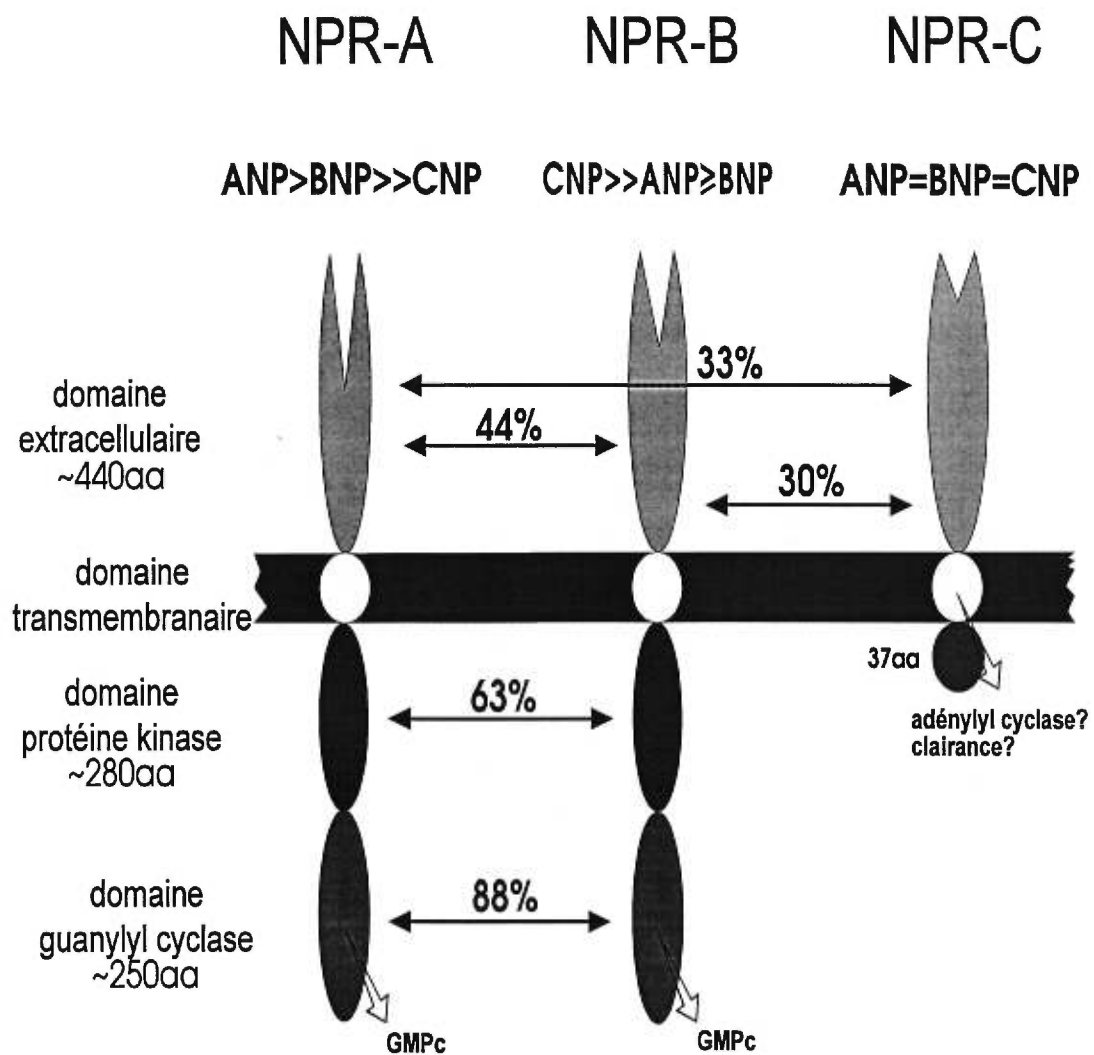
### 4.1. Structure

Les NPR-A et NPR-B présentent des structures homologues d'environ 130 kDa (Leitman *et al.*, 1986). Ils contiennent un domaine extracellulaire de 440 a.a. responsable de la liaison avec l'hormone, une région transmembranaire et un long segment intracellulaire de 568 a.a. composé d'un domaine similaire aux protéines kinases en plus du domaine enzymatique de la guanylyl cyclase qui génère le GMPc intracellulaire. Les homologies de structure entre ces 2 sous-types de NPR sont respectivement de 44, 63 et 88% pour les domaines extracellulaire, protéine kinase et guanylyl cyclase (Figure 1.3) (Chang *et al.*, 1989). Par contre, le récepteur de clairance (NPR-C) ne possède pas le long segment intracellulaire, le domaine protéine kinase et l'activité enzymatique de la guanylyl cyclase (Fuller *et al.*, 1988). Ce récepteur présente un domaine extracellulaire de 436 a.a. pour la liaison à l'hormone, une région transmembranaire de 23 a.a. et un domaine intracellulaire très court de 37 a.a., lui conférant des homologies de 33 et 30% aux NPR-A et NPR-B respectivement (Figure 1.3). À la surface cellulaire, le NPR-C semble être



exprimé principalement sous la forme d'un homodimère composé de deux sous-unités identiques de 66 kDa, bien que l'ANP possède une affinité similaire pour les formes monomérique ou dimérique (Porter *et al.*, 1989).

Le GMPc est le principal second messenger des peptides natriurétiques et la majorité de leurs actions biologiques est directement relié à sa génération intracellulaire. Cette production de GMPc requiert premièrement la liaison de l'ANP au domaine extracellulaire du récepteur. Le domaine intracellulaire ressemblant aux protéines kinases est indispensable à la transduction du signal. En effet, une délétion y provoque une activation constitutive et une production continue de GMPc, montrant le rôle inhibiteur de cette région dans les conditions basales (Koller *et al.*, 1993; Chinkers et Garbers, 1989). De plus, l'adénosine triphosphate (ATP), en se liant au domaine protéine kinase, semble participer à une étape importante de phosphorylation qui influence l'activité de la guanylyl cyclase en potentialisant la production de GMPc en présence de l'ANP (Potter et Garbers, 1994; Koller *et al.*, 1993; Chinkers *et al.*, 1991). De plus, la présence simultanée de l'ANP et de l'ATP semble indispensable pour l'activation du récepteur (Chinkers *et al.*, 1991).



*Figure 1.3* Représentation schématique des récepteurs des peptides natriurétiques de rat.

## 4.2. Distribution tissulaire

Chez l'homme, l'expression des récepteurs natriurétiques a été retrouvée aux niveaux des reins, des glandes surrénales, du cerveau de l'hypophyse et du coeur (Nunez *et al.*, 1992). Les récepteurs de l'ANP se retrouvent aussi dans la majorité des tissus provenant du rat, incluant les reins, les poumons, le cerveau, l'hypophyse, les glandes surrénales, le foie, l'aorte et le coeur (Nunez *et al.*, 1992; Tallerico-Melnyk *et al.*, 1992).

Au niveau du coeur, des études de radio-liaison sur des cellules isolées ont montré la présence de récepteurs au niveau des myocytes et des fibroblastes ventriculaires (Cao et Gardner, 1995; Neyes et Vetter, 1989;). Dans les cellules endothéliales, musculaires lisses et les fibroblastes de poumons en culture, le récepteur NPR-C représente 90% de la population des NPR. Dans le rein total, 95% des sites de liaison sont du sous-type NPR-C (Maack, 1992). Par contre, des études plus précises montrent la présence de 50 et 70% de récepteur NPR-C dans la papille rénale et les glomérules respectivement (Martin *et al.*, 1989; Maack *et al.*, 1987).

## 4.3. Sélectivité

La sélectivité des récepteurs NPR-A et NPR-B est reliée directement à la structure des ligands. Une rupture du pont disulfure, une délétion ou une substitution des a.a. à l'intérieur de la boucle ou une délétion de la région C-terminale Phe-Arg-Tyr de l'ANP affectent sa liaison aux récepteurs (Olins *et al.*, 1988, Scarborough *et al.*, 1988; Scarborough *et al.*, 1986; Schenk *et al.*, 1985). Par contre, la région N-terminale et le résidu Tyr<sup>126</sup> dans la portion C-

terminale ne semblent pas être importants car l'ANP<sub>(103-126)</sub> et l'ANP<sub>(103-125)</sub> sont aussi efficaces à lier les récepteurs NPR-A et NPR-B que l'ANP<sub>(99-126)</sub> (Maack et Kleinert, 1986).

La liaison au récepteur NPR-C requiert une structure beaucoup moins précise du ligand. En effet, différentes substitutions au niveau de l'ANP<sub>(99-126)</sub> ont donné naissance à des analogues présentant une affinité similaire pour le récepteur NPR-C (Adams *et al.*, 1988; Leitman *et al.*, 1988; Leitman *et al.*, 1986). Le prototype de ces analogues est le des[Gln<sup>18</sup>, Ser<sup>19</sup>, Gly<sup>20</sup>, Leu<sup>21</sup>, Gly<sup>22</sup>]ANP<sub>(4-23)</sub>-NH<sub>2</sub> de rat, aussi appelé c-ANP. Le c-ANP possède la même affinité de liaison que l'ANP<sub>(99-126)</sub> pour le récepteur NPR-C, tout en n'induisant ou en n'antagonisant pas la production de GMPC induite par ce dernier (Maack *et al.*, 1987). Dès lors, il a été possible de discriminer la présence de récepteurs couplés à la guanylyl cyclase et le récepteur de clairance aux niveaux de différents tissus et de cellules en culture.

L'ordre de grandeur de l'affinité des peptides natriurétiques pour le récepteur NPR-A se présente comme suit: ANP ≥ BNP >> CNP. Pour le récepteur NPR-B, l'affinité relative est: CNP >> ANP ≥ BNP. L'ANP et le BNP se lient donc à haute affinité pour le récepteur NPR-A alors que le CNP se lie à haute affinité pour le récepteur NPR-B. Enfin, l'ANP, le CNP et le BNP possèdent la même affinité de liaison pour le récepteur NPR-C, similaire à celle que présente le c-ANP (Thibault *et al.*, 1995).

#### 4.4. Seconds messagers

Les actions biologiques des peptides natriurétiques sont la conséquence d'une stimulation de la guanylyl cyclase rattachée aux récepteurs NPR-A et NPR-B, sans effet sur la guanylyl cyclase soluble. L'activation de la guanylyl cyclase est associée à une production de GMPc, suivie de sa sortie active dans le milieu extracellulaire. Les concentrations de GMPc dans le milieu extracellulaire deviennent rapidement plus élevées que celles retrouvées dans la cellule. La plupart des actions connues des peptides natriurétiques dépendent de cette accumulation de GMPc. Par la suite, le GMPc peut activer une protéine kinase dépendante du GMPc, la protéine kinase G (PKG) (Espiner, 1994).

Le rôle du récepteur NPR-C était initialement restreint au métabolisme de l'ANP (Nussenzweig *et al.*, 1990). De nombreuses études montrent maintenant l'implication du récepteur NPR-C dans les actions biologiques des peptides natriurétiques par une voie indépendante de la production de GMPc. En effet, le récepteur NPR-C est couplé à l'hydrolyse des phosphatidylinositols menant à l'activation de la protéine kinase C et à la formation d'inositol triphosphate (Hirata *et al.*, 1989). D'autres études ont montré une inhibition de l'adénylyl cyclase par la queue cytoplasmique du récepteur, avec une diminution conséquente d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) dans la cellule, via un mécanisme impliquant possiblement la protéine  $G_i$  (Anand-Srivastava *et al.*, 1996; Anand-Srivastava *et al.*, 1990). Une étude plus récente a aussi démontré l'implication du récepteur NPR-C dans la production de NO et la régulation de la NO synthase inductible après l'activation par des cytokines (McLay *et al.*, 1995). Ces observations semblent

aussi se refléter dans les actions physiologiques de l'ANP. En effet, la synthèse d'ET-1 est inhibée par l'ANP après sa liaison au récepteur NPR-C via la diminution d'AMPc intracellulaire (Hu *et al.*, 1992). La propriété anti-proliférative de l'ANP sur les cellules musculaires vasculaires lisses est due en partie à un mécanisme inconnu impliquant le NPR-C mais non le GMPc (Cahill *et al.*, 1994).

#### 4.5. Actions intracellulaires du GMPc

Les agents qui provoquent l'accumulation de GMPc dans la cellule sont capables d'atténuer l'hydrolyse des phosphatidylinositols. Au niveau des cellules musculaires lisses, l'ANP<sub>(103-125)</sub> inhibe la contraction et l'accumulation d'inositol monophosphate induites par la norépinéphrine. De plus, cette action semble être liée à la production de GMPc puisque le 8-bromo-GMPc (8-Br-GMPc), un analogue du GMPc qui traverse la membrane plasmatisque, reproduit ces effets (Rappoport, 1986). Une accumulation cellulaire de GMPc peut aussi provoquer le découplage de la protéine G à la phospholipase C (Hirata *et al.*, 1990). De plus, le GMPc peut jouer un rôle important dans les propriétés anti-prolifératives de l'ANP au niveau des cellules musculaires vasculaires lisses via un mécanisme dépendant de l'activation de la PKG et de l'inactivation subséquente de la protéine Raf-1 par phosphorylation (Yu *et al.*, 1997). Au niveau des myocytes cardiaques adultes, le GMPc semble moduler la relaxation et le tonus diastolique en réduisant la réponse relative des myofilaments au  $Ca^{2+}$ , via une possible implication de la PKG (Shah *et al.*, 1994). De plus, des études *in vitro* ont montré une augmentation de l'activité de la pompe  $Ca^{2+}$ -ATPase du réticulum sarcoplasmique suite à une phosphorylation du phospholamban par la PKG

(Cornwell *et al.*, 1991; Raeymaker *et al.*, 1988). La PKG pourrait aussi influencer l'extrusion de  $\text{Ca}^{2+}$  en modifiant l'activité des canaux calciques membranaires (Lohmann *et al.*, 1991).

## 1.5. Hypothèse de travail

En réponse à des changements hémodynamiques, l'hypertrophie cardiaque est un mécanisme d'adaptation qui découle de l'interaction entre plusieurs facteurs mécaniques et humoraux. Des peptides vasoactifs comme l'Ang II et l'ET-1 semblent agir directement au niveau du métabolisme des cellules cardiaques en induisant l'hypertrophie des cardiomyocytes et l'hyperplasie des fibroblastes. Au niveau de ces derniers, plusieurs facteurs, incluant l'Ang II et certains facteurs de croissance, peuvent aussi modifier la synthèse et la sécrétion de protéines de la matrice extracellulaire de manière à favoriser leur accumulation dans le milieu interstitiel. De plus, dans plusieurs modèles expérimentaux d'hypertrophie cardiaque, la réexpression génique de l'ANP s'avère un excellent marqueur et peut se manifester très rapidement. La relation temporelle entre cette réexpression d'ANP et la baisse subséquente d'expression de fibronectine nous a amené à poser l'hypothèse de l'effet cardioprotecteur possible des peptides natriurétiques. Jusqu'à présent, quelques études ont montré l'importance de l'ANP dans des processus anti-prolifératifs pour plusieurs types cellulaires. Par contre, au niveau cardiaque, l'utilisation de cellules provenant de rats nouveaux-nés ne peut clairement établir une relation entre les effets locaux de l'ANP sur les fibroblastes cardiaques et le remodelage ventriculaire observé en hypertrophie pathologique chez l'adulte. Afin de vérifier l'hypothèse de l'implication de l'ANP dans la cardioprotection au cours de stimuli hypertrophiques, nous

avons étudié l'effet des peptides natriurétiques sur le métabolisme des fibroblastes cardiaques de rats adultes normaux mis en cultures cellulaires primaires. Nous avons également caractériser les récepteurs des peptides natriurétiques en plus d'étudier la réponse en GMPc afin d'établir l'importance de leur implication dans les effets observés de l'ANP. Nous avons donc investiguer le rôle de l'ANP sur la prolifération et la sécrétion de fibronectine au niveau des fibroblastes cardiaques et son interaction avec le facteur de croissance PDGF.



## Chapitre 2: Article\*

Titre: Atrial natriuretic peptide inhibits early replication of adult cardiac fibroblasts following growth factor stimulus.

Auteurs: Alexandre Lacasse et Gaétan Thibault

\* Cette version de l'article a été soumise au journal *Circulation Research*

---

**ATRIAL NATRIURETIC PEPTIDE INHIBITS  
EARLY REPLICATION OF ADULT CARDIAC FIBROBLASTS  
FOLLOWING GROWTH FACTOR STIMULUS**

Alexandre Lacasse and Gaétan Thibault

MRC Multidisciplinary Research Group on Hypertension, Clinical Research  
Institute of Montreal, University of Montreal

Running title: Antiproliferative action of atrial natriuretic peptide

Key words: Atrial natriuretic peptide, proliferation, cardiac fibroblasts,  
receptors, fibronectin

Correspondence and reprints:

Gaétan THIBAUT, Ph. D.

Clinical Research Institute of Montreal

110, Pine Ave West, Montreal, Quebec H2W 1R7

Telephone: (514) 987-5613

Fax: (514) 987-5717

Email: [thibaug@ircm.umontreal.ca](mailto:thibaug@ircm.umontreal.ca)

---

## ABSTRACT

Vasoactive hormones and growth factors are involved in the morphology and cellular homeostasis of the heart, partly by controlling fibroblast proliferation associated with cardiac hypertrophy. In primary cultures of cardiac fibroblasts from adult Sprague-Dawley rats, atrial natriuretic peptide (ANP) and C-type natriuretic peptide (CNP) at 100 nmol/L inhibit by about 30% platelet-derived growth factor (PDGF)-induced fibroblast DNA synthesis. This inhibitory effect is mimicked by a cyclic GMP (cGMP) analog but is not seen in the presence of 100 nmol/L cANP, an agonist of the clearance natriuretic peptide receptor (NPR)-C, indicating a phenomenon possibly mediated by NPR-A or NPR-B via a cGMP-dependent mechanism. In the nucleus, ANP, CNP and 8-bromo-cGMP (8-Br-cGMP), but not cANP, decrease significantly by about 30% PDGF-induced promotion into the S phase of the cell cycle. However, long-term treatment with natriuretic peptides fails to reduce PDGF-induced fibroblast proliferation. The presence of more than 95% NPR-C and less than 5% NPR-A and/or NPR-B with total basal densities around 350 fmol/mg of protein was assessed by radioligand binding experiments. Consequently, ANP and CNP at 100 nmol/L induce respectively a 7- and 5-fold increase of cGMP relative to baseline whereas cANP has no effect. A 24h exposure to PDGF decreases receptor total densities by half but increases by 2.7-fold ANP-induced cGMP production, and could account for the natriuretic peptide failure to reduce proliferation in longer term experiments when compared to 8-Br-cGMP. Moreover, all peptides fail to reduce PDGF-induced fibronectin secretion, even at a concentration of 100 nmol/L, suggesting dissociated regulation between replication and extracellular matrix protein synthesis processes. These data indicate a possible

cardioprotective role of ANP in the early onset of hypertrophy by its antireplicative effect on fibroblasts. This inhibitory action seems to be mediated by NPR-A or NPR-B through cGMP production.

---

## INTRODUCTION

Cardiac hypertrophy is an adaptation mechanism following hemodynamic overload. At the cellular level, morphological changes are the result of cardiac myocyte hypertrophy and proliferation of non-contractile cells such as fibroblasts. Earlier investigations concentrated on the adaptive response of cardiac myocytes which represent approximately 75% of the heart mass. More recently, the involvement of fibroblasts in the onset and maintenance of cardiac hypertrophy has been taken into consideration. In fact, cardiac fibroblasts, which represent two-third of the cell population of the heart, synthesize and secrete extracellular matrix proteins which create the tridimensional structure of the tissue and make interconnections between cardiac myocytes. Fibroblast growth and proliferation associated with the accumulation of fibronectin and collagen in the myocardial interstitium have been implicated in the remodeling process of left ventricular hypertrophy.<sup>1-3</sup>

Fibroblast metabolism seems to be influenced by diverse humoral factors and vasoactive peptides. Indeed, angiotensin II (Ang II) can induce hyperplasia of neonatal rat cardiac fibroblasts through the AT<sub>1</sub> receptor subtype<sup>4,5</sup>, activating protein kinase C and subsequently mobilizing intracellular Ca<sup>2+</sup>.<sup>6</sup> More recently, it has been reported that cardiac fibroblasts may play a critical role in the Ang II-mediated hypertrophic effect on cardiac myocytes.<sup>7</sup> Furthermore, *in vivo* Ang II infusions induce fibronectin as well as collagen types I and III mRNA expression in fibrotic cardiac regions.<sup>8</sup> In neonatal rat cardiac fibroblasts, Ang II-induced fibronectin mRNA expression is mediated by the AT<sub>1</sub> receptor subtype.<sup>9</sup> In adult rat cardiac fibroblasts, Ang II stimulates collagen synthesis through both AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptor subtypes

only at high concentrations that could be achieved locally within the myocardium, implicating an intracardiac renin-angiotensin system.<sup>3</sup> Other vasoactive peptides seem to be involved in collagen turnover. Endothelin-1 (ET-1) increases collagen types I and III synthesis without altering their relative proportion and reduces collagenase activity.<sup>10</sup> Other humoral agents, like platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), basic fibroblast growth factor (bFGF) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) have been shown to influence fibroblast proliferation and collagen production.<sup>11,12</sup> More recently, Simm *et al.* showed the presence of PDGF specific receptors on adult cardiac fibroblasts, coupled with activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and p70<sup>S6</sup>-kinase, both implicated in growth regulation.<sup>13</sup> Vasoactive peptides can also interact at the cellular level by producing the release of growth factors, as it has been shown for autocrine production of TGF- $\beta$  in adult rat cardiac fibroblasts<sup>14,15</sup> and for expression of bFGF in adult rat ventricular myocytes and cardiac microvascular endothelial cells.<sup>16</sup> In vascular smooth muscle cells (VSMC), Ang II and ET-1 required a competence growth factor like PDGF to exert their mitogenic effects, showing important interactions between vasoactive peptides and growth factors in modulating tissue growth.<sup>17</sup>

Secreted by the atria, atrial natriuretic peptide (ANP) is involved in the homeostasis of blood volume and consequently of blood pressure. However, its direct action on cardiac cells is not well understood. During the onset of cardiac hypertrophy, there is reexpression of the ANP and brain natriuretic peptide (BNP) genes with concomitant increase in plasma concentrations associated with ventricular cardiac myocytes.<sup>18-22</sup> The physiological effects of the natriuretic peptides (NPs) on surrounding cells, like fibroblasts, are yet to

be defined. On neonatal rat cardiac fibroblasts, ANP, BNP, C-type natriuretic peptide (CNP) and cANP were all capable of modestly inhibiting cellular proliferation induced by several agonists or mechanical stretch.<sup>23</sup> ANP and BNP also antagonize Ang II- and ET-1-mediated cell proliferation, possibly by inhibiting ET-1 gene expression.<sup>24</sup> These studies were conducted on neonatal fibroblasts, and the implication of NPs on cardiac hypertrophy in adult animals has yet to be demonstrated.

Fibronectin synthesis has been shown to precede the collagen deposition that accompanies remodeling of the interstitium in myocardial hypertrophy.<sup>25</sup> Furthermore, it has been demonstrated that the observed temporal pattern of induction of ANP synthesis during cardiac hypertrophy with the subsequent reduction in fibronectin and collagen expression may account for a paracrine effect of hypertrophic myocytes on neighboring cells.<sup>8</sup>

The aim of this study was to investigate the cellular involvement of NPs and their receptors in adult fibroblast proliferation and fibronectin secretion in the normal heart.

## MATERIALS AND METHODS

### *Culture of ventricular fibroblasts*

Primary cultures of adult ventricular fibroblasts were prepared as described previously.<sup>26</sup> Briefly, 4 week-old male Sprague-Dawley rats (Charles River, St-Constant, Quebec, Canada) were anesthetized with pentobarbital. The heart was quickly removed, and the superior third portion

(atria and blood vessels) was discarded. The ventricles were washed, minced and digested in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 0.015 mol/L HEPES, 0.2 g/dL bovine serum albumin (BSA), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 100 U/mL collagenase (CLS2, Worthington Biochemical Co., Freehold, NJ) and 0.1 mL/dL trypsin (Gibco BRL Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada). The ventricles were then digested 5 times for 15 min at 37°C with agitation in the same medium. After each digestion, the tissue was dissociated and the supernatant collected and pooled. Following centrifugation at 2,000 rpm for 3 min, the pellet was resuspended in DMEM medium, 0.2 g/dL BSA, 0.015 mol/L HEPES, 100U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, supplemented with 10 mL/dL fetal bovine serum (FBS) (Wisent, St-Bruno, Quebec, Canada). Cells were seeded and incubated for 2 h at 37°C in 10% CO<sub>2</sub>-90% air. Non-adherent cells were then removed and adherent cells (mostly fibroblasts) were grown in fresh medium with 10 mL/dL FBS. For all experiments, cells were grown for 72 h to reach subconfluence and then incubated for 24 h in serum-free medium to reach quiescence. Each treatment was then conducted according to techniques described in this study.

### *[<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation*

Quiescent subconfluent cells seeded in 48-well plates were incubated with PDGF-BB (0.05 to 0.8 nmol/L) (Calbiochem, La Jolla, CA) in the absence or presence of ANP, CNP, cANP (10<sup>-11</sup> to 10<sup>-7</sup> mol/L) (Bachem California, Torrance, CA) or the cGMP analog, 8-bromo-cGMP (8-Br-cGMP) (10<sup>-3</sup> mol/L) (Research Biochemicals International, Natick, MA) for 24 h. In the last 6 h, [methyl-<sup>3</sup>H]-thymidine (Amersham Life Science, Oakville, Ontario, Canada) was added at a final concentration of 0.037 MBq/mL.



Keeping the plates on ice, free radioactivity was then removed and the cells were washed 3 times with ice-cold 0.05 mol/L NaPO<sub>4</sub>, 0.15 mol/L NaCl (PBS) buffer, pH 7.4. Next, ice-cold 10 g/dL trichloroacetic acid (TCA) was added for 15 min to allow precipitation. The precipitate was then washed twice with 95% methanol, air-dried and solubilized for 16 h in 0.2 mol/L NaOH. After neutralization with 0.2 mol/L HCl and the addition of liquid scintillant to each sample, radioactivity was measured in a  $\beta$ -counter (LKB Wallac, Turku, Finland).

### *Flow cytometry*

Quiescent subconfluent cells seeded in 6-well plates were incubated with PDGF-BB (0.2 nmol/L) in the absence or presence of ANP, CNP, cANP ( $10^{-7}$  mol/L) or 8-Br-cGMP ( $10^{-3}$  mol/L) for 21 h. Culture media were then discarded and cells collected after a 10 min treatment with 1g/dL trypsin-EDTA at 37°C. Sedimented cells were washed twice with PBS buffer, pH 7.4 (2,000 rpm; 5 min). The supernatant was discarded and the pellet resuspended in one volume of PBS buffer, pH 7.4. Two volumes of 90% ethanol (-20°C) were then slowly added to allow cell fixation and stored at 4°C until used. For the experiment, cells were again washed twice with PBS buffer, pH 7.4, the supernatant was discarded and the pellet resuspended in Krishan buffer, pH 7.4, containing 0.1 g/L sodium citrate, 0.02  $\mu$ g/L RNase A, 0.3 mL/dL Nonidet P-40 and 0.05  $\mu$ g/L propidium iodide. Kept in the dark and on ice for 30 min, the reaction mixture was then centrifuged at 2,000 rpm for 5 min and the pellet resuspended in fresh Krishan buffer, pH 7.4. Using a 26-gauge needle, each sample was dispersed to ascertain removal of cell clusters and kept on ice until analysis. Cell cycle experiments were analysed by Coulter XL with System II software (Coulter, Miami, FL). Propidium iodide signals were

collected using a 610 Band Pass filter and doublets discrimination was done using peak signals. Cell cycle analysis was performed using Multicycle AV software (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA).

### ***Crystal violet staining***

Quiescent subconfluent cells seeded in 96-well plates were incubated with PDGF-BB (0.2 nmol/L) in the absence or presence of ANP, CNP, cANP ( $10^{-7}$  mol/L) or 8-Br-cGMP ( $10^{-3}$  mol/L) for 3 days. The medium with growth factor and peptide reagents was changed every 24 h to counterbalance degradation. Quantification of cell proliferation was measured by a modified crystal violet staining method according to Kueng *et al.*<sup>27</sup> Briefly, the medium was removed and cells were washed 3 times with PBS buffer, pH 7.4. Cells were then air-dried for 16 h at 37°C in a 10% CO<sub>2</sub>-90% air incubator. Dried cells were stained by addition of 100 µL of a 0.1 g/dL crystal violet solution dissolved in water and agitated for 20 min. Plates were washed 3 times with water to remove excess dye and air-dried. Bound dye was then solubilized by addition of 100 µL of 1.7 mol/L acetic acid to each well. The optical density of dye extracts was measured at 570 nm wavelength directly in plates using a 96-well plate spectrophotometer (BIO-TEK Instruments, model EL-310, Winooski, VT).

### ***Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of fibronectin***

Quiescent cells seeded in 48-well plates were incubated with PDGF-BB (0.2 nmol/L) in the absence or presence of ANP, CNP, cANP ( $10^{-7}$  mol/L) or 8-Br-cGMP ( $10^{-3}$  mol/L) for 48 h. The medium was then collected and quickly frozen at -70°C until used. Fibronectin was measured by ELISA according to Rennard *et al.*<sup>28</sup> Ten µL of medium (or 0.057 to 375 ng rat fibronectin) were

incubated with rabbit anti-rat fibronectin antiserum (1:500,000) (Calbiochem) for 16 h at 4°C in a final volume of 500 µL 0.02 mol/L NaPO<sub>4</sub> buffer, pH 7.4, containing 0.15 mol/L NaCl, 0.05 mL/dL Tween 20 and 3 g/dL BSA. Each sample was then incubated for 30 min in rat fibronectin-coated 96-well plates (Immulon II, VWR Scientific, Ville Mont-Royal, Quebec, Canada). After washing 5 times with an automated microplate washer (BIO-TEK Instruments, model EL-402), each well was incubated for 2 h with goat anti-rabbit IgG coupled with horseradish peroxidase (BioRad Laboratories, Richmond, CA) (1:1000). After washing, 200 µL of 2.2 mmol/L *o*-phenylenediamine in 0.1 mol/L citrate-PO<sub>4</sub> buffer, pH 5.0, and 3 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were added for a period of 30 min. The reaction was stopped by the addition of 100 µL 4 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and absorbance was read at 490 nm wavelength using a 96-well plate spectrophotometer.

### ***Preparation of ventricular fibroblast membranes***

Quiescent subconfluent cells seeded in 15-cm dishes were incubated in the absence or presence of 0.2 nmol/L PDGF-BB for 24 h. The medium was then removed and cells were rinsed 3 times with cold 0.05 mol/L NaHCO<sub>3</sub> buffer, pH 8.3, containing 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). The cells were scraped in 2 mL 0.05 mol/L NaHCO<sub>3</sub> buffer using a rubber policeman and homogenized in a Potter-Elvehjem tissue grinder. The homogenate was then centrifuged for 15 min at 18,000 rpm and the supernatant was discarded. The pellet was resuspended in 0.04 mol/L CH<sub>3</sub>COONa - 0.15 mol/L NaCl buffer, pH 5.0, and kept on ice for 10 min in order to ascertain the non-occupancy of receptors during binding studies. After centrifugation at 18,000 rpm for 15 min, the supernatant was again discarded and the pellet was resuspended in 0.05 mol/L Tris-HCl buffer, pH 7.4,

containing 1 mmol/L PMSF. The protein concentration was determined by bicinchoninic acid assay.<sup>29</sup> Membranes were frozen at -70°C and were thawed on the day of the radioligand binding assay. Previous experiments in our laboratory failed to demonstrate any differences between binding studies performed on fresh or frozen membranes.

### ***Radioligand binding assay***

Ventricular fibroblast membranes (10-20 µg) were incubated at room temperature for 90 min with rat <sup>125</sup>I-ANP (99-126) (40,000 cpm) and increasing concentrations (10<sup>-13</sup> to 10<sup>-6</sup> mol/L) of cold ANP, CNP or cANP. The final incubation volume was 0.25 mL in 0.05 mol/L Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 0.15 mol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mmol/L EGTA, 0.5 g/dL BSA, 0.1 mmol/L PMSF, 50 KIU/mL aprotinin, 0.1 g/dL bacitracin, 1 µmol/L pepstatin and 1 µmol/L leupeptin. The reaction was stopped by rapid filtration with a cell harvester (Brandel, Gaithersburg, MD) and bound radioactivity was collected on glass filters (Schleider & Schuell, Keene, NH) pre-incubated with 0.6 mL/dL polyethylenimine. After washing 3 times with 4 mL 0.05 mol/L Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 0.15 mol/L NaCl, the filters were counted in a γ counter (LKB Wallac). The results were then analyzed using the RADLIG 4.0 software program of McPherson (Biosoft, Cambridge, UK).<sup>30</sup>

### ***cGMP production***

Quiescent subconfluent cells seeded in 24-well plates were incubated in the absence or presence of 0.2 nmol/L PDGF-BB for 24 h. The medium was removed and cells were washed twice with DMEM, 0.04 mol/L HEPES and 0.5 g/dL BSA, pH 7.4. The cells were then pre-incubated at 37°C for 10 min in

that same medium supplemented with 1 mmol/L 3-isobutyl-1-methylxanthine. ANP, CNP or cANP were then added to a final concentration of  $10^{-7}$  mol/L for another 10 min. The reaction was stopped with TCA at a final concentration of 5 g/dL. Samples were sonicated, collected and centrifuged at 3,500 rpm for 15 min. The supernatant was transferred to glass tubes and TCA in the samples was extracted 3 times by treatment with water-saturated ether. The samples were then acetylated with a solution of acetic anhydride acid-triethylamine (1:2), and cGMP was measured by radioimmunoassay.<sup>31</sup>

### *Statistical analysis*

Values are represented by mean  $\pm$  SEM from 5 different ventricular fibroblast cultures. Data on DNA synthesis, cell cycle, proliferation and fibronectin synthesis experiments were analyzed using repeated measures one-way or two-way ANOVA followed by multiple comparison with the Student-Newman-Keuls method. Binding studies were analysed using Student's t-test.

## RESULTS

### *Effect of natriuretic peptides on PDGF-induced replication of adult cardiac fibroblasts*

Dose-dependent DNA synthesis of cardiac fibroblasts was observed in the presence of PDGF (0.05 to 0.8 nmol/L), and significance was reached at a concentration of 0.1 nmol/L, which produced a 3.8-fold increase of [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation as demonstrated in Figure 1A ( $p < 0.05$ ). The presence of 100 nmol/L ANP shifted the dose-response relationship downward, and statistical significance was obtained at a concentration of 0.1

nmol/L PDGF ( $p < 0.05$ ). Indeed, incubation with ANP reduced from 3.8- to 2.3-fold the PDGF-induced DNA synthesis observed with 0.1 nmol/L PDGF. The ANP inhibitory effect was dose-dependent and reached significance at a concentration of 1 nmol/L ( $p < 0.05$ ), eliciting a 15% reduction of fibroblast replication (Fig. 1B). At a concentration of 100 nmol/L, the antireplicative effect of ANP reached about 30%.

CNP produced a similar effect when compared to ANP except that significance was reached at a concentration of 0.2 nmol/L PDGF ( $p < 0.05$ ). Its presence reduced from 21- to 13-fold the PDGF-induced DNA synthesis seen with 0.2 nmol/L (data not shown). Figure 2 illustrates the action of increasing concentration of either CNP or cANP ( $10^{-11}$  to  $10^{-7}$  mol/L) on PDGF-induced fibroblast replication at a concentration of 0.2 nmol/L. The inhibitory effect observed with CNP was also dose-dependent and reached significance at a concentration of 1 nmol/L ( $p < 0.05$ ), eliciting a 10% reduction of fibroblast proliferation. No effect was seen with  $10^{-11}$  to  $10^{-7}$  mol/L cANP, implying a possible receptor-mediated mechanism involving cGMP production.

To further investigate a possible role for cGMP in the antireplicative process, we used the cGMP analog, 8-Br-cGMP, which bypasses the outer membranes and acts directly in the cell. Like ANP and CNP, the presence of 1 mmol/L 8-Br-cGMP shifted the dose-response relationship downward, and significance was obtained at a concentration of 0.05 nmol/L PDGF ( $p < 0.05$ ) as demonstrated in Figure 3. Indeed, incubation with 8-Br-cGMP reduced from 10.5- to 5.4-fold the PDGF-induced DNA synthesis seen with 0.2 nmol/L. The inhibitory effect observed with 8-Br-cGMP was greater than after

ANP or CNP, and may be accounted for by the use of a much higher cGMP concentration than NP could generate in the cell.

### *Effect of natriuretic peptides on S phase of cell cycle*

At the intracellular level, PDGF increased by 9% cardiac fibroblast population entering into the S phase of the cell cycle in which phase DNA replication occurs, as demonstrated in Figure 4 (A, B and E). Moreover, addition of ANP or CNP, but not cANP, reduced PDGF-induced S phase progression by about 30% (Fig. 4 C and E). 8-Br-cGMP could also mimic the antireplicative effect of NPs (Fig. 4 D and E). These data show the implication of NPs and cGMP production on DNA synthesis by inhibiting the entry of cardiac fibroblasts into the S phase of the cell cycle. No effect was observed on the G<sub>2</sub>/M phase of the cell cycle.

### *Natriuretic peptide receptors and cGMP production*

Membrane preparations were used to assess the binding parameters of NPs in primary cultures of cardiac fibroblasts. Radioligand competition studies in basal conditions showed similar receptor densities ( $B_{max}$ ) with ANP, CNP and cANP (Table 1). In parallel, we examined NP-stimulated cGMP production (Fig. 5). At a concentration of 100 nmol/L, ANP and CNP induced a 7- and 5-fold increase of cGMP production respectively compared to baseline ( $p < 0.05$ ) whereas no effect was noted with cANP. Displacement curves revealed that quiescent subconfluent cardiac fibroblasts show a proportion higher than 95% of clearance natriuretic peptide receptor (NPR)-C,

the rest being probably NPR-A and/or NPR-B subtypes since both ANP and CNP can induce cGMP production.

A 24h treatment with 0.2 nmol/L PDGF influenced both NPR parameters and cGMP production. Indeed, PDGF reduced receptor densities by about 50% (Table 1). In contrast, PDGF increased by 2.7-fold ANP-stimulated cGMP production ( $p < 0.05$ ) whereas no significant effect was seen for the CNP-stimulated cGMP production (Fig. 5). Thus, PDGF produced a downregulation of NPRs, mostly of the NPR-C subtype, but simultaneously increased cGMP production probably through upregulation of the NPR-A subtype.

#### ***Effect of natriuretic peptides on PDGF-induced proliferation of adult cardiac fibroblasts***

ANP and CNP demonstrated antireplicative action in the early phases of growth factor stimulus. We also investigated the effects of NPs on longer exposure of cardiac fibroblasts to PDGF. As demonstrated in Figure 6, 0.2 nmol/L PDGF treatment for three days increased the cell number by approximately 1.5-fold ( $p < 0.05$ ). However, no peptides were able to diminish the PDGF-induced increase in cell number. Only 8-Br-cGMP, at a concentration of 1mmol/L, decreased significantly to 1.3-fold the PDGF-induced proliferation ( $p < 0.05$ ). Peptide degradation could not account for this result, as the medium was changed every day to maintain fresh environment around cardiac fibroblasts. Moreover, NPs did not influence PDGF-induced fibroblast proliferation after 24 and 48h (data not shown). Similar results were obtained using colorimetric assay of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium salt (MTS)



reduction to an intensely coloured formazan by enzymes related to mitochondria<sup>32</sup>, indicating the number of viable cells (data not shown). Although PDGF decreased receptor densities but increased cGMP production, NPs failed to further decrease the cell number after acting on DNA synthesis and S phase of the cell cycle in the early stages of growth factor stimulus. Even though PDGF promoted the ANP-induced cGMP production probably via the NPR-A subtype, this intracellular cGMP generation may not be sufficient to exert an antiproliferative effect when compared to 8-Br-cGMP.

***Effect of natriuretic peptides on PDGF-induced fibronectin secretion of adult cardiac fibroblasts***

The effect of NPs on PDGF-induced fibronectin secretion is represented in Figure 7. At 0.2 nmol/L, PDGF produced a 3.2-fold increase of fibronectin secretion by cardiac fibroblasts ( $p < 0.05$ ). A protease resistant analog of angiotensin II, [Sar<sup>1</sup>]-Ang II, produced a similar effect on fibronectin secretion (data not shown). ANP and CNP, at 100 nmol/L, failed to reduce PDGF-induced fibronectin secretion. PDGF-induced fibronectin secretion was not modified by incubation with cANP, co-administration of ANP and cANP, or 8-Br-cGMP. Furthermore, NPs did not modify [Sar<sup>1</sup>]-Ang II-induced fibronectin secretion (data not shown).

---

## DISCUSSION

During the development of cardiac hypertrophy, fibroblast hyperplasia, fibronectin accumulation and the reexpression of ANP and BNP genes in ventricular myocytes are well-documented phenotypes. However, the direct

cellular role of NPs on cardiac cells is still not clearly defined. We therefore investigated the effect of NPs on the metabolism of adult ventricular cardiac fibroblasts.

In the present study, we report a dose-dependent inhibitory effect of ANP and CNP on PDGF-induced fibroblast DNA synthesis. Our results are in good agreement with the study of Cao and Gardner<sup>23</sup> on neonatal rat cardiac fibroblasts except that we did not see any effect of ANP on the basal proliferative level. This difference could be explained by the physiological response of cardiac fibroblasts to age, cellular environment and differential fetal gene expression. In neonatal fibroblasts, ANP could be an important regulator of cardiac growth and adequate development of the ventricular interstitium whereas in adult fibroblasts, reexpression of ANP, triggered by cardiac hypertrophy or rapid humoral changes, could prevent early excessive cell replication and preserve cardiac integrity. Moreover, at the nuclear level, we show that NPs partially blocked the progression in the S phase of the cell cycle observed in PDGF-induced cardiac fibroblast replication.

ANP involvement in the control of cell replication was also observed in other cell types.<sup>33-37</sup> In mesangial cells, ANP and BNP had an antiproliferative effect on PDGF-induced cell replication and were able to reduce ET-1 secretion.<sup>33</sup> This reduction of proliferation could be mediated through TGF- $\beta$  expression which exerts antigrowth activity.<sup>38</sup> At the intracellular level, ANP has been shown to induce the expression of a mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase that tightly suppresses the activity of MAPK and consequent cellular replication.<sup>39</sup> ANP also exerted antiproliferative and antimigratory actions on endothelial cells.<sup>34,40</sup> In another study using VSMC

cocultured with endothelial cells, an antiproliferative effect through the production of cGMP and complex interaction with TGF- $\beta$  was demonstrated via paracrine/autocrine regulation following secretion of CNP by endothelial cells.<sup>35</sup>

To investigate the NPR-mediated mechanism, we further characterized the presence of NPRs on adult cardiac fibroblasts. Competition studies show a proportion of more than 95 % NPR-C and less than 5 % NPR-A and/or NPR-B. Moreover, ANP and CNP, but not cANP, induce cGMP production, indicating active guanylate cyclase bound NPR-A and/or NPR-B. In our study, a cGMP analog, 8-Br-cGMP, can reproduce the antireplicative effect seen with NPs whereas cANP cannot, as demonstrated by [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation and cell cycle analysis experiments. Thus, NPs influence fibroblast replication through a cGMP-dependent pathway, after specific binding to guanylate cyclase-related receptor subtypes NPR-A and/or NPR-B. Some reports have shown a cGMP-dependent pathway for the antireplicative action of NPs. In endothelial cells, 8-bromo cGMP mimicked the antigrowth effect observed with ANP.<sup>34</sup> Sodium nitroprusside, an activator of soluble intracellular guanylate cyclase, was also able to affect cell division of mesangial cells<sup>33</sup> and regulate MAPK phosphatase-1 expression.<sup>39</sup> In VSMC, a recent study demonstrated the implication of protein kinase G (PKG) in inhibiting cell replication by decreasing activation of MAPK kinase and MAPK, probably through partial inactivation of Raf-1 by phosphorylation.<sup>41</sup> NPs could also modulate the PDGF-induced increase expression or activity of cyclins and cyclin-dependent protein kinases (Cdks) that are involved in cell cycle prior to the S phase. In VSMC, PDGF was shown to induce an increase in mRNA levels of cyclin D<sub>1</sub>, Cdk4 and Cdk2.<sup>42</sup> In density-arrested fibroblasts, PDGF

stimulated a moderate transient reduction of p27<sup>kip1</sup>, a protein capable of inhibiting Cdk2, and induced the formation of cyclin D<sub>1</sub>-Cdk4 complexes that titrate the pool of Kip1.<sup>43</sup>

Other studies have also proposed a cGMP-independent mechanism. An antigrowth effect of cANP was demonstrated on neonatal rat cardiac fibroblasts<sup>23</sup>, implying a NPR-C-dependent mechanism without induction of cGMP and/or cAMP. Initially restricted to ANP metabolism<sup>44</sup>, the NPR-C subtype was later shown to be linked to inhibition of adenylate cyclase<sup>45</sup>, phosphatidyl inositol hydrolysis<sup>46</sup> and nitric oxide production.<sup>47</sup> On VSMC, Cahill and Hassid demonstrated the antiproliferative effects of different agonists, including ANP, for the NPR-C and found that cANP could antagonize other NPR-C agonist-mediated antireplicative effects.<sup>36</sup> In our study, cANP does not promote nor does it antagonize the antireplicative effects of ANP seen in the presence of PDGF (data not shown). However, the involvement of the NPR-C has not yet been assessed using agonists other than cANP that are incapable of promoting cGMP production. Cahill and Hassid<sup>36</sup> also showed an additive antimitogenic effect of a NPR-C agonist and of 8-Br-cGMP. A cGMP-dependent mechanism cannot therefore be ruled out. Moreover, the reported effects of different NPR-C agonists other than cANP were not observed on cultured mesangial and endothelial cells but seemed restricted to VSMC.<sup>36</sup>

---

We examined the antiproliferative effects of NPs on continual and longer exposure of cardiac fibroblasts to a growth factor stimulus. All NPs, including cANP, fail to reduce the cardiac fibroblast increase in cell number elicited by the presence of PDGF for 24, 48 and 72 h. Only a high

concentration of 8-Br-cGMP show an antiproliferative action, decreasing by 9% the PDGF-induced mitogenic effect after 3 days. In fact, a 24h-exposure to PDGF reduces receptor densities by half, mostly of the NPR-C subtypes. This reduction in receptor densities is accompanied by an elevation of ANP-stimulated cGMP production that seems to be insufficient to promote further inhibition of cardiac fibroblast hyperplasia in the *in vitro* conditions studied. Nevertheless, the elevation of cGMP production and thus, of NPR-A sensitivity, could be an important *in vivo* factor for limiting cardiac fibroblast proliferation in the early onset of cardiac hypertrophy. Indeed, the increase in steady state level of BNP mRNA was as rapid as induction of the immediate early gene *c-fos* expression, followed by increase and accumulation of ANP mRNA after hypertrophic stimuli administered to neonatal cardiomyocytes.<sup>22</sup> BNP and ANP were previously shown to have high affinity binding to the NPR-A subtype<sup>48</sup>, implying a possible mechanism of growth stimulus-regulated cGMP production to limit early fibroblast hyperplasia.

We examined the action of NPs on fibronectin secretion by fibroblasts. Crawford *et al.*<sup>8</sup> have previously shown the temporal relationship between ANP reexpression in ventricles and subsequent reduction of fibronectin expression during cardiac hypertrophy. In our study, we measured directly by ELISA fibronectin secreted in culture medium. PDGF increases fibronectin secretion by 3.2-fold as compared to basal value. NPs do not influence either PDGF-induced, [Sar<sup>1</sup>]-Ang II-induced or basal fibronectin secretion (data not shown). No effect is observed after incubation with cANP or 8-Br-cGMP. ANP may thus reduce fibroblast replication but does not alter fibronectin expression. In fact, these two cellular events, replication and fibronectin expression, seem to be dissociated. A recent study showed that Ang II had a

proliferative effect on fetal cardiac fibroblasts without any influence on collagen production.<sup>11</sup> In our study on adult cardiac fibroblasts, [Sar<sup>1</sup>]-Ang II increases fibronectin secretion without influencing cell replication (data not shown). Therefore, cell proliferation mechanisms and extracellular matrix protein secretion may not be regulated by the same intracellular signalling pathway and may not be directly related. Moreover, the proliferative and extracellular matrix protein secretion responses to a certain stimulus, like Ang II, seem to be age-regulated with differences noted between fetal, neonatal and adult cardiac fibroblasts.<sup>3,5,11</sup>

NPs may play an important role in the control of proliferation within different cell lineages. Their antigrowth properties could contribute to prevent the pathological growth associated with tissue hypertrophy. Indeed, transfection of coculture of vascular endothelial and smooth muscle cells with ANP expression vector in both cell types resulted in growth inhibition of VSMC. This shows the usefulness of *in vivo* ANP gene therapy to treat vascular diseases.<sup>49</sup>

In summary, NPs, with the exception of cANP, partially inhibit PDGF-induced replication of adult cardiac fibroblasts in the early stages of proliferation. The mechanism underlying this antiproliferative effect seems to be routed through a cGMP-dependent pathway. However, all NPs fail to reduce PDGF-induced proliferative effect in longer duration of stimulus, probably a consequence of insufficient cGMP production to promote further antimitogenic action beyond the S phase of the cell cycle. Moreover, NPs, including cANP, do not influence fibronectin secretion in cardiac fibroblasts.

More investigations need to be undertaken to better understand the role of the NP system in the pathophysiology of cardiac hypertrophy.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by a grant to Dr. Gaétan Thibault from the Medical Research Council of Canada (MRC) and a grant from the Fondation des maladies du coeur du Québec. Alexandre Lacasse is a recipient of a graduate scholarship from the Fondation Georges Phénix. The authors would like to thank Chantal Arguin for her excellent technical assistance, Nathalie Tessier for her needfull assistance with flow cytometry studies, and Viviane Jodoin for her secretarial work.

## REFERENCES

1. Mamuya WS, Brecher P: Fibronectin expression in the normal and hypertrophic rat heart. *J Clin Invest* 1992;89:392-401
2. Farhadian F, Contard F, Corbier A, Barrieux A, Rappaport L, Samuel JL: Fibronectin expression during physiological and pathological cardiac growth. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:981-990
3. Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT: Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* 1994;26:809-820
4. Sadoshima J, Izumo S: Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* 1993;73:413-423
5. Schorb W, Booz GW, Dostal DE, Conrad KM, Chang KC, Baker KM: Angiotensin II is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts. *Circ Res* 1993;72:1245-1254
6. Booz GW, Dostal DE, Singer HA, Baker KM: Involvement of protein kinase C and Ca<sup>2+</sup> in angiotensin II- induced mitogenesis of cardiac fibroblasts. *Am J Physiol* 1994;267:C1308-C1318
7. Kim NN, Villarreal FJ, Morton PP, Lee AA, Dillmann WH: Trophic effects of angiotensin II on neonatal rat cardiac myocytes are mediated by cardiac fibroblasts. *Am J Physiol* 1995;269:E426-E437
8. Crawford DC, Chobanian AV, Brecher P: Angiotensin II induces fibronectin expression associated with cardiac fibrosis in the rat. *Circ Res* 1994;74:727-739
9. Iwami K, Ashizawa N, Do YS, Graf K, Hsueh WA: Comparison of ANG II with other growth factors on *Egr-1* and matrix gene expression in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol* 1996;270:H2100-H2107
10. Guarda E, Katwa LC, Myers PR, Tyagi SC, Weber KT: Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1993;27:2130-2134



## REFERENCES

1. Mamuya WS, Brecher P: Fibronectin expression in the normal and hypertrophic rat heart. *J Clin Invest* 1992;89:392-401
2. Farhadian F, Contard F, Corbier A, Barrieux A, Rappaport L, Samuel JL: Fibronectin expression during physiological and pathological cardiac growth. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:981-990
3. Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT: Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* 1994;26:809-820
4. Sadoshima J, Izumo S: Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* 1993;73:413-423
5. Schorb W, Booz GW, Dostal DE, Conrad KM, Chang KC, Baker KM: Angiotensin II is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts. *Circ Res* 1993;72:1245-1254
6. Booz GW, Dostal DE, Singer HA, Baker KM: Involvement of protein kinase C and Ca<sup>2+</sup> in angiotensin II- induced mitogenesis of cardiac fibroblasts. *Am J Physiol* 1994;267:C1308-C1318
7. Kim NN, Villarreal FJ, Morton PP, Lee AA, Dillmann WH: Trophic effects of angiotensin II on neonatal rat cardiac myocytes are mediated by cardiac fibroblasts. *Am J Physiol* 1995;269:E426-E437
8. Crawford DC, Chobanian AV, Brecher P: Angiotensin II induces fibronectin expression associated with cardiac fibrosis in the rat. *Circ Res* 1994;74:727-739
9. Iwami K, Ashizawa N, Do YS, Graf K, Hsueh WA: Comparison of ANG II with other growth factors on *Egr-1* and matrix gene expression in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol* 1996;270:H2100-H2107
10. Guarda E, Katwa LC, Myers PR, Tyagi SC, Weber KT: Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1993;27:2130-2134

11. Butt RP, Laurent GJ, Bishop JE: Mechanical load and polypeptide growth factors stimulate cardiac fibroblast activity. *Ann N Y Acad Sci* 1995;752:387-393
12. Sigel AV, Centrella M, Eghbali-Webb M: Regulation of proliferative response of cardiac fibroblasts by transforming growth factor- $\beta_1$ . *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:1921-1929
13. Simm A, Nestler M, Hoppe V: PDGF-AA, a potent mitogen for cardiac fibroblasts from adult rats. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:357-368
14. Lee AA, Dillmann WH, McCulloch AD, Villarreal FJ: Angiotensin II stimulates the autocrine production of transforming growth factor- $\beta_1$  in adult rat cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:2347-2357
15. Sharma HS, Van Heugten HA, Goedbloed MA, Verdouw PD, Lamers JM: Angiotensin II induced expression of transcription factors precedes increase in transforming growth factor-beta 1 mRNA in neonatal cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205:105-112
16. Fischer TA, Ungureanu-Longrois D, Singh K, De Zengotita J, de Ugarte A, Alali A, Gadbut AP, Lee M-A, Balligand J-L, Kifor I, Smith TW, Kelly RA: Regulation of bFGF expression and ANG II secretion in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. *Am J Physiol* 1997;272:H958-H968
17. Jahan H, Koboyashi S, Nishimura J, Kanaide H: Endothelin-1 and angiotensin II act as progression but not competence growth factors in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1996;295:261-269
18. Fareh J, Touyz RM, Thibault G, Schiffrin EL: Basal and angiotensin II-induced cytosolic free calcium in adult rat cardiomyocytes and fibroblasts after volume overload. *Hypertension* 1995;26:1149-1153
19. Ogawa T, Linz W, Stevenson M, Bruneau BG, Kuroski de Bold ML, Chen JH, Eid H, Schölkens BA, de Bold AJ: Evidence for load-dependent and load-independent determinants of cardiac natriuretic peptide production. *Circulation* 1997;93:2059-2067
20. Younes A, Boluyt MO, O'Neill L, Meredith AL, Crow MT, Lakatta EG: Age-associated increase in rat ventricular ANP gene expression correlates with cardiac hypertrophy. *Am J Physiol* 1995;269:H1003-H1008

21. Calderone A, Takahashi N, Izzo NJJ, Thaik CM, Colucci WS: Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation* 1995;92:2385-2390
22. Nakagawa O, Ogawa Y, Itoh H, Suga SI, Komatsu Y, Kishimoto I, Nishino K, Yoshimasa T, Nakao K: Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of brain natriuretic peptide in cardiocyte hypertrophy: evidence for brain natriuretic peptide as an "emergency" cardiac hormone against ventricular overload. *J Clin Invest* 1995;96:1280-1287
23. Cao L, Gardner DG: Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. *Hypertension* 1995;25:227-234
24. Fujisaki H, Ito H, Hirata Y, Tanaka M, Hata M, Lin M, Adachi S, Akimoto H, Marumo F, Hiroe M: Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression. *J Clin Invest* 1995;96:1059-1065
25. Villarreal FJ, Dillmann WH: Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF- $\beta_1$ , fibronectin, and collagen. *Am J Physiol* 1992;262:H1861-H1866
26. Fareh J, Touyz RM, Schiffrin EL, Thibault G: Endothelin-1 and angiotensin II receptors in cells from rat hypertrophied heart. Receptor regulation and intracellular Ca<sup>2+</sup> modulation. *Circ Res* 1996;78:302-311
27. Kueng W, Silber E, Eppenberger U: Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem* 1989;182:16-19
28. Rennard SI, Berg R, Martin GR, Foidart JM, Gheon Robey P: Enzyme-linked immunoassay (ELISA) for connective tissue components. *Anal Biochem* 1980;104:205-214
29. Smith PK, Krohn RJ, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76-85
30. McPherson GA: Analysis of radioligand binding experiments: a collection of computer programs for the IBM PC. *J Pharmacol Methods* 1985;14:213-228

31. Thibault G, Lacasse A, Garcia R: Specific potentiation by cyclic AMP of natriuretic peptide-mediated cyclic GMP production in adipose tissues. *Life Sci* 1996;58:2345-2353
32. Goodwin CJ, Holt SJ, Downes S, Marshall NJ: Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *Circ Res* 1995;79:757-764
33. Kohno M, Ikeda M, Johchi M, Horio T, Yasunari K, Kurihara N, Takeda T: Interaction of PDGF and natriuretic peptides on mesangial cell proliferation and endothelin secretion. *Am J Physiol* 1993;265:E673-E679
34. Itoh H, Pratt RE, Ohno M, Dzau VJ: Atrial natriuretic polypeptide as a novel antigrowth factor of endothelial cells. *Hypertension* 1992;19:758-761
35. Komatsu Y, Itoh H, Suga S-I, Ogawa Y, Hama N, Kishimoto I, Nakagawa O, Igaki T, Doi K, Yoshimasa KN, Nakao K: Regulation of endothelial production of C-type natriuretic peptide in coculture with vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1996;78:606-614
36. Cahill PA, Hassid A: ANF-C-receptor-mediated inhibition of aortic smooth muscle cell proliferation and thymidine kinase activity. *Am J Physiol* 1994;266:R194-R203
37. Vollmar AM, Schmidt K-N, Schulz R: Natriuretic peptide receptors on rat thymocytes: inhibition of proliferation by atrial natriuretic peptide. *Endocrinology* 1996;137:1706-1713
38. Wolf G, Ziyadeh FN, Stahl RAK: Atrial natriuretic peptide stimulates the expression of transforming growth factor- $\beta$  in cultured murine mesangial cells: relationship to suppression of proliferation. *J Am Soc Nephrol* 1995;6:224-233
39. Sugimoto T, Haneda M, Togawa M, Isono M, Shikano T, Araki S-I, Nakagawa T, Kashiwagi A, Guan K-L, Kikkawa R: Atrial natriuretic peptide induces the expression of MKP-1, a mitogen-activated protein kinase phosphatase, in glomerular mesangial cells. *J Biol Chem* 1996;271:544-547
40. Ikeda M, Kohno M, Takeda T: Inhibition by cardiac natriuretic peptides of rat vascular endothelial cell migration. *Hypertension* 1995;26:401-405

41. Yu S-M, Hung L-M, Lin C-C: cGMP elevating agents suppress proliferation of vascular smooth muscle cells by inhibiting the activation of epidermal growth factor signaling pathway. *Circulation* 1997;95:1269-1277
42. Koyama H, Nishizawa Y, Hosoi M, Fukumoto S, Kogawa K, Shioi A, Morii H: The fumagillin analogue TNP-470 inhibits DNA synthesis of vascular smooth muscle cells stimulated by platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-I. Possible involvement of cyclin-dependent kinase 2. *Circ Res* 1996;79:757-764
43. Winston J, Dong F, Pledger WJ: Differential modulation of G<sub>1</sub> cyclins and the Cdk inhibitor p27<sup>kip1</sup> by platelet-derived growth factor and plasma factors in density-arrested fibroblasts. *J Biol Chem* 1996;271:11253-11260
44. Nussenzweig DR, Lewicki JA, Maack T: Cellular mechanisms of the clearance function of type-C receptors of atrial natriuretic factor. *J Biol Chem* 1990;265:20952-20958
45. Anand-Srivastava MB, Trachte GJ: Atrial natriuretic factor receptors and signal transduction mechanisms. *Pharmacol Rev* 1993;45:455-497
46. Hirata M, Chang CH, Murad F: Stimulatory effects of atrial natriuretic factor on phosphoinositide hydrolysis in cultured bovine aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;1010:346-351
47. McLay JS, Chatterjee PK, Jardine AG, Hawksworth GM: Atrial natriuretic factor stimulates nitric oxide production: an ANF-C receptor-mediated effect. *J Hypertens* 1995;13:625-630
48. Thibault G, Grove K, Deschepper CF: Reduced affinity of iodinated forms of Tyr<sup>0</sup>CNP for rat natriuretic peptide receptor B. *Mol Pharmacol* 1995;48:1046-1053
49. Morishita R, Gibbons GH, Pratt RE, Tomita N, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ: Autocrine and paracrine effects of atrial natriuretic peptide gene transfer on vascular smooth muscle and endothelial cellular growth. *J Clin Invest* 1994;94:824-829

## FIGURE LEGENDS

Figure 1: Panel A: PDGF-induced DNA synthesis of adult ventricular fibroblasts in the absence (closed circles) and presence of 100 nmol/L ANP (open circles). Panel B: Dose-response inhibitory effect of ANP on PDGF-induced fibroblast DNA synthesis. Increasing ANP concentrations were coincubated in the presence of 0.2 nmol/L PDGF. Cellular DNA replication was quantified by [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation (dpm/well). Values are expressed as mean ± SEM from 5 different cardiac fibroblast cultures. Panel A: \*: p < 0.05 vs baseline; #: p < 0.05 vs ANP. Panel B: \*: p < 0.05 vs baseline; #: p < 0.05 vs PDGF alone.

Figure 2: Dose-response inhibitory effect of CNP and cANP on PDGF-induced fibroblast DNA synthesis. Increasing CNP (Panel A) and cANP (Panel B) concentrations were coincubated in the presence of 0.2 nmol/L PDGF. Values are expressed as mean ± SEM from 5 different cardiac fibroblast cultures. \*: p < 0.05 vs baseline; #: p < 0.05 vs PDGF alone.

Figure 3: PDGF-induced DNA synthesis of adult cardiac ventricular fibroblasts in the absence (closed circles) and presence of 1 mmol/L 8-Br-cGMP (open triangles). Values are expressed as mean ± SEM from 5 different cardiac fibroblast cultures. \*: p < 0.05 vs baseline; #: p < 0.05 vs 8-Br-cGMP.

Figure 4: Effect of natriuretic peptides on PDGF-induced progression into the cell cycle of adult ventricular fibroblasts. Representative experiments of cardiac fibroblasts incubated with (A) Basal medium, (B) 0.2 nmol/L PDGF and (C) 10<sup>-7</sup> mol/L ANP or (D) 10<sup>-3</sup> mol/L 8-Br-cGMP in the presence of 0.2

nmol/L PDGF. (E) Graphic representation showing the effect of  $10^{-7}$  mol/L ANP,  $10^{-7}$  mol/L CNP,  $10^{-7}$  mol/L cANP and  $10^{-3}$  mol/L 8-Br-cGMP on PDGF-induced progression in the S phase of the cell cycle. Cell cycle data were determined by Coulter XL. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM from 5 different cardiac fibroblast cultures. \*:  $p < 0.05$  vs baseline; #:  $p < 0.05$  vs PDGF alone.

Figure 5: Effect of PDGF on ANP-, CNP-, and cANP-induced cGMP production by adult ventricular fibroblasts. After a 24h treatment with 0.2 nmol/L PDGF (closed bars),  $10^{-7}$  mol/L ANP-, CNP-, and cANP-induced change in cGMP production was measured by radioimmunoassay. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM from 5 different cardiac fibroblast cultures. \*:  $p < 0.05$  vs baseline; #:  $p < 0.05$  vs basal NP-induced cGMP production.

Figure 6: Long term effect of natriuretic peptides on PDGF-induced proliferation of adult ventricular fibroblasts.  $10^{-7}$  mol/L ANP,  $10^{-7}$  mol/L CNP,  $10^{-7}$  mol/L cANP and  $10^{-3}$  mol/L 8-Br-cGMP were coincubated in the presence of 0.2 nmol/L PDGF. After 3 days, cell proliferation was quantified by crystal violet staining. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM from 5 different cardiac fibroblast cultures. \*:  $p < 0.05$  vs baseline; #:  $p < 0.05$  vs PDGF alone.

Figure 7: Effect of natriuretic peptides on PDGF-induced fibronectin secretion by adult ventricular fibroblasts.  $10^{-7}$  mol/L ANP,  $10^{-7}$  mol/L CNP,  $10^{-7}$  mol/L cANP,  $10^{-3}$  mol/L 8-Br-cGMP and  $10^{-7}$  mol/L ANP with  $10^{-7}$  mol/L cANP were coincubated in the presence of 0.2 nmol/L PDGF. Fibronectin secretion was measured by ELISA. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM from 5 different cardiac fibroblast cultures. \*:  $p < 0.05$  vs baseline.

Table 1. Effect of a 24h PDGF treatment on natriuretic peptide receptor binding parameters of adult ventricular fibroblasts

Treatment	$B_{max}$ (fmol/mg protein)	$K_d$ (pmol/L)
<b>Control</b>		
ANP	380 ± 20	50 ± 20
CNP	370 ± 40	520 ± 150
cANP	380 ± 40	830 ± 210
<b>PDGF</b>		
ANP	220 ± 20*	30 ± 20
CNP	170 ± 10†	120 ± 90
cANP	160 ± 20‡	120 ± 60‡

$K_d$  and  $B_{max}$  were determined from competition studies on membrane preparations. \*:  $p < 0.05$  vs control ANP; † :  $p < 0.05$  vs control CNP; ‡ :  $p < 0.05$  vs control cANP.



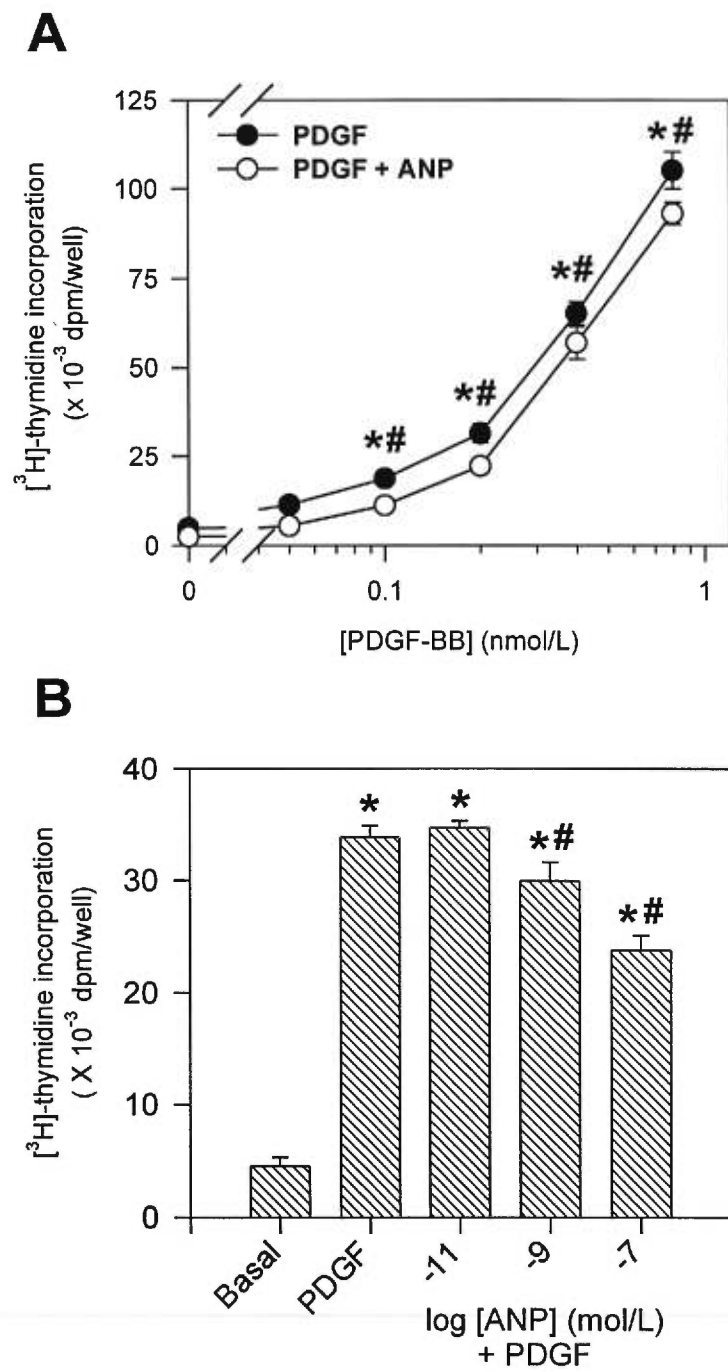


Fig. 1

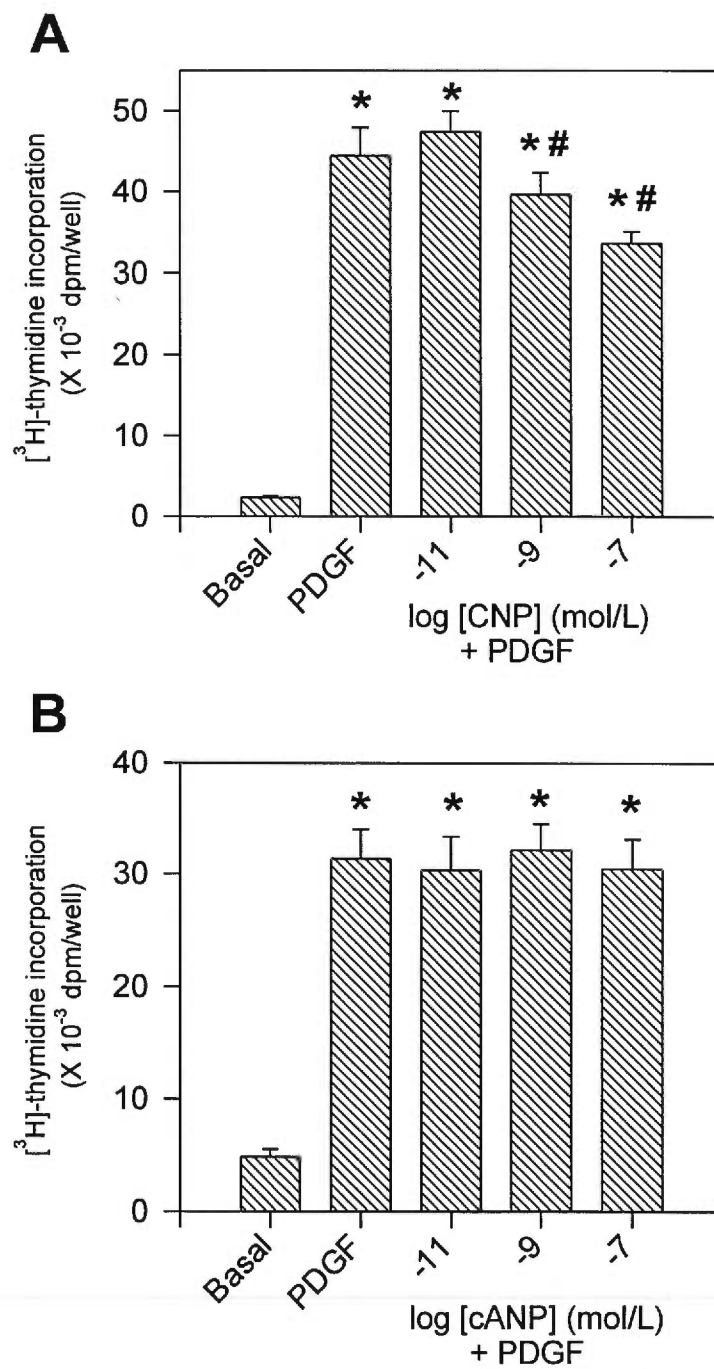


Fig. 2

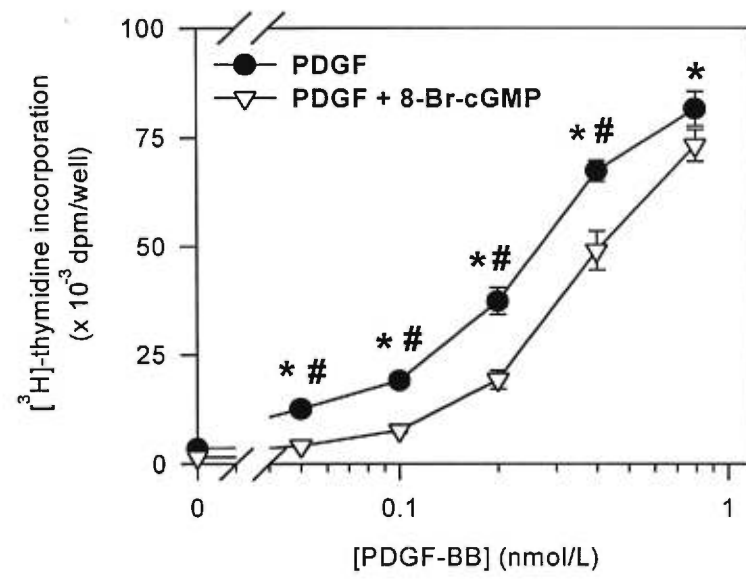


Fig. 3

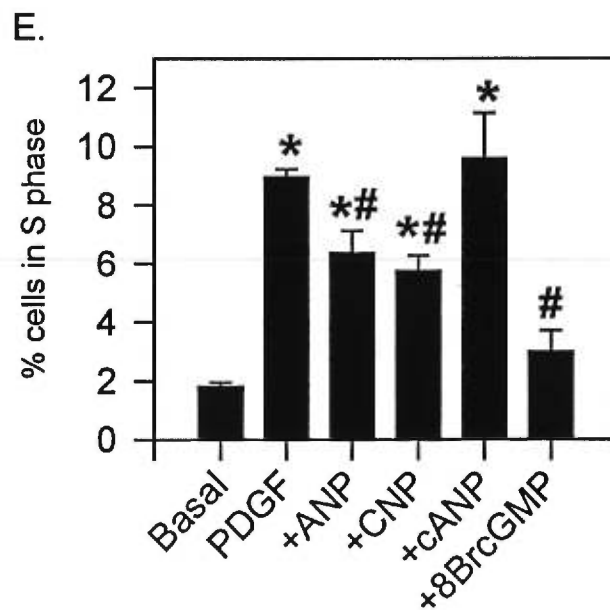
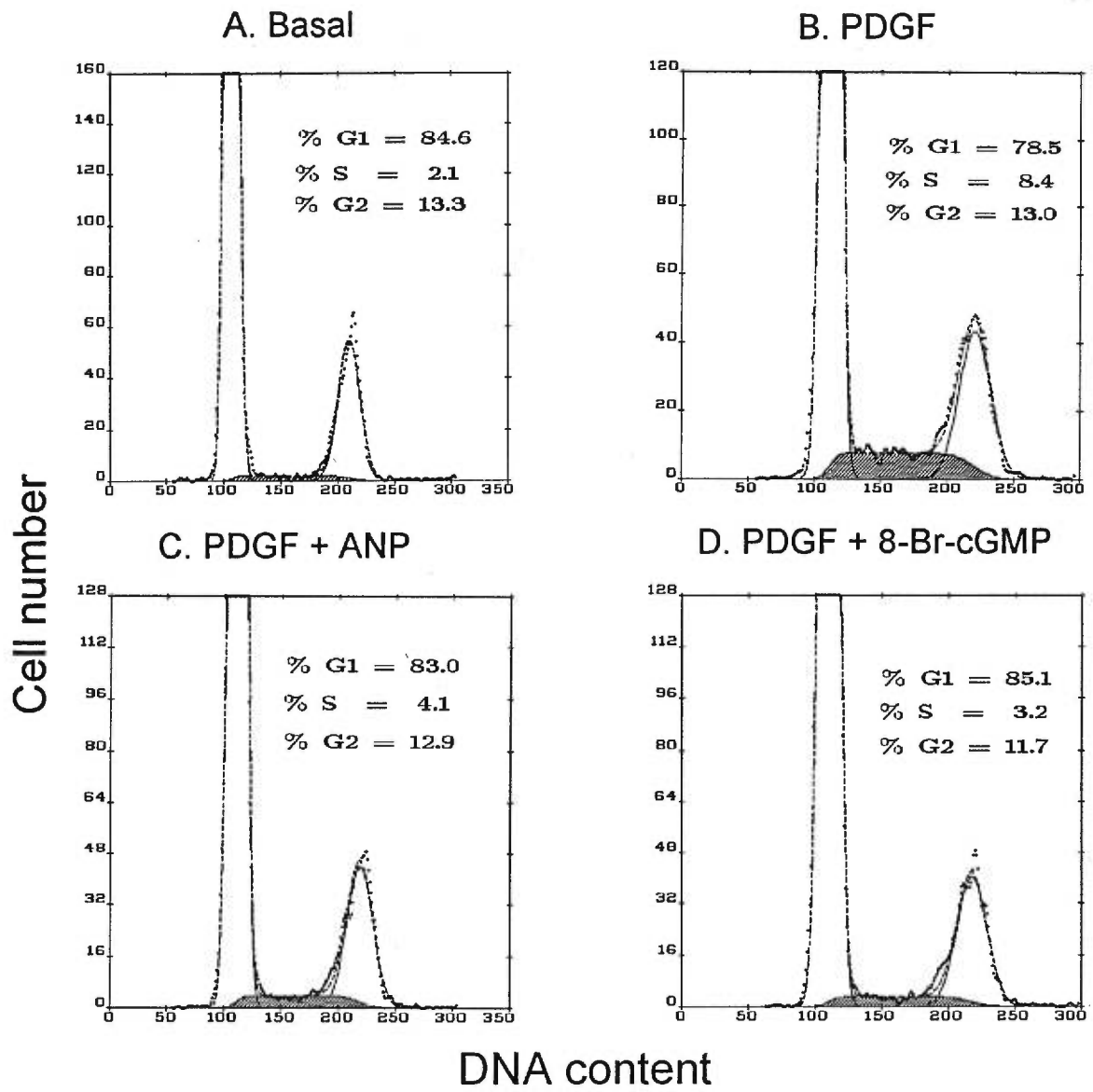


Fig. 4

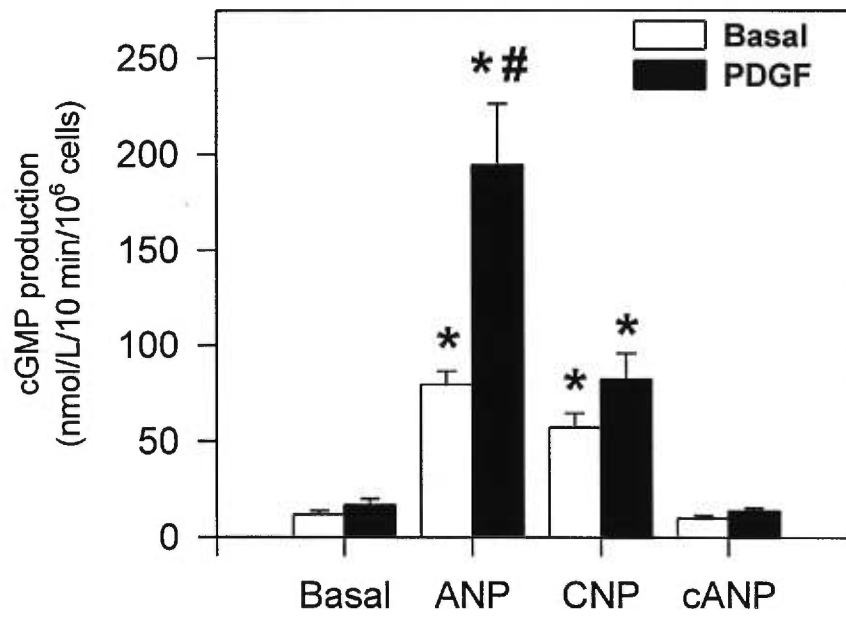


Fig. 5

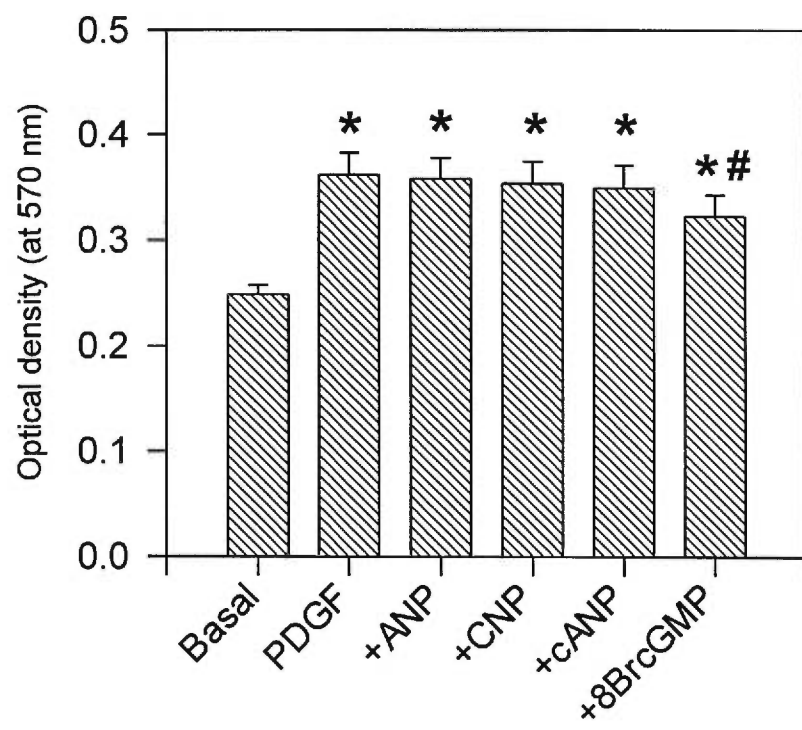


Fig. 6

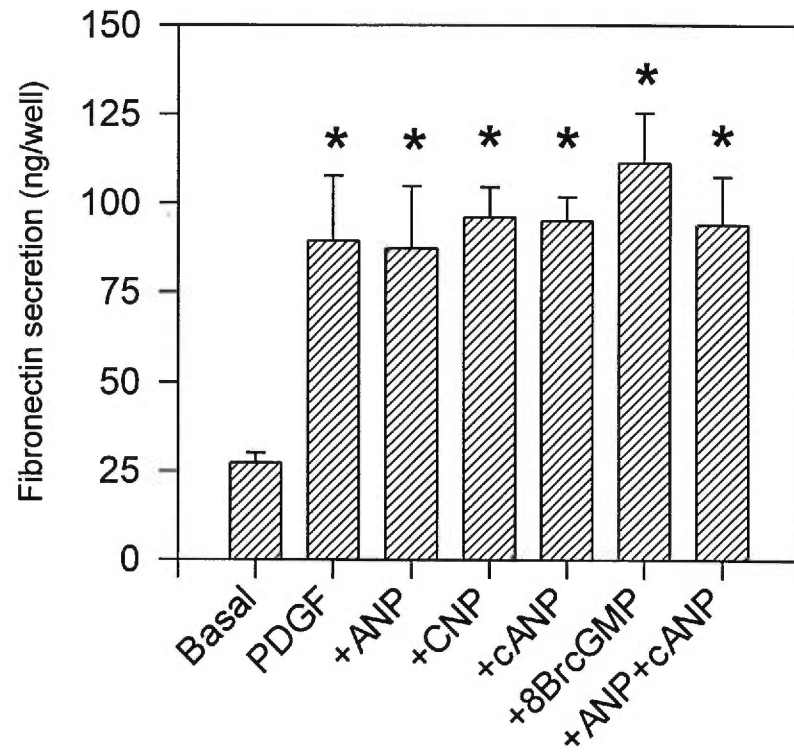


Fig. 7

### Chapitre 3: Discussion

Les peptides natriurétiques participent à l'homéostasie du système cardiovasculaire par ses actions vasodilatatrice, diurétique et natriurétique (Cantin et Genest, 1985; Laragh, 1985). Le premier peptide caractérisé de cette famille, l'ANP, possède des propriétés physiologiques importantes qui antagonisent les effets presseurs du système rénine-angiotensine et de la vasopressine (Meyer-Lehnet *et al.*, 1988; Nonoguchi *et al.*, 1988; Henrich *et al.*, 1987; Barrio *et al.*, 1987; Casto *et al.*, 1987; Naruse *et al.*, 1987). Sécrété au niveau auriculaire cardiaque, l'ANP manifeste ses effets au niveau de différents organes dont le rein, les glandes surrénales, le cerveau et la vasculature (Espiner, 1994; Mizelle *et al.*, 1992; Parkes *et al.*, 1988; Needleman et Greenwold, 1986; Huang *et al.*, 1985; Racz *et al.*, 1985; Goodfriend *et al.*, 1984). Par contre, ses actions directes et locales au niveau des cellules cardiaques comme les cardiomyocytes et les fibroblastes demeurent pour le moins obscures (Clemo *et al.*, 1996; Neyes et Vetter, 1989). De plus, dans diverses pathologies cardiovasculaires, comme l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaques, plusieurs études montrent une augmentation importante de l'ANP dans le plasma (Espiner, 1994). Dans plusieurs modèles expérimentaux, l'induction d'une hypertrophie par surcharge de volume ou de pression amène une augmentation importante dans la synthèse et la sécrétion d'ANP au niveau des ventricules qui subissent une tension transmurale constante (Ogawa *et al.*, 1996; Calderone *et al.*, 1995; Fareh *et al.*, 1995; Younes *et al.*, 1995). Bien que les effets systémiques de l'ANP soient bien démontrés, l'effet de cette soudaine production d'ANP sur le métabolisme des cellules cardiaques avoisinantes n'est pas bien connu. Des études plus récentes ont démontré la présence de récepteurs de l'ANP au niveau des



cardiomyocytes et des fibroblastes, suggérant un rôle important des peptides natriurétiques dans l'adaptation du coeur en situation de stress hémodynamique (Cao et Gardner, 1995; Lin *et al.*, 1995; Bastagli *et al.*, 1990; Neyes et Vetter, 1989).

Au niveau cardiaque, l'hypertrophie compensatoire s'accompagne d'une augmentation de synthèse et de sécrétion de différentes composantes de la matrice extracellulaire dont les collagènes de types I et III, la fibronectine, la laminine et certains hétérodimères d'intégrines (Borg *et al.*, 1996; Haisong et Dixon, 1996; Boluyt *et al.*, 1994; Brilla *et al.*, 1993; Lipke *et al.*, 1993; Shaper *et al.*, 1992; Villareal et Dillmann, 1992). Bien que les myocytes cardiaques comptent pour 75% de la masse cardiaque, les fibroblastes représentent les deux tiers de la population cellulaire et plus récemment, leur implication dans l'induction et la phase stable de l'hypertrophie cardiaque a attiré l'attention de plusieurs études. En fait, situés dans l'espace interstitiel cardiaque, les fibroblastes sont responsables de la synthèse et de la sécrétion des protéines de la matrice extracellulaire, lesquelles participent activement à la maintenance de la morphologie cardiaque en agissant comme support tissulaire en plus de favoriser un alignement souhaitable des cardiomyocytes pour optimiser le travail mécanique du coeur à chaque battement (Borg *et al.*, 1996). Dans les processus de remodelage ventriculaire, l'hyperplasie des fibroblastes et l'accumulation de protéines de la matrice extracellulaire contribuent à l'apparition de fibrose cardiaque, en réponse à l'élévation de pression et de volume de remplissage (Conrad *et al.*, 1995; Weber *et al.*, 1995). De plus, le métabolisme des fibroblastes semble être influencé par plusieurs facteurs humoraux vasoactifs dont l'Ang II et l'ET-1 (Iwami *et al.*, 1996; Lembo *et al.*, 1995; Sadoshima *et al.*, 1995; Burgess *et al.*, 1994; Crawford *et al.*, 1994;

Guarda *et al.*, 1994; Ito *et al.*, 1994; Schorb *et al.*, 1993; Tan *et al.*, 1991) et d'autres facteurs de croissance comme le TGF- $\beta$ , le bFGF l'IGF-1 et le PDGF (Fisher *et al.*, 1997; Simm *et al.*, 1997; Sigel *et al.*, 1996; Bastagli *et al.*, 1995; Butt *et al.*, 1995; Kardami *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995; Lembo *et al.*, 1995; Donohue *et al.*, 1994; Hsu *et al.*, 1994). Ces différents agents semblent participer aux processus de remodelage ventriculaire en induisant une prolifération accrue des fibroblastes en plus de provoquer la relâche de collagène et de fibronectine. Plusieurs évidences expérimentales tendent à montrer leur synthèse locale au niveau des cellules cardiaques soumises à des tensions pariétales importantes, suggérant donc l'établissement d'un système paracrine/autocrine qui contrôle la morphologie cardiaque et affecte par la suite la fonction mécanique du coeur (Fisher *et al.*, 1997; Bastagli *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995; Dostal et Baker, 1993; Koibochi *et al.*, 1993; Sadoshima *et al.*, 1993; Villareal et Dillmann, 1992). Produit par les cellules vasculaires des artères coronaires intacts, le PDGF pourrait agir localement au niveau cardiaque et influencer le métabolisme des fibroblastes (Holt *et al.*, 1994). De plus, le PDGF présente l'activité mitotique la plus puissante en conditions *in vitro* parmi les différents facteurs de croissance (Butt *et al.*, 1995). Par contre, plusieurs de ces études ont été réalisées à l'aide de cellules cardiaques provenant de rats nouveaux-nés et une relation possible entre les effets qu'engendrent ces facteurs et l'apparition d'une hypertrophie cardiaque pathologique chez l'adulte n'est pas nécessairement établie. Des études montrant une relation temporelle dans l'expression d'ANP et la baisse conséquente de synthèse de fibronectine (Crawford *et al.*, 1994) en plus de l'implication du peptide dans la prolifération des fibroblastes néo-nataux (Cao et Gardner, 1995; Fujisaki *et al.*, 1995) nous ont amené à investiguer le rôle

direct de l'ANP sur le métabolisme des fibroblastes cardiaques de rats adultes normaux.

Dans notre étude, nous démontrons l'effet inhibiteur de l'ANP et du CNP dans la réplication des fibroblastes ventriculaires adultes induite par le PDGF. De plus, cet effet inhibiteur est augmenté en réponse à l'élévation de la dose de peptide natriurétique utilisée. Ces résultats sont similaires à ceux de l'étude de Cao et Gardner au niveau des fibroblastes de rats nouveaux-nés sauf que nous n'observons pas un effet de l'ANP sur le niveau basal de prolifération (Cao et Gardner, 1995). Cette différence peut s'expliquer au niveau des rôles physiologiques remplis par les fibroblastes selon l'âge, l'environnement cellulaire et par la baisse du niveau d'expression de certains gènes après la naissance. Chez le nouveau-né, l'ANP peut servir de régulateur important dans la croissance cardiaque et le développement morphologique précis des ventricules. Chez l'adulte, la réexpression d'ANP en situation d'hypertrophie cardiaque, associée à des changements humoraux rapides, peut prévenir la réplication excessive des fibroblastes et maintenir ainsi l'intégrité structurale du coeur. Au niveau du cycle cellulaire, l'ANP et le CNP bloquent de 30% la progression engendrée par le PDGF vers la phase S, où se produit la synthèse d'ADN dans le noyau des fibroblastes en division.

L'ANP possède aussi des actions limitant la prolifération d'autres types cellulaires. Sur les cellules mésangiales du rein, l'ANP et le BNP ont démontré des propriétés anti-prolifératives en réduisant la synthèse d'ADN induite par le PDGF tout en agissant sur la sécrétion d'ET-1 (Kohno *et al.*, 1995). De plus, l'ANP induit l'expression de TGF- $\beta$  qui est capable à son tour de supprimer la prolifération des cellules mésangiales (Wolf *et al.*, 1995). À l'intérieur de la

cellule, l'ANP agit en induisant l'expression d'une MAPK phosphatase, ce qui diminue l'activité de la MAPK et la réplication cellulaire qui suit (Sugimoto *et al.*, 1996). Dans des co-cultures de cellules endothéliales et de cellules vasculaires musculaires lisses, des effets anti-mitogéniques liés à la production de GMPc suivie d'interactions complexes avec le TGF- $\beta$  ont été observés après la sécrétion de CNP par les cellules endothéliales via un mécanisme paracrine/autocrine (Komatsu *et al.*, 1996). L'ANP a aussi démontré des actions limitant la croissance des cellules endothéliales et des thymocytes (Vollmar *et al.*, 1996; Itoh *et al.*, 1992).

Nous avons ensuite caractérisé les récepteurs aux peptides natriurétiques sur les fibroblastes cardiaques. Des études de compétition, utilisant le  $^{125}\text{I}$ -ANP comme traceur radioactif et les agonistes froids ANP, CNP, et c-ANP, montrent une proportion de 95% de récepteurs NPR-C, le reste étant le NPR-A et/ou NPR-B. En effet, l'agoniste spécifique pour le NPR-C, le c-ANP, est capable de déplacer entièrement la liaison de l'ANP aux récepteurs de façon similaire à l'ANP et au CNP. Par contre, des études mesurant la production de GMPc révèlent la présence de récepteurs couplés à la guanylyl cyclase puisque l'ANP et le CNP provoquent une augmentation en GMPc d'un facteur 7 et 5 respectivement.

Dans nos études de prolifération cellulaire au niveau de la synthèse d'ADN et du cycle cellulaire, un analogue de GMPc, le 8-Br-GMPc, reproduit l'effet inhibiteur rapporté pour l'ANP et le CNP, montrant donc un processus anti-prolifératif intimement lié à la production de GMPc dans les fibroblastes ventriculaires. En effet, le c-ANP ne produit aucun effet anti-mitogénique. Donc, les récepteurs biologiquement actifs NPR-A et NPR-B, présents au

niveau des fibroblastes cardiaques, semblent participer activement aux processus limitant la réplication des fibroblastes, via la production de GMPc. D'autres études ont montré l'implication du GMPc dans les propriétés anti-prolifératives des peptides natriurétiques. Le 8-Br-GMPc reproduit les effets inhibiteurs observés avec l'ANP sur les cellules endothéliales (Itoh *et al.*, 1992). Aussi, un activateur de la guanylyl cyclase cytosoluble, le sodium nitroprussiate, a été capable de réguler l'expression de la MAPK phosphatase-1 dans les cellules mésangiales (Sugimoto *et al.*, 1996). Plus récemment, Yu *et al.* ont montré l'implication de la PKG dans l'inhibition de l'activité de la MAPK, probablement via une phosphorylation de la protéine Raf-1 (Yu *et al.*, 1997).

Par contre, d'autres études ont aussi démontré l'implication de signaux intracellulaires différents du GMPc dans les mécanismes anti-prolifératifs des peptides natriurétiques. Sur des cellules vasculaires musculaires lisses, Cahill et Hassid ont démontré l'implication du récepteur NPR-C dans des processus anti-mitogéniques par l'utilisation de différents agonistes spécifiques, des analogues de l'ANP. Curieusement, seul le c-ANP n'a pas produit d'effets anti-prolifératifs mais a plutôt antagonisé les effets induits par d'autres agonistes du récepteur NPR-C (CaHill et Hassid, 1994). Dans notre étude, le c-ANP ne présente aucun effet potentialisateur ou antagoniste sur l'action anti-proliférative qu'engendre l'ANP en présence de PDGF. Par contre, l'implication du récepteur NPR-C n'a pas été étudiée par l'utilisation d'agonistes spécifiques autres que le c-ANP. Nous ne pouvons donc pas exclure totalement la possibilité d'un mécanisme anti-mitogénique découlant de l'activation du récepteur NPR-C. En effet, le récepteur NPR-C originellement confiné au métabolisme de l'ANP, semble aussi lié à la

production de différents seconds messagers dont les phosphatidylinositols, l'AMPc et le NO (Anand-Srivastava *et al.*, 1996; McLay *et al.*, 1995; Nussenzweig *et al.*, 1990; Hirata *et al.*, 1989). Par contre, l'étude de Cahill et Hassid a aussi montré un effet potentialisateur du 8-Br-GMPc sur les effets inhibiteurs des agonistes pour le récepteur NPR-C, impliquant un mécanisme anti-mitogénique dépendant aussi de la production de GMPc dans la cellule. De plus, les effets anti-prolifératifs des différents agonistes pour le récepteur NPR-C n'ont pas été observés sur les cellules mésangiales et endothéliales, suggérant une propriété propre aux cellules vasculaires musculaires lisses (Cahill et Hassid, 1994).

Les peptides natriurétiques semblent donc être impliqués à court terme (environ 24 h) dans les processus de la division cellulaire. Nous avons aussi investigué les effets des peptides natriurétiques sur un traitement au PDGF à plus long terme au niveau des fibroblastes cardiaques. Aucun peptide natriurétique, incluant le c-ANP, n'est capable d'inhiber significativement la prolifération cellulaire. Seulement le 8-Br-GMPc, à une concentration de 1 mmol/L, réduit significativement de 9% l'effet mitogénique produit par le PDGF sur une durée de trois jours. En fait, après un traitement de 24 h au PDGF, la densité des récepteurs aux peptides natriurétiques (95% NPR-C) diminue de moitié. Par contre, ce traitement au PDGF potentialise la réponse en GMPc après stimulation à l'ANP, suggérant une augmentation de la densité et/ou de la sensibilité des récepteurs couplés à la guanylyl cyclase. Cette augmentation semble être propre au récepteur NPR-A car aucun effet potentialisateur n'est observé pour la production de GMPc induite au CNP. Cependant, l'élévation de GMPc ne semble pas suffisante pour contrer l'effet prolifératif du PDGF en conditions *in vitro*. La dégradation des peptides ne

peut s'avérer ici un argument car les milieux de culture contenant les agents ont été changé toutes les 24 h. Par contre, cette augmentation de sensibilité du récepteur NPR-A pourrait jouer un rôle *in vivo* important afin de limiter la prolifération des fibroblastes cardiaques tôt après la relâche de facteurs de croissance dans le milieu interstitiel causée par l'induction de l'hypertrophie. Récemment, Nakagawa *et al.* ont montré l'implication du BNP comme hormone d'urgence dans l'hypertrophie cardiaque par l'induction très rapide de sa synthèse durant la première heure suivant le début des stimuli hypertrophiques, précédant l'accumulation de l'ARNm de l'ANP (Nakagawa *et al.*, 1995). L'ANP et le BNP possèdent une affinité plus grande pour le récepteur NPR-A (Thibault *et al.*, 1995), suggérant l'implication possible d'une augmentation de sa sensibilité et de sa production plus élevée en GMPc dans le but de limiter une hyperplasie des fibroblastes à court terme.

En plus d'examiner les processus prolifératifs, nous avons aussi vérifié l'effet des peptides natriurétiques sur la sécrétion de fibronectine dans le milieu extracellulaire. En effet, après l'induction d'une hypertrophie cardiaque, la synthèse de fibronectine semble précéder celle du collagène et pourrait être un élément modulateur important dans les processus de fibrose (Villareal et Dilmann, 1992). Par *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), nous montrons une augmentation de sécrétion de fibronectine par un facteur 3.2 au niveau des fibroblastes cardiaques adultes en présence de PDGF. Par contre, aucun peptide natriurétique ne produit un effet sur cette sécrétion induite par le PDGF. Ni le c-ANP et ni le 8-Br-GMPc ne modifient l'effet du PDGF. L'ANP et le CNP réduisent donc la division cellulaire sans agir au niveau de la sécrétion de fibronectine. En fait, ces deux processus intracellulaires semblent être dissociés. Une concentration de 0.2 nmol/L de

PDGF induit la synthèse d'ADN d'un facteur moyen de 15 mais augmente la sécrétion de fibronectine par un facteur de 3.2. Au niveau des fibroblastes cardiaques fœtaux, une étude a montré un effet prolifératif de l'Ang II sans pour autant influencer la production de collagène (Butt *et al.*, 1995). Les mécanismes responsables de la prolifération cellulaire et ceux impliqués dans la sécrétion des protéines de la matrice extracellulaire ne semblent pas être directement reliés et peuvent découler de voies de signalisation intracellulaire différentes.

Les peptides natriurétiques peuvent jouer un rôle important dans la croissance cellulaire au niveau de différents tissus. Leurs propriétés anti-prolifératives pourraient servir à corriger l'hypertrophie tissulaire. En effet, dans des cocultures de cellules endothéliales et vasculaires musculaires lisses, des transfections d'un vecteur d'expression du gène de l'ANP dans les deux types cellulaires résultent en une inhibition de la croissance des cellules vasculaires musculaires lisses (Morishita *et al.*, 1994).

Dans notre étude, les peptides natriurétiques inhibent à court terme l'hyperplasie excessive des fibroblastes cardiaques via un mécanisme impliquant la production de GMPc, résumé à la figure 3.1 (page suivante). Cette propriété anti-mitogénique peut servir à limiter le remodelage ventriculaire causé par la relâche de facteurs de croissance afin de préserver l'intégrité structurale du coeur.

---



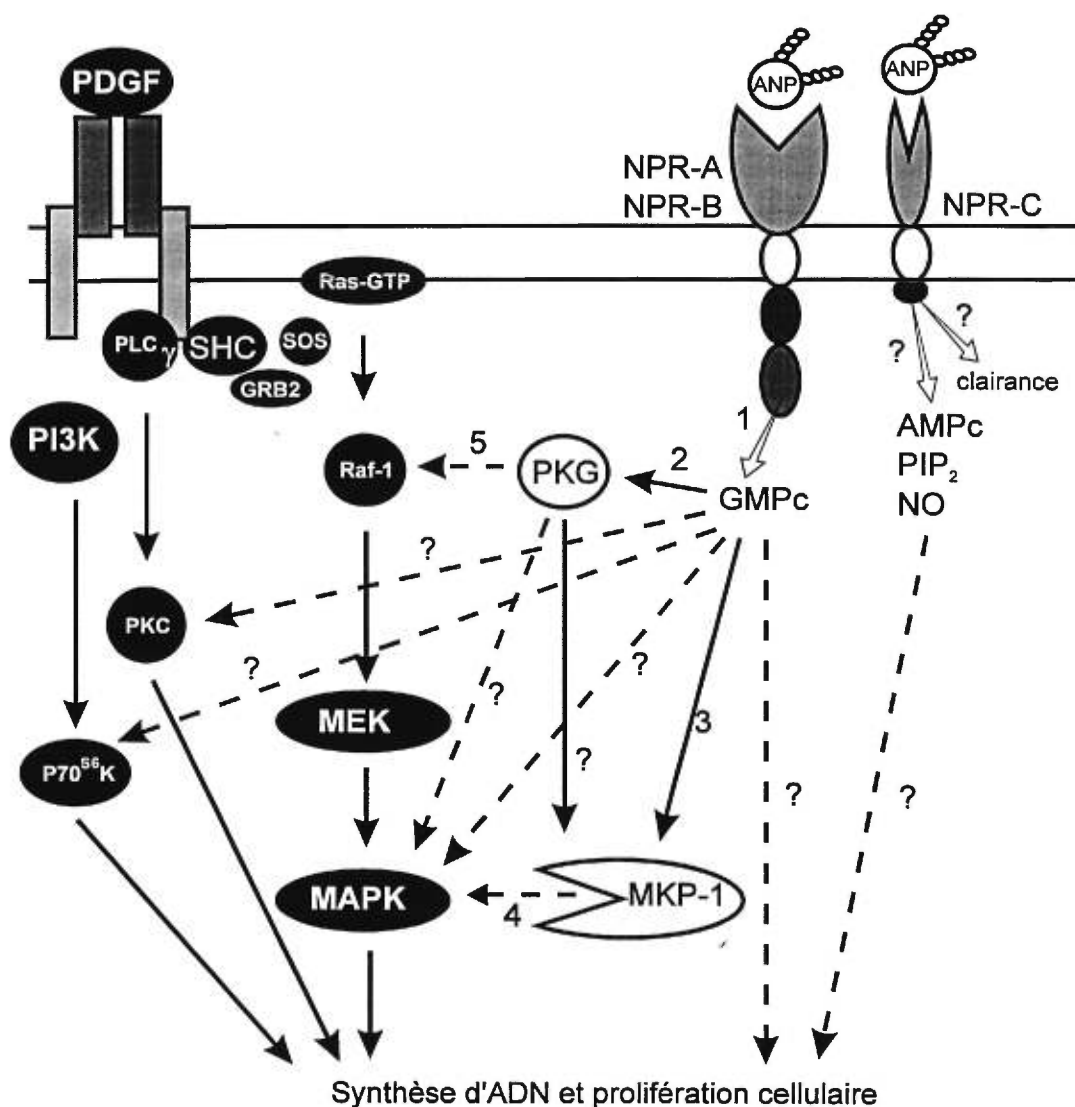


Figure 3.1 Représentation schématique des mécanismes possibles de l'action antirépllicative des peptides natriurétiques. Le GMPc, produit dans la cellule par l'ANP après sa liaison aux récepteurs couplés à la guanylyl cyclase (1), augmente l'expression de la MKP-1 (3), ce qui inactive la MAPK (4) et diminue l'effet mitogénique du PDGF. Activé par le GMPc (2), la PKG est capable de phosphoryler la protéine Raf-1 (5) pour diminuer son activité et affecter la cascade de signalisation en aval. Le GMPc pourrait aussi agir au niveau de la P70<sup>S6</sup> Kinase, de la PKC et directement sur des facteurs nucléaires contrôlant la réplication de l'ADN. Couplés au récepteur NPR-C indépendant du GMPc, l'AMPC, les phosphatidylinositols et le NO pourraient influencer la prolifération cellulaire.

(1) flèche continue: activation

flèche discontinue: inhibition

?: effet probable dont le mécanisme précis est inconnu

## Conclusion

Les peptides natriurétiques inhibent la réplication des fibroblastes cardiaques adultes en diminuant la progression vers la phase S et en réduisant la synthèse d'ADN. Aussi, l'ANP pourrait agir au niveau du cycle cellulaire en retardant l'expression de protéines importantes plutôt que les inhiber. Cette propriété anti-mitogénique semble néanmoins se faire par un mécanisme dépendant de la production intracellulaire de GMPc après liaison et activation des récepteurs NPR-A et/ou NPR-B. Par contre, à plus long terme, aucun peptide natriurétique ne peut réduire la prolifération des fibroblastes, probablement la conséquence d'une production accrue mais insuffisante de GMPc, causée par la présence continue de PDGF, afin de promouvoir davantage l'action anti-mitogénique après la phase S du cycle cellulaire.

Le système natriurétique cardiaque permet de contrebalancer à court terme les effets prolifératifs causés par les facteurs de croissance relâchés après l'induction de l'hypertrophie cardiaque. La génération de GMPc induite par les peptides natriurétiques joue un rôle important dans leurs actions anti-prolifératives bien que les mécanismes responsables restent encore à être étudiés.

## Références

Abuyara, M., E. Suzuki, N. Minamino, K. Kangawa, K. Tanaka, H. Matsuo. 1989. Concentration and molecular forms of brain natriuretic peptide in porcine heart and blood. *Biochem Biophys Res Comm* 159:1427-1434.

Adams, S.P., K.F. Fok, G.M. Olins, A.J. Tropanis, et P.A. Krieter. 1988. Synthesis, activity, and duration studies of pseudo peptide analogs of atrial natriuretic factor. Dans: *Biological and Molecular Aspects of Atrial Factors*. 109-124.

Ahumada, G.G., et J.E. Sffitz. 1984. Fibronectin in rat heart: a link between cardiac myocytes and collagen. *J Histochem Cytochem* 32:383-388.

Ahumada, G.G., S.I. Rennard, A.A. Figueroa, et M.H. Silver. 1981. Cardiac fibronectin: development distribution and quantitative comparison of possible sites of synthesis. *J Mol Cell Cardiol* 13:667-678.

Akiyama, S.K., S.S. Yamada, W.T. Chen, et K.M. Yamada. 1989. Analysis of fibronectin receptor function with monoclonal antibodies: roles in cell adhesion, migration, matrix assembly, and cytoskeletal organization. *J Cell Biol* 109:863-875.

Anand-Srivastava, M.B., P.D. Sehl, et D.G. Lowe. 1996. Cytoplasmic domain of natriuretic peptide receptor-c inhibits adenylyl cyclase. Involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Biol Chem* 271:19324-19329.

Anand-Srivastava, M.B., M.R. Sairam, et M. Cantin. 1990. Ring-deleted analogs of atrial natriuretic factor inhibits adenylate cyclase/cAMP system. *J Biol Chem* 265:8566-8572.

Andronico, G., M.T. Mangano, L. Ferrera, D. Lamanna, G. Mulè, et G. Cerasola. 1996. Insulin-like growth factor-1 and pressure load in hypertensive patients. *Am J Hypertens* 9:607-609.

Ashizawa, N., K. Graf, Y.S. Do, T. Nunohiro, C.M. Giachelli, W.P. Meehan, T.-L. Tuan, et W.A. Hsueh. 1996. Osteopontin is produced by rat cardiac fibroblasts and mediates  $A_{II}$ -induced DNA synthesis and collagen gel contraction. *J Clin Invest* 98:2218-2227.

Argentin, S., Y.L. Sun, J. Lihmann, T.J. Schmidt, J. Drouin, et M. Nemer. Distal cis-acting promoter sequences mediate glucocorticoid stimulation of cardiac atrial natriuretic factor gene transcription. *J Biol Chem* 266:23315-23322.

Atarashoi, K., P.J. Mulrow, et R. Franco-Soenz. 1985. Effect of atrial peptides on aldosterone production. *J Clin Invest* 76:1807-1811.

Atlas, S.A., J.H. Laragh. 1986. Atrial natriuretic peptide: a new factor in hormonal control of blood pressure and electrolyte homeostasis. *Ann Rev Med* 37:397-414.

Baker, K.M., et J.F. Aceto. 1990. Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *Am J Physiol* 259:H610-H618.

Ballermann, B.J., K.D. Bloch, J.G. Seidman, et B.M. Brenner. 1986. Atrial natriuretic peptide transcription, secretion, and glomerular receptor activity during mineralocorticoids escape in the rat. *J Clin Invest* 78:840-843.

Barrio, U., G. DeArriba, J. Lopez-Novoa, et D. Rodriguez-Pyol. 1987. Atrial natriuretic factor inhibits glomerular contraction induced by angiotensin and platelets activation factor. *Eur J Pharmacol* 135:697-698.

Bastagli, L., T. Lazzarotto, C.M. Caldarera, C. Guarnieri, C. Ventura, G. Pepe, et P. Puddu. 1995. Presence of basic fibroblast growth factor in cultured rat cardiomyocyte and its release in culture medium. *Ann N Y Acad Sci* 752 :417-421.

Bastagli, L., C. Ventura, C. Muscari, C. Guarnieri, P. Bernadi, C.M. Caldarera, et P. Puddu. 1990. Receptors for atrial natriuretic factor in

cardiomyocytes and aortic smooth muscle cells. *Cardioscience* 1:177-181.

Bennett, V.D., K.M. Pallante, et S.L. Adams. 1991. The splicing pattern of fibronectin mRNA changes during chondrogenesis resulting in an unusual form of mRNA in cartilage. *J Biol Chem* 266:5918-5924

Birkedal-Hansen, H., W.G.J. Moore, et M.K. Bodden. 1993. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:197-250.

Bishop, J.E., et G.J. Laurent. 1995. Collagen turnover and its regulation in normal and hypertrophied heart. *Eur Heart J* 16:38-44.

Boluyt, M.O., L. O'Neill, A.L Meredith. O.H.L. Bing, W.W. Brooks, C.H. Conrad, M.T. Crow, et E.G. Lakatta. 1994. Alteration in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. *Circ Res* 75:23-32.

Booz, G.W., et K.M. Baker. 1995. Molecular signaling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 30:537-543.

Booz, G.W., D.E. Dostal, H.A. Singer, et K.M. Baker. 1994. Involvement of protein kinase C and  $Ca^{2+}$  in angiotensin II-induced mitogenesis of cardiac fibroblasts. *Am J Physiol* 267:C1308-C1318.

Booz, G.W., M.M. Taher, K.M. Baker, et H.A. Singer. 1994. Angiotensin II induces phosphatidic acid formation in neonatal rat cardiac fibroblasts: evaluation of the roles of phospholipases C and D. *Mol Cell Biochem* 141:135-143.

Border, W., N.A. Noble, T. Yamamoto, J.R. Harper, Y. Yamaguchi, M.D. Pierschbacher, et E. Ruoslahti. 1992. Natural inhibitor of transforming growth factor- $\beta$  protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 360:361-364.

Borg, T.K., K. Rubin, W. Carver, A. Samarel, et L. Terracio. 1996. The cell biology of the cardiac interstitium. *Trends Cardiovasc Med* 6:65-70.

Borg, T.K., L.D. Johnson, et P.H. Lill. 1983. Specific attachment of collagen to cardiac myocytes: *In vitro* and *in vivo*. *Dev Biol* 97:417-423.

Borg, T.K., et J.B. Caulfield. 1981. The collagen matrix of the heart. *Fed Proc* 40:2037-2041.

Brilla, C.G., G. Zhou, L. Matsubara, et K.T. Weber. 1994. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* 26:809-820.

Brilla, C.G., G.P. Reams, B. Maish, et K.T. Weber. 1993. Renin-angiotensin system and myocardial fibrosis in hypertension: regulation of the myocardial collagen matrix. *Eur Heart J* 14: 57-61.

Buck, C.A., et A. Horwitz. 1987. Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. *Annu Rev Cell Biol* 3:179-205.

Buckalew, V.M., M. Morris, et R.W. Hamilton. 1987. Atrial natriuretic factor. *Adv Intern Med* 32:1-23.

Burgess, M.L., W.E. Carver, L. Terracio, S.P. Wilson, M.A. Wilson, et T.K. Borg. 1994. Integrin-mediated collagen gel contraction by cardiac fibroblasts: effects of angiotensin II. *Circ Res* 74:291-298.

Butt, R.P., G.J. Laurent, et J.E. Bishop. 1995. Mechanical load and polypeptide growth factors stimulate cardiac fibroblast activity. *Ann N Y Acad Sci* 752:387-393.

Cahill, P.A., et A. Hassid. 1994. ANF-C receptor-mediated inhibition of aortic smooth muscle cell proliferation and thymidine kinase activity. *Am J Physiol* 266:R194-R203.

Calderone, A., N. Takahashi, J.J. Izzo, C.M. Thaik, et W.S. Colucci. 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.

- Canaff, L., V. Brechler, T.L. Reudelhuber, et G. Thibault. 1996. Secretory granule targeting of atrial natriuretic peptide correlates with its calcium-mediated aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9483-9487.
- Cannaankuhl, S., R.L. Jamison, B.D. Myers, et R.E. Pratt. 1992. Identification of B-receptor for natriuretic peptide in human kidney. *Endocrinology* 130:550-552.
- Cantin, M., et J. Genest. 1985. The heart and the atrial natriuretic factor. *Endocr Rev* 6:107-127.
- Cao, L., et D.G. Gardner. 1995. Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. *Hypertension* 25:227-234.
- Carter, W.G., E.A. Wayner, T.S. Bouchard, et P. Kaur. 1990. The role of integrins  $\alpha_2\beta_1$  and  $\alpha_3\beta_1$  in cell-cell and cell-substrate adhesion of human epidermal cells. *J Cell Biol* 110:1387-1404.
- Casscells, W., H. Kimura, J.A. Sanchez, Z.X. Yu, et V.J. Ferrans. 1990. Immunohistochemical study of fibronectin in experimental myocardial infarction. *Am J Pathol* 137:801-810.
- Casto, R., J. Hilbig, G. Schroeder, et G. Stock. 1987. Atrial natriuretic factor inhibits central angiotensin II pressor responses. *Hypertension* 9:472-477.
- Chang, M., D.G. Love, M. Lewis, R. Hellmiss, E. Chen, et D.V. Goeddel. 1989. Differential activation by atrial and brain natriuretic peptides on 2 different receptor guanylate cyclase. *Nature* 341:68-72.
- Chapman, D., K.T. Weber, et M. Eghabali. 1990. Regulation of fibrillar collagen type I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium. *Circ Res* 67:787-794.
- Chien, K.R., K.U. Knowlton, H. Ziu, et S. Chien. 1991. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptative response. *FASEB J* 5:3037-3046.

- Chinkers, M., S. Singh, et D.L. Garbers. 1991. Adenine nucleotides are required for activation of the rat atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase. *Mol Cell Biol* 12:2581-2590.
- Chinkers, M., et D.L. Garbers. 1989. The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling. *Science* 245:1392-1394.
- Choy, M., M.T. Armstrong, et P.B. Armstrong. 1990. Regulation of proliferation of embryonic heart mesenchyme: role of transforming growth factor beta 1 and the interstitial matrix. *Dev Biol* 141:421-425.
- Clavell, A., A. Stingo, C. Wei, D. Heublein, et J. Burnett. 1993. C-type natriuretic peptide: a selective cardiovascular peptide. *Am J Physiol* 264:R290-R295.
- Clemo, H.F., C.M. Baumgarten, K.A. Ellenbogen, et B.S. Stambler. 1996. Atrial natriuretic peptide and cardiac electrophysiology: autonomic and direct effects. *J Cardiovasc Electrophysiol* 7:149-162.
- Conrad, C.H., W.W Brooks, J.A. Heyes, S. Sen, K.G. Robinson, et O.H.L. Bing. 1995. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation* 91:161-170.
- Corthorn, J., M. Cantin, et G. Thibault. 1991. Rat atrial secretory granules and pro-ANF processing enzyme. *Mol Cell Biochem* 103:31-39.
- Cornwell, T.L., K.B. Pryzwansky, T.A. Wyatt, et T.M. Lincoln. 1991. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cGMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 40:923-931.
- Crabos, M., M. Roth, A.W.A. Hahn, et P. Erne. 1994. Characterization of angiotensin II receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts: coupling to signaling systems and gene expression. *J Clin Invest* 93:2372-2378.



Crawford, D., A.V. Chobanian, et P. Brecher. 1994. Angiotensin II induces fibronectin expression associated with cardiac fibrosis in the rat. *Circ Res* 74:727-739.

Cummins, P. 1993. Fibroblast and transforming growth factor expression in the cardiac myocyte. *Cardiovasc Res* 27:1150-1154.

Currie, M.G., D.M. Geller, B.R. Cole, N.R. Siegel, K.F. Fok, S.P. Adams, R. Eubanks, G.R. Gallupi, et P. Needleman. 1984. Purification and sequence analysis of bioactive atrial peptides (atriopeptins) *Science* 21: 67-69.

Danser, A.H.J., J.P. van Kats, P.J.J. Admiraal, F.H.M. Derkx, J.M.J. Lamers, P.D. Verdouw, P.R. Saxena, M.A.D.H. Schalekamp. 1994. Cardiac renin and angiotensins: uptake from plasma versus *in situ* synthesis. *Hypertension* 24:37-48.

de Bold, A.J., B.G. Bruneau, et M.L. Kuroski-de Bold. 1996. Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart. *Cardiovasc Res* 31:7-18.

de Bold, A.J. 1985. Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart. *Science* 230:767-770.

de Bold, A.J., H.B. Borenstrin, A.T. Veress, et H. Sonnenberg. 1981. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extracts in rats. *Life Sci* 28:89-94.

Dickinson, K.E.J., A.A. Thymiak, R.B. Cohen, E.C.K. Liu, M.L. Webb, et A.Hedberg. 1991. Vascular A-10 cell membranes contain an endothelin metabolizing eutral endopeptidase. *Biochem Biophys Res Comm* 176:423-430.

Doering, C.W., J.E. Jalil, et J.S. Janick. 1988. Collagen network remodelling and diastolic stiffness of the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy. *Cardiovasc Res* 22:686-695.

Dollery, C.M., J.R. McEwan, et A.M. Henney. 1995. Matrix metalloproteinase and cardiovascular disease. *Circ Res* 77:863-868.

Donath, M.Y., J. Zapf, M. Eppenberger-Eberhardt, E.R. Froesch, et H.M. Eppenberger. 1994. Insulin-like growth factor-1 stimulates myofibril development and decreases smooth muscle  $\alpha$ -actin of adult cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1715-1721.

Donohue, T.J., L.D. Dworkin, M.N. Lango, K. Fliegner, R.P. Lango, J.A. Benstein, W.R. Slater, et V.M. Catanese. 1994. Induction of myocardial insulin-like growth factor-1 gene expression in left ventricular hypertrophy. *Circulation* 89:799-809.

Dostal, D.E., K.N. Rothblum, M.I. Chernin, G.R. Cooper, et K.M. Baker. 1992a. Intracardiac detection of angiotensinogen and renin: a localized renin-angiotensin system in neonatal rat heart. *Am J Physiol* 263:C838-C850.

Dostal, C.G., K.N. Rothblum, K.M. Conrad, G.R. Cooper, et K.M. Baker. 1992b. Detection of angiotensin I and II in cultured rat cardiac myocytes and fibroblasts. *Am J Physiol* 263:C851-C863.

Dostal, C.G., et K.M. Baker. 1992. Angiotensin II stimulation of left ventricular hypertrophy in adult rat heart: mediation by the AT<sub>1</sub> receptor. *Am J Hypertens* 5:276-280.

Dostal, C.G., et K.M. Baker. 1993. Evidence for a role of an intracardiac renin-angiotensin system in normal and failing hearts. *Trends Cardiovasc Med* 3:67-74.

Duerr, R.L., M.D. McKirnan, R.D. Gim, R.G. Clark, K.R. Chien, et J. Ross Jr. 1996. Cardiovascular effects of insulin-like growth factor-1 and growth hormone in chronic left ventricular failure in the rat. *Circulation* 93:2188-2196.

Dussaule, J.C., A. Stefanski, M.L. Bea, P. Ronco, et R. Ardailou. 1993. Characterization of neutral endopeptidase in vascular smooth muscle cells of rabbit renal cortex. *Am J Physiol* 264:F45-F52.

Eghbali, M., T.F. Robinson, S. Seifter, et O. Blumenfeld. 1989. Collagen accumulation in heart ventricles as a function of growth and aging. *Cardiovasc Res* 23:723-729.

Engelmann, G.L. 1983. Coordinate gene expression during neonatal rat heart development: a possible role for the myocyte in extracellular matrix biogenesis and capillary angiogenesis. *Cardiovasc Res* 27:1598-1605.

Espiner, E.A. 1994. Minisymposium: The natriuretic peptide hormones. Physiology of natriuretic peptides. *J Intern Med* 235:527-541.

Evers, A.S., S. Murphree, J.E. Saffitz, B.A. Jakschik, et P. Needleman. 1985. Effects of endogenously produced leukotrienes, thromboxanes, and prostaglandins on coronary vascular resistance in rabbit myocardial infarction. *J Clin Invest* 75:992-999.

Fareh, J., R.M. Touyz, E.L. Schiffrin, et G. Thibault. 1996. Endothelin-1 and angiotensin II receptors in cells from rat hypertrophied heart. *Circ Res* 78:302-311.

Fareh, J., R.M. Touyz, G. Thibault, et E.L. Schiffrin. 1995. Basal and angiotensin II-induced cytosolic free calcium in adult rat cardiomyocytes and fibroblasts after volume overload. *Hypertension* 26:1149-1153.

Farhadian, F., F. Contard, A. Corbier, A. Barrieux, L. Rappaport, et J.L. Samuel. 1995. Fibronectin expression during physiological and pathological cardiac growth. *J Mol Cell Cardiol* 27:981-990.

Farhadian, F., A. Barrieux, S. Lortet, F. Marott, P. Oliviero, L. Rappaport, et J.L. Samuel. 1994. Differential splicing of fibronectin pre-mRNA during cardiac ontogeny and development of hypertrophy in the rat. *Lab Invest* 71:552-559.

Farivar, R.S., A.V. Chobanian, et P. Brecher. 1995. Effect of angiotensin II blockade on the fibroproliferative response to phenylephrine in the rat heart. *Hypertension* 25:809-813.

Ffrench-Constant, C., L. Van de Water, H.F. Dvorak, et R.O. Hynes. 1989. Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat. *J Cell Biol* 109:903-914.

Fisher, S.A., et M. Absher. 1995. Norepinephrine and ANG II stimulate secretion of TGF- $\beta$  by neonatal rat cardiac fibroblasts *in vitro*. *Am J Physiol* 268:C910-C917.

Fisher, T.A., D. Ungureanu-Longrois, K. Singh, J. De Zengotita, D. de Ugarte, A. Alali, A.P. Gadbut, M.-A. Lee, J.-L. Balligand, I. Kifor, T.W. Smith, et R.A. Kelly. 1997. Regulation of bFGF expression and ANG II secretion in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. *Am J Physiol* 272:H958-H968.

Foccacio, A., G. Ambrosio, I. Enea, R. Russo, P. Balestrieri, M. Chiariello, et M. Volpe. 1995. Influence of O<sub>2</sub> deprivation, reduced flow, and temperature on release of ANP from rabbit hearts. *Am J Physiol* 268:H2352-H2357.

Forssman, W.G., K. Nokihama, M. Gagelmann, D. Hock, S. Feller, K.P. Schulz, et F. Herst. 1989. The heart is the center of a new endocrine, paracrine, and neuroendocrine system. *Arch Histol Cytol* 52:293-315.

Frank, J.S., et G.A. Langer. 1974. The myocardial interstitium: its structure and its role in ionic exchange. *J Cell Biol* 60:586-601.

Fujisaki, H., H. Ito, Y. Hirata, M. Tanaka, M. Hata, M. Lin, S. Adachi, H. Akimoto, F. Maromo, et M. Hiroe. 1995. Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression. *J Clin invest* 96:1059-1065.

Fuller, F, J.G. Porter, A.E. Arfsten, J. Miller, J.W. Schilling, R.M. Scarborough, J.A. Lewicki, et D.B. Schenk. 1988. Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA clones. *J Biol Chem* 263:9395-9401.

Gafford, J.T., R.A. Skidgel, E.G. Erdös, et L.B. Hersh. 1983. Human kidney "enkephalinase", a neutral metalloendopeptidase that cleaves active peptides. *Biochemistry* 22:3265-3271.

Garcia, R., W. Debinski, J. Gutkowska, O. Kuchel, G. Thibault, J. Genest, et M. Cantin. 1985. Gluco- and mineralocorticoids may regulate the natriuretic effects and the synthesis and release of atrial natriuretic factor by rat atria *in vivo*. *Biochem Biophys Res Comm* 131:806-814.

Gardner, D.G., B.J. Gertz, C.F. Deschepper, et D.Y. Kim. 1988. Gene for the rat atrial natriuretic peptide is regulated by glucocorticoids *in vitro*. *J Clin Invest* 82:1275-1281.

Gardner, D.G., C.F. Deschepper, W.F. Ganong, S. Hane, J. Fiddes, J.D. Baxter, et J. Lewicki. 1986. Extra-atrial expression of the gene for atrial natriuretic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:6697-6701.

Gehlsen, K.R., K. Dickerson, W.S. Argraves, E. Engvall, et E. Ruoslahti. 1989. subunit structure of a laminin-binding integrin and localization of its binding site on laminin. *J Cell Biol* 264:19034-19038.

Glembotski, C.C., C.E. Irons, A.B. Sprenkle, et C.A. Sei. 1991. Studies of ANF processing and secretion using a primary cardiocyte culture model. *Can J Physiol Pharmacol* 69:1525-1536.

Gluckova, M.A., M.G. Frid, B.V. Shekhonin, Y.V. Balabanov, et V.E. Koteliansky. 1990. Expression of fibronectin variants and visceral smooth muscle cell in development. *Dev Biol* 141:193-202.

Gluckova, M.A., M.G. Frid, B.V. Shekhonin, T.D. Vasilevkaya, J. Grunwald, M. Saginati, et V.E. Koteliansky. 1989. Expression of extradomain A fibronectin sequence is phenotype dependant. *J Cell Biol* 109:357-366.

Goetz, K.L. 1988. Physiology and pathophysiology of atrial peptides. *Am J Physiol* 254:E1-E15.

Goodfriend, T.L., M.E. Elliot, et S.A. Atlas. 1984. Action of synthetic atrial natriuretic factor on bovine adrenal glomerulosa. *Life Sci* 35:1675-1682.

Grossman, W. 1980. Cardiac hypertrophy: adaptation or pathological process. *Am J Med* 69:576-583.

Guarda, E., L.C. Katwa, P.R. Myers, S.C. Tyagi, et K.T. Weber. 1994. Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 27:2130-2134.

Gullberg, D., D.C. Turner, T.K. Borg, L. Terracio, et K. Rubin. 1990. Different  $\beta_1$  integrin collagen receptors on primary hepatocyte and cardiac fibroblasts. *Exp Cell Res* 190:254-264.

Gullberg, D., L. Terracio, T.K. Borg, et K. Rubin. 1989. Integrin-like collagen receptors on primary cells: identification of integrins on hepatocyte and fibroblasts with affinity for interstitial collagens. *J Biol Chem* 264:12686-12694.

Gutkowska, J. et M. Nemer. 1989. Structure, expression and function of atrial natriuretic factor in extraatrial tissues. *Endocr Rev* 10:510-536.

Gutkowska, J., R. Garcia, K. Racz, G. Thibault, O. Kuchel, J. Genest, et M. Cantin. 1986. The morphine effect of plasma atrial natriuretic factor. *Eur J Pharmacol* 131:91-94.

Haisong, J., et I.M.C. Dixon. 1996. Extracellular matrix and cardiovascular diseases. *Can J Cardiol* 12:1259-1267.

Hashiguchi, T., K. Higuchi, et M. Ohashi. 1988. Porcine brain natriuretic peptide: another modulator of bovine adrenocortical steroidogenesis. *FEBS Lett* 236:455-461.

Hedin, U., B.A. Bottger, J. Luthman, S. Johansson, et J. Thyberg. 1989. A substrate of the cell-attachment sequence of fibronectin (Arg-Gly-Asp-Ser) is sufficient to promote transition of arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype. *Dev Biol* 133:489-501.

Hedin, U., B.A. Bottger, J. Luthman, S. Johansson, et J. Thyberg. 1988. Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Biol* 107:307-319.

Hein, L., G.S. Barsh, R.E. Pratt, V.J. Dzau, et B.K. Kobilka. 1995. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type -2 receptor gene in mice. *Nature* 377:744-747.

Hemler, M.E., C. Crouse, et A. Sonnenberg. 1989. Association of the VLA  $\alpha_6$  subunit with a novel protein. *J Biol Chem* 264:6529-6535.

Hemler, M.E., C. Huang, et L. Schwartz. 1987. The VLA protein family: Characterization of five distinct cell surface heterodimers each with a common 130,000 molecular weight B subunit. *J Biol Chem* 262:3300-3243.

Henegar, J.R., G.L. Browser, A. Kabour, et J.S. Janicki. 1995. Catecholamine response to chronic ang II infusion and its role in myocyte and coronary vascular damage. *Am J Physiol* 269:H1564-H1569.

Henrich, W.L., E.A. McAlister, P.B. Smith, J. Lipton, et W.B. Campbell. 1987. Direct inhibitory effect of atrial natriuretic factor on renin release in primate kidney. *Life Sci* 41:259-264.

Herrera, R., T.R. Mäkelä, et R.A. Weinberg. 1996. TGF $\beta$ -induced growth inhibition in primary fibroblasts requires the retinoblastoma protein. *Mol Biol Cell* 7:1335-1342.

Hino, J., H. Tateyama, N. Minamino, K. Kanyawa, et H. Matsuo. 1990. Isolation and identification of brain natriuretic peptides in cardiac atrium. *Biochem Biophys Res Comm* 167:693-700.

Hirata, M., K.P. Kohse, C.H. Chang, T. Ikebe, et F. Murad. 1990. Mechanism of cyclic GMP inhibition of inositol phosphate formation in rat aortic segments and cultured bovine aortic smooth muscle. *J Biol Chem* 265:1268-1273.

Hirata, M., C.H. Chang, et F. Murad. 1989. Stimulatory effects of atrial natriuretic factor on phosphoinositide hydrolysis in cultured bovine aortic smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1010:346-351.

Hirata, Y., H. Marsubara, Y. Fukuda, et F. Toshimi. 1988. Cellular mechanisms of atrial natriuretic peptide secretion by cultured rat cardiomyocytes. *J Hypertens* 6:S295-S296.

Holt, C.M., S.E. Francis, P.A. Gadsdon, A. Violaris, M.B. Izzat, et G. D. Angellini. 1994. Release of platelet derived growth factor in serum-free organ culture of human coronary artery. *Cardiovasc Res* 28:1170-1175.

Hou, J, H. Kato, R.A.Cohen, A.V. Chobanian, et P. Brecher. 1995. Angiotensin II-induced cardiac fibrosis in the rat increased by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 96:2469-2477.

Hsu, D., P.E. Knudson, A. Zapf, G.C. Rolband, et J.M. Olefsky. 1994. NPXY motif in the insulin-like growth factor-1 receptor is required for efficient ligand mediated receptor internalization and biological signaling. *Endocrinology* 134:744-750.

Hu, J., R. Von Harsoff, et R.E. Lang. 1988. Inhibition of cardiac  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase stimulates atrial natriuretic peptide release. *J Hypertens* 6:S712.(Résumé).

Huang, C.L., J. Lewicki, K. Johnson, et M.G. Cogan. 1985. Renal mechanism of action of rat atrial natriuretic factor. *J Clin Invest* 75:769-773.

Hynes, R.O. 1990. *Fibronectins*, Rich, A. ed. Springer Verlag, Berlin, Germany. 1-545.

Hynes, R.O. 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48:549-554.

Ichiki, T., P.A. Labosky, C. Shiota, S. Okuyama, Y. Imagawa, A. Fogo, F. Niimura, I. Ichikawa, B.L.M. Hogan, et T. Inagami. 1995. Effects on



blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature* 377:748-750.

Ignatius, M.J., et L.F. Reichard. 1988. Identification of a neuronal laminin receptor: An M<sub>v</sub> 200K/120K integrin heterodimer that binds in a divalent cation-dependent manner. *Neuron* 1:713-725.

Iimoto, D.S., J.W. Covell, et E. Harper. 1988. Increase in cross-linking of type I and type III collagens associated with volume-overloaded hypertrophy. *Circ Res* 63:399-408.

Ikeda, M., M. Kohno, et T. Takeda. 1995. Inhibition by cardiac natriuretic peptides or rat vascular endothelial cell migration. *Hypertension* 26:401-405.

Imada, T., R. Takayangai, et T. Inagami. 1988. Atrioactivase, a specific peptidase in bovine atria for the processing of pro-atrial natriuretic factor. *J Biol Chem* 263:9515-9519.

Imura, H., K. Nakao, et H. Itoh. 1992. The natriuretic peptide system in the brain: implications of the central control of cardiovascular and neuroendocrine functions. *Frontiers in Neuroendocrinology* 13:217-249.

Inagaki, S., Y. Kubota, S. Kito, K. Kangawa, et H. Matsuo. 1986a. Atrial natriuretic polypeptide-like immunoreactivity in the rat pituitary: light and electron microscope studies. *Regul Pept* 14:101-111.

Inagaki, S., Y. Kubota, S. Kito, K. Kangawa, et H. Matsuo. 1986b. Immunoreactive atrial natriuretic polypeptide in the adrenal medulla and sympathetic ganglia. *Regul Pept* 15:249-260.

Ito, H., M. Hiroe, Y. Hirata, M. Tsujino, S. Adachi, M. Suchiri, A. Koike, A. Nogami, et F. Marumo. 1993. Insulin-like growth factor-1 stimulates hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured rat cardiomyocytes. *Circulation* 87:1715-1721.

Ito, H., M. Hiroe, Y. Hirata, H. Fjjsaki, S. Adachi, H. Akimoto, Y. Ohta, et F. Marumo. 1988. Endothelin ET<sub>A</sub> receptor antagonist blocks cardiac hypertrophy provoked by hemodynamic overload. *Circulation* 89:2198-2203.

Itoh, H., R.E. Pratt, M. Ohno, et V.J. Dzau. 1992. Atrial natriuretic polypeptide as a novel antigrowth factor of endothelial cells. *Hypertension* 19:758-761.

Itoh, H., K. Nakao, T. Yamada, N. Morii, S. Shiono, A. Sagawara, Y. Saito, M. Mukoyama, H. Arai, et G. Katsura. 1987. Modulatory role of vasopressin in secretion of atrial natriuretic peptide in conscious rat. *Endocrinology* 120:2186-2188.

Iwai, N., H. Shimoike, et M. Kinoshita. 1995. Cardiac renin-angiotensin system in the hypertrophied heart. *Circulation* 92:2690-2696.

Iwami, K., N. Ashizawa, Y.S. Do, K. Graf, et W.A. Hsueh. 1996. Comparaison of Ang II with other growth factors on *Egr-1* and matrix gene expression in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol* 270:H2100-H2107.

Izumo, S., B. Nadal-Ginard, et V. Mahdavi. 1988. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:339-343.

Jahan, H., S. Koboyashi, J. Nishimura, et H. Kanaide. 1996. Endothelin-1 and angiotensin II act as progression bur not competence growth factors in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 295:261-269.

John, S.W.M., J.H. Krege, P.M. Oliver, J.R. Hagaman, J.B. Hodgins, S.C. Pang, T.G. Flynn, et O Smithies. 1995. Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension. *Science* 267:679-681.

Kaye, D., D. Pimental, S. Prasad, T. Mâki, H.-J. Berger, P.L. McNeil, R.A. Kelly, et T.W. Smith. 1996. Role of transiently altered sarcolemmal membrane permeability and bFGF release in the hypertrophic response of adult rat ventricular myocytes to increased mechanical activity *in vitro*. *J Clin Invest* 97:281-291.

Kangawa, K., Y. Tawaragi, S. Oikawa, A. Mizomu, Y. Sakuragawa, H. Nakazato, A. Fukuda, et N. Minamino. 1984. Identification of rat gamma atrial natriuretic polypeptide and characterization of the cDNA encoding its precursor. *Nature* 312:152-155.

Kardami, E., L. Liu, S. Kishore, B. Pasumarthi, B.W. Doble, P.A. Cattini. 1995. Regulation of basic fibroblast growth factor (bFGF) and bFGF receptors in the heart. *Ann N Y Acad Sci* 752:353-369.

Kardami, E., L. Liu, et B.W. Doble. 1991a. Basic fibroblast growth factor in cultured cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 638:244-255.

Kardami, E., M. Stoski, B.W. Doble, T. Yamamoto, E.L. Herzberg, et J.I. Nagy. 1991b. Biochemical et ultrastructural evidence for the associatiopn of basic fibroblast growth factor with cardiac gap junctions. *J Biol Chem* 266:19551-19558.

Kim, N.M., F.J. Villareal, M.P. Prinzt, A.A. Lee, et W.H. Dillman. 1995. Trophic effects of angiotenson II on neonatal rat cardiac myocytes are mediated by cardiac fibroblasts. *Am J Physiol* 269:E426-E437.

Klemm, S.A., T.J. Tunny, et R.D. Gordon. 1987. Atrial natriuretic peptide levels during angiotensin infusion and ondomethacin administration are consistent with angiotensin mediated regulation in man. *J Hypertens* 5:S75-S78.

Kohno, M., M. Ikeda, M. Johchi, T. Horio, K. Yasunari, N. Kurihara, et T. Takeda. Interaction of PDGF and natriuretic peptides on mesangial cell proliferaion and endothelin secretion. *Am J Physiol* 265:E673-E679.

Koibuchi, Y., W.S. Lee, G.H. Gibbons, et R.E. Pratt. 1993. Role of transformong growth factor- $\beta$ 1 in the cellular growth response to angiotensin II. *Hypertension* 21:1046-1050.

Koller, K.J., M.T. Liparis, et D.V. Goeddel. 1993. Proper glycosylation and phosphorylation of the type A natriuretic peptide receptor are required for hormone-stimulated guanylyl cyclase activity. *J Biol Chem* 268:5997-6003.

Komatsu, Y., H. Itoh, S.-I. Suga, Y. Ogawa, N. Hama, I. Kishimoto, O. Nakagawa, T. Igaki, K. Doi, T. Yoshimasa, et K. Nakao. 1996. Regulation of endothelial production of C-type natriuretic peptide in coculture with vascular smooth muscle cells: role of the vascular natriuretic peptide system in vascular growth inhibition. *Circ Res* 78:606-614.

Kovacic-Milivojevic, B., et D.G. Gardner. 1992. Divergent regulation of the human atrial natriuretic peptide gene by *c-jun* and *c-fos*. *Mol Cell Biol* 12:292-301.

Koyama, H., Y. Nishizawa, M. Honoi, S. Fukumoto, K. Kogawa, A. Shioi, et H. Morii. 1996. The fumagilin analogue TNP-470 inhibits DNA synthesis of vascular smooth muscle cells stimulated by platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-I. Possible involvement of cyclin-dependent kinase 2. *Circ Res* 79:757-764.

Kramer, R.H., et N. Marks. 1989. Identification of integrin collagen receptors on human melanoma cells. *J Biol Chem* 264:4684-4688.

Kurtz, A., R. DellaBrunna, J. Pfeilschifter, R. Taugner, et C. Bauer. 1986. Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP-mediated process. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4769-4773.

Landry, C., P. Santagata, W. Bawab, M.C. Fourniezalwski, B.P. Roques, P. Vinay, et P. Crine. 1993. Characterization of neutral endopeptidase 24.11 in dog glomeruli. *Biochem J* 291:773-779.

Languino, L.R., K.R. Gehlsen, E. Wayner, W.G. Carter, E. Engvall, et E. Ruoslahti. 1989. Endothelial cells use  $\alpha_2\beta_1$  integrin as a laminin receptor. *J Cell Biol* 109:2455-2462.

Lapointe, M.C., J. Wu, B. Greenburg, et D.G. Gardner. 1988. Upstream sequences confer atrial-specific expression on the human atrial natriuretic factor gene. *J Biol Chem* 263:9075-9078.

Laragh, J.H. 1985. Atrial natriuretic hormone, the renin-aldosterone axis, and blood pressure-electrolyte homeostasis. *N Engl J Med* 313:1330-1340.

Laurent, G.J. 1987. Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation *in vivo* and their possible role in regulation of collagen mass. *Am J Physiol* 262:H1012-H1021.

Lee, A.A., W.H. Dillmann, A.D. McCulloch, et F.J. Villareal. 1995. Angiotensin II stimulates the autocrine production of transforming growth factor- $\beta$ 1 in adult rat cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 27:2347-2357.

Leitman, D.C., F.W. Andressen, M. Catalano, S.A. Waldman, J.J. Tuan, et F. Murad. 1988. Atrial natriuretic peptide binding, cross-linking and stimulation of cyclic GMP accumulation and particulate guanylate cyclase activity in cultured cells. *J Biol Chem* 263:3720-3728.

Leitman, D.C., F.W. Andressen, T. Kuno, Y. Kamisaki, J.K. Chang, et F. Murad. 1986. Identification of multiple binding sites for atrial natriuretic factor by affinity cross-linking in cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 261:11650-11655.

Lembo, G., J.J. Hunter, et K.R. Chien. 1995. Signaling pathways for cardiac growth and hypertrophy: recent advances and prospects for growth factor therapy. *Ann N Y Acad Sci* 752:115-127.

Leveen, P., M. Pekny, S. Gebre-Medhin, B. Swolin, E. Larsson, et C. Betsholtz. 1994. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev* 8:1875-1887.

Lin, C.Q., et M.J. Bissell. 1993. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J* 7:737-743.

Lin, K.-F., J. Chao, et L. Chao. 1995. Human atrial natriuretic peptide gene delivery reduces blood pressure in hypertensive rats. *Hypertension* 26:847-853.

Lin, X., J. Hänze, F. Heese, R. Sodmann, et R.E. Lang. 1995. Gene expression of natriuretic peptide receptors in myocardial cells. *Circ Res* 77:750-758.

Lindpaintner, K., N. Neidermaier, H. Drexler, et D. Ganten. 1992. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: does the renin-angiotensin system play a role. *J Cardiovasc Pharmacol* 20: S41-S47.

Lipke, D.W., K.J. McCarthy, T.S. Elton, S.S. Arcott, S. Oparil, et J.R. Couchman. 1993. Coarctation induces alterations in basement membranes in the cardiovascular system. *Hypertension* 22:743-753.

Liu, L., B.W. Doble, et E. Kardami. 1993. Peripheral phenotype and hypothyroidism are associated with elevated levels of 21.5- to 22-kDa basic fibroblast growth factor in cardiac ventricles. *Dev Biol* 157:111-115.

Lohmann, S.M., R. Fischmeister, et U. Walter. 1991. Signal transduction by cGMP in the heart. *Basic Res Cardiol* 86:503-514.

Long, C.S., J.N. Palmer, W. Hartogensi, N. Honbo, T. Miguel, C. Grunfeld, et J.S. Karliner. 1993. Hypoxia stimulates interleukin-1 mRNA expression by cardiac myocytes in culture. *Clin Res* 41:145A.

Long, C.S., C.J. Henrich, et P.C. Simpson. 1991. A growth factor from cardiac myocytes is produced by cardiac nonmyocytes. *Cell Regul* 2:1081-1095.

Long, C.S., K. Kariya, L. Karns, et P.C. Simpson. 1990. Trophic factors for cardiac myocytes. *J Hypertens* 8:S219-S224.

Lopez, M.J., S.K.F. Wong, I. Kishimoto, S. Dubois, V. Mach, J. Freisen, D.L. Garbers, et A. Beuve. 1995. Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature* 378:65-68.

Luchner, A., T.L. Stevens, D.D. Borgeson, M.M. Redfield, J.E. Bailey, S.M. Sandberg, D.M. Heublin, et J.C. Burnett Jr. 1996. Angiotensin II in the evolution of experimental heart failure. *Hypertension* 28:472-477.

Lundgren, E., D. Gullberg, K. Rubin, T.K. Borg, M.J. Terracio, et L. Terracio. 1988. *In vitro* studies on adult cardiac myocytes: attachment and biosynthesis of collagen type IV and laminin. *J Cell Physiol* 136:43-53.

Lundgren, E., L. Terracio, S. Mardh, et T.K. Borg. 1985a. Adhesion of cardiac myocytes to extracellular matrix components. *Basic Res Cardiol* 80:69-74.

Lundgren, E., L. Terracio, S. Mardh, et T.K. Borg. 1985b . Extracellular matrix components influence the survival of adult cardiac myocytes *in vitro*. *Exp Cell Res* 158:371-381.

Maack, T. 1992. Receptors of atrial natriuretic factor. *Ann Rev Physiol* 54:11-27.

Maack, T., M. Suzuki, et F.A. Almeida, D. Nussenzweig, R.M. Scarborough, G.A. McEnroe, et J.A. Lewicki. 1987. Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* 238:675-678.

Maack, T., et H.D. Kleinert. 1986. Renal and cardiovascular effects of atrial natriuretic factor. *Biochem Pharmacol* 35:2059-2064.

Matsubara, H., M. Kanasaki, S. Muransawa, Y. Tsukaguchi, Y. Nio, et M. Inada. 1994. Differential gene expression and regulation of angiotensin II receptor subtypes in rat cardiac fibroblasts and cardiomyocytes in culture. *J Clin Invest* 93:1592-1601.

Mamuya, W.S., et P. Brecher. 1992. Fibronectin expression in the normal and hypertrophied rat heart. *J Clin Invest* 89:392-401.

Manning, P., T.D. Swartz, P. Needleman, N.C. Katsube, et S.W. Holmberg. 1985. Vasopressin-stimulated release of atriopeptin: endocrine antagonism in fluid homeostasis. *Science* 229:395-397.

Martin, E.R., J. Lewicki, R.M. Scarborough, et B.J. Ballerman. 1989. Expression and regulation of ANP receptors subtypes in rat renal glomeruli and papillae. *Am J Physiol* 257:F649-F657.

Matsubara, H., H. Hirata, S. Yoshimi, S. Takata, Y. Takagi, T. Lida, Y. Yamane, Y. Umeda, M. Mishikawa, et M. Inada. 1987. Effect of steroid and thyroid hormones on synthesis of atrial natriuretic peptide by cultured atrial myocytes of rat. *Biochem Biophys Res Comm* 145:336-343.

McGregor, A., M. Richards, E. Espiner, T. Yandle, et H. Ikram. 1990. Brain natriuretic peptide administered to man: actions and metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 70:1103-1107.

McLay, J.S., P.K. Chatterjee, A.G. Jardine, et G.M. Hawksworth. 1995. Atrial natriuretic factor stimulates nitric oxide production: an ANF-C receptor-mediated effect. *J Hypertens* 13:625-630.

Mercadier, J.J., M.A. Zongazo, C. Wisnewsky, G. Butler-Brown, D. Gros, A. Carayon, et K. Schwartz. 1989. Atrial natriuretic factor messenger ribonucleic acid peptides in the human heart during ontogenic development. *Biochem Biophys Res Comm* 159:777-782.

Meulemans, A.L., K.R. Sipido, et S.V. Sys. 1989. Atriopeptin III induces early relaxation of isolated mammalian papillary muscle. *Circ Res* 62:1171-1174.

Meyer-Lehnert, H., C. Carameto, P. Tsai, et R.W. Schrier. 1988. Interaction of atriopeptin III and vasopressin on calcium kinetics and contraction of aortic smooth muscle cells. *J Clin Invest* 82:1407-1414.

Michener, M.L., J.K. Gierse, R. Seetharama, K.F. Fock, P.O. Olins, M.S. Mai, et P. Needleman. 1986. Proteolytic processing of atriopeptin prohormone. *Mol pharmacol* 30:552-557.

Miyata, M., K. Kangawa, T. Tshimori, T. Hatoh, et H. Matsuo. Molecular forms of atrial natriuretic polypeptides in mammalian tissues and plasma. *Biochem Biophys Res Comm* 129:248-255.



Mizelle, H.L., C.A. Gaillard, R.D. Manning, et J.E. Hall. 1992. Mechanism of decreased cardiac output during ANP infusion in conscious anephric dogs *Am J Physiol* 262:R120-R125.

Morishita, R., G.H. Gbbons, R.E. Pratt, N. Tomita, Y. Kaneda, T. Ogihara, et V.J. Dzau. 1994. Autocrine and paracrine effects of atrial natriuretic peptide gene transfer on vascular smooth muscle and endothelial cellular growth. *J Clin Invest* 94:824-829.

Nakagawa, O., Y. Ogawa, H. Itoh, S.-I. Suga, Y. Komatsu, I. Kishimoto, K. Nishino, T. Toshimasa, et K. Nakao. 1995. Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of brain natriuretic peptide in cardiocyte hypertrophy: evidence for brain natriuretic peptide as an "emergency" cardiac hormone against ventricular overload. *J Clin Invest* 96:1280-1287.

Nakamura, S., M. Naruse, K. Naruse, M. Kawana, T. Nishikawa, S. Hosoda, I. Tanaka, T. Yoshimi, I. Yoshihara, T. Inagami, H. Vemura, et H. Demura. 1991. Atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide coexist in the secretory granules of human cardiac myocytes. *Am J Hypertens* 4:909-912.

Nakayama, K., H. Ohnkudo, T. Hirose, S. Inayama, et S. Nakanishi. 1984. mRNA sequence for human cardiolatin-atrial natriuretic factor precursor and regulation of precursor mRNA in rat atria. *Nature* 310:699-701.

Naruse, M., K. Obana, K. Naruse, H. Yamaguchi, et H. Demura. 1987. Atrial natriuretic peptide inhibits cortisol secretion as well as aldosterone secretion *in vitro* from human adrenal tissue. *J Clin Endocr Metab* 64:10-16.

Needleman, P., E.H. Blaine, J.E. Greenwold, M.L. Michener, C.B. Saper, et P.T. Stockman. 1989. The biochemical pharmacology of atrial peptides. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 29:23-54.

Needleman, P., et J.E. Greenwold. 1986. Atriopeptin: a cardiac hormone intimately involved in fluid, electrolyte and blood pressure homeostasis. *N Engl J Med* 314:828-834.

Nemer, M., J.P. Lavigne, J. Drouin, G. Thibault, M. Gannon, et T. Ankaly. 1986. expression of atrial natriuretic factor gene in heart ventricular tissue. *Peptides* 7:1147-1152.

Nemer, M., M. Chamberland, D. Sirois, S. Argentin. J. Drouin, R.A.F. Dixon, E. Zivin, et J.H. Cardra. 1984. Gene structure of human cardiac hormone precursor, proatriodilatin. *Nature* 312:645-656.

Neyses, L., J. Nuskas, J. Luyken, S. Fronhoffs, S. Oberdorf, U. Pfeifer, R. Sanders Williams, V. P. Sukhatme, et H. Vetter. 1993. Induction of early immediate genes by angiotensin II and endothelin-1 in adult rat cardiomyocytes. *J Hypertens* 11:927-934.

Neyses, L., et H. Vetter. 1989. Action of atrial natriuretic peptide and angiotensin II on the myocardium: studies in isolated rat ventricular cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 163:1435-1443.

Nonoguchi, H., J.M. Sands, et M.A. Knepper. 1988. Atrial natriuretic factor inhibits vasopressin-stimulated osmotic water permeability in rat inner medullary collecting duct. *J Clin Invest* 82:1383-1390.

Nunez, D.J.R., M.C. Dickson, et M.J. Brown. 1992. Natriuretic peptide receptor messenger RNAs in the rat and human heart. *J Clin Invest* 90:1966-1971.

Nussenzweig, D.R., J.A. Lewicki, et T. Maack. 1990. Cellular mechanisms of the clearance function of type-C receptors of atrial natriuretic factor. *J Biol Chem* 265:20952-20958.

Ogawa, T., K. Nakao, M. Mukoyama, K. Hosoda, G. Shirakami, H. Arai, Y. Saito, S. Suga, M. Jougasaki, et H. Imura. 1991. Natriuretic peptides as cardiac hormones in normotensive and spontaneously hypertensive rats: the ventricle is a major site of synthesis and secretion of brain natriuretic peptide. *Circ Res* 69:491-500.

Ogawa, T., W. Linz, M. Stevenson, B.G. Bruneau, M.L. Kuroski de Bold, J.H. Chen, H. Eid, B.A. Schölkens, et A. de Bold. 1996. Evidence for load-dependant and load-independent determinants of cardiac natriuretic peptide production. *Circulation* 93:2059-2067.

Oikawa, S., M. Imai, A. Ueno, S. Tanaka, T. Noguchi., H. Nakazato, K. Kanagawa, A. Fukuda, et H. Matsuo. 1984. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for human atrial natriuretic polypeptide. *Nature* 309:724-726.

Olins, G.M., D.R. Patton, R.B. Bovy, et P.P. Mehta. 1988. A linear analog of ANP discriminates guanylate cyclase-coupled ANP receptors from non-coupled receptors. *J Biol Chem* 263:10989-10993.

Olins, G.M., K.L. Spear, N.R. Siegel, E.J. Reinhard, et Z. Neely. 1987. Atrial peptide inactivation by rabbit-kidney brush-border membranes. *Eur J Biochem* 170:431-434.

Or, K., A.M. Richards, E.A. Espiner, T. Yandle, N. Gilchrist, et R. Sainsbury. 1993. Effect of low dose infusions of ile-atrial natriuretic peptide in healthy elderly males: evidence for a postreceptor defect. *J Clin Endocrinol Metab* 76:1271-1274.

Padua, R.R., R. Sethi, N.S. Dhalla, et E. Kardami. 1993. Hearts supplemented with basic fibroblast growth factor display increased recovery from ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 7:A122.

Padua, R.R., et E. Kardami. 1993. Increased basic fibroblast growth factor (bFGF) accumulation and distinct patterns of localization in isoproterenol-induced cardiomyocyte injury. *Growth Factors* 8:291-306.

Parker, T.G., S.E. Packer, et M.D. Schneider. 1990. Peptide growth factors can provoke "fetal" contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes. *J Clin invest* 85:507-514.

Parkes, D.G., J.P. Coghlan, J.G. McDougall, B.A. Scoggins. 1988. Long-term hemodynamic actions of atrial natriuretic factor (99-126) in conscious sheep. *Am J Physiol* 254:H811-H815.

Pelouch, V., I.M.C. Dixon, L. Golman, R.E. Beamish, et N.S. Dhalla. 1993. Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Mol Cell Biochem* 129:101-120.

Pennica, D., K.L. King, K.J. Shaw, E. Luis, J. Rullamas, S.-M. Luoh, W.C. Darbonne, D.S. Knutzon, R. Yen, K.R. Chien, J.F. Baker, et W.I. Wood. 1995. Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1142-1146.

Peterson, T.V., et B.A. Benjamin. 1992. The heart and control of renal excretion: neural and endocrine mechanisms. *FASEB J* 6:2923-2932.

Pfeiffer, J.M., M.A. Pfeiffer, P.J. Fletcher, et E. Braunwald. 1991. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol* 260:H1406-H1414

Pfeiffer, M.A., E. Braunwald, L. A. Moyne, L. Basta, E.J. Brown Jr., T.E. Cuddy, B.R. David, E.M. Geltman, S. Goldman, G.C. Flaker, M. Klein, G.A. Lamas, M. Parker, J. Rouleau, J.L. Rouleau, J. rutherford, J.H. Wertheimer, et C.M. Hawkins. 1992. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction-results of the survival and ventricular enlargement trial . The SAVE Investigators. *N Engl J Med* 327:669-677.

Porter, J.G., R.M. Scarborough, Y. Wang, G. Schenk, G.A. McEnroe, L.L. Kang, et J.A. Lewicki. 1989. Recombinant expression of a secreted form of the atrial natriuretic peptide clearance receptor. *J Biol Chem* 264:14179-14184.

Potter, L.R., et D.L. Garbers. 1994. Protein kinase C-dependant desensitization of the atrial natriuretic peptide receptors is mediated by dephosphorylation. *J Biol Chem* 269:14636-14642.

Price, R.L., M. Nakagawa, L. Terracio, et T.K. Borg. 1992. Ultrastructural localization of laminin on *in vivo* embryonic, neonatal, and adult rat cardiac myocytes and in early rat embryos raised in whole-embryo culture. *J Histochem Cytochem* 40:1373-1381.

Racz, K., O. Kuchel, M. Cantin, et A deLean. 1985. Atrial natriuretic factor inhibits the early pathway of steroid biosynthesis in bivariate adrenal cortex. *FEBS Lett* 192:19-22.

Raeymakers, L., F. Hoffman, et R. Castels. 1988. Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle. *Biochem J* 252:269-273.

Rapoport, R.M. 1986. cGMP inhibition of contraction may be mediated through inhibition of phosphatidyl inositol hydrolysis. *Circ Res* 58:407-410.

Richards, A.M., E.A. Espiner, H. Ikram, et T.G. Yandle. 1989. Atrial natriuretic factor in hypertension: bioactivity at normal plasma levels. *Hypertension* 14:261-268.

Ritter, D., J. Chao, P. Needleman, E. Tetens, et J.E. Greenwold. 1992. Localization, synthetic regulation, and biology of renal atriopeptin-like prohormone. *Am J Physiol* 263:F503-F509.

Ritzenthaler, J.D., R.H. Goldstein, A. Fine, et B.D. Smith. 1993. Regulation of  $\alpha 1(1)$  collagen promoter via a TGF $\beta$  activation element. *J Biol Chem* 268:13625-13631.

Roberts, A.B., N.S. Roche, T.S. Winokur, J.K. Burmestler, et M. B. Sporn. 1992. Role of TGF-beta in maintenance of function of cultures cardiac myocytes: autocrine action and reversal of damaging effects of interleukin-1. *J Clin Invest* 90 2056-2062.

Robinson, T.F., S.M. Factor, J.M. Capasso, B.A. Whittenberg, O.O. Blumenfeld, et S. Seifter. 1987. Morphology, composition, and

function of struts between cardiac myocytes of rat and hamster. *Cell Tissue Res* 249:247-255.

Rodeheffer, R.J., M. Naruse, J.B. Atkinson, K. Naruse, J.C. Burnett, et W.H. Merriol. 1993. Molecular forms of atrial natriuretic factor in normal and failing human myocardium. *Circulation* 88:364-371.

Roques, B.P., F. Noble, V. Dauge, M.C. Fourniezaluski, et A. Beaumont. 1993. Neutral endopeptidase 24.11-structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* 45:87-146.

Rosenzweig, A., et C.E. Seidman. 1991. Atrial natriuretic factor and related peptide hormones. *Ann Rev Biochem* 60:229-255.

Rosenzweig, A. T.D. Halazonetis, J.G. Seidman, et C.E. Seidman. 1991. Proximal regulatory domains of rat atrial natriuretic factor gene. *Circulation* 84:1256-1265.

Ruoslahti, E., et M.D. Pierschbacher. 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238:491-497.

Ruskoaho, H. 1992. Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism. *Pharmacol Rev* 44:479-602.

Sadoshima, J., et S. Izumo. 1993. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy and hyperplasia of cardiac fibroblasts: critical role of the AT<sub>1</sub> receptor subtype. *Circ Res* 73:413-423.

Sadoshima, J., Y. Xu, H.S. Slater, et S. Izumo. 1993. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes *in vitro*. *Cell* 75:977-984.

Sadoshima, J., Z. Qiu, J.P. Morgan, et S. Izumo. 1995. Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes: the critical role of Ca<sup>2+</sup>-dependent signaling. *Circ Res* 76:1-15.

Scarborough, R.M., G.A. McEnroe, A. Arfsten, L.L. Kang, K. Schwartz, et J.A. Lewicki. 1988. D-amino acid-substituted atrial natriuretic peptide analogs reveal novel receptor recognition requirements. *J Biol Chem* 263:16818-16822.

Scarborough, R.M., D.B. Schenk, G.A. McEnroe, A. Arfsten, L.L. Kang, K. Schwartz, et J.A. Lewicki. 1986. Truncated atrial natriuretic peptide analogs. Comparaison between receptor binding and stimulation of cyclic GMP accumulation in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 261:12960-12964.

Schaper, J., et B. Speiser. 1992. The extracellular matrix in the failing human heart. *Bas Res Cardiol* 87: 303-309.

Schattemann G.C., C. Loushin, T. Li, et C.E. Hart. 1996. PDGF-A is required for normal murine cardiovascular development. *Dev Biol* 176:133-142.

Schenk, D.B., L.K. Johnson, K. Schwartz, H. Sista, R.M. Scarborough, et J.A. Lewicki. 1985. Distinct atrial natriuretic factor receptor sites on cultured bovine aortic smooth muscle and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 127:433-442.

Schorb, W., T. C. Peeler, N.N. Madigan, K.M. Conrad, et K.M. Baker. 1994. Angiotensin II-induced protein tyrosine phosphorylation in neonatal rat cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* 269: 19626-19632.

Schorb, W., G.W. Booz, D.E. Dostal, K.M. Conrad, K.C. Chang, et K.M. Baker. 1993. Angiotensin II is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts. *Circ Res* 72:1245-1254.

Schwarzbauer, J.E., J.W. Tamkum, I.R. Lemischka, et R.O. Hynes. 1983. Three different fibronectin mRNAs arise by alternative splicing within the coding region. *Cell* 35:421-431.

Schwartz, D., D.M. Geller, P.T. Manning, N.R. Siegel, et K.F. Fok. 1985. Ser-Leu-Arg-Arg-atriopeptin III: the major circulating form of atrial natriuretic peptides *Science* 229:397-400.

Sei, C.A., G.L. Hand, S.F. Murray, et C.C. Glembotski. 1992. The cosecretional maturation of atrial natriuretic factor by primary atrial myocytes. *Mol Endocrinol* 6:309-319.

Shah, A.M., H.A. Spurgeon, S.J. Sollott, A.Talo, et E.G. Lakatta. 1994. 8-Br-cGMP reduces the myofilament response to  $Ca^{2+}$  in intact cardiac myocytes. *Circ Res* 74:970-978.

Sharma, H.S., H.A.A. van Heugten, M.A. Goedbloed, P.D. Vendouw, et J.M.J. Lamers. 1994. Angiotensin II-induced expression of transforming factors precedes increase in transforming growth factor- $\beta$ 1 mRNA in neonatal cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Comm* 205:105-112.

Shields, P.P., et C.C. Glembotski. 1989. Regulation of atrial natriuretic factor-(99-126) secretion from neonatal rat primary atrial cultures by activators of protein kinases A and C. *J Biol Chem* 264:9322-9328.

Sigel, A.V., M. Centrella, et M. Eghbali-Webb. 1996. Regulation of proliferative response of cardiac fibroblasts by transforming growth factor- $\beta$ 1. *J Mol Cell Cardiol* 28:1921-1929.

Simm, A., M. Nestler, et V. Hoppe. 1997. PDGF-AA, a potent mitogen for cardiac fibroblasts from adult rats. *J Mol Cell Cardiol* 29:357-368.

Slack, J.L., D.J. Liska, et P. Bornstein. 1993. Regulation of expression of type I collagen genes. *Am J Med Genet* 45:140-151.

Sonnenberg, A., P.W. Modderman, et F. Hogervorst. 1988. Laminin receptor on platelets is the integrin VLA-6. *Nature* 336:487-489.

Speir, E., A.M. Tanner, J.F. Gonzalez, A. Baird, et W. Casscells. 1992. Acidic and basic fibroblast growth factors in adult rat heart myocytes. Localization, regulation in culture, and effects on DNA synthesis. *Circ Res* 71:251-259.

Standaert, D.G., D.F. Cecetto, et P. Needleman. 1987. Inhibition of the firing of vasopressin neurons by atriopeptin. *Nature* 329: 151-153.



Stephenson, S.L., et A.J. Kenny. 1987. The hydrolysis of  $\alpha$ -human atrial natriuretic peptide by pig kidney microvillar membranes is initiated by endopeptidase-24.11. *Biochem J* 243:183-187.

Sudoh, T., N. Minamino, K. Kangawa, et H. Matsuo. 1990. CNP: a new member of the natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Comm* 168:863-870.

Sudoh, T., N. Minamino, K. Kangawa, et H. Matsuo. 1988a. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 332:78-81.

Sudoh, T., N. Minamino, K. Kangawa, et H. Matsuo. 1988b. BNP-32 N-terminal six amino acid extended from BNP identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Comm* 155:726-732.

Suga, S., K. Nakao, H. Itoh, Y. Komatsu, Y. Ogawa, et N. Hama. 1992. Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor  $\beta$ . Possible existence of vascular natriuretic peptide system. *J Clin Invest* 90:1145-1149.

Sugawara, A, K. Nakao, N. Morii, T. Yamada, H. Itoh, S. Shiono, Y. Saito, M. Mukoyama, H. Arai, K. Nishimura, K. Obata, H. Yasue, T. Ban, et H. Imura. 1988. Synthesis of atrial natriuretic polypeptide in human failing hearts. Evidence for altered processing of atrial natriuretic polypeptide precursor and augmented synthesis of  $\beta$ -human ANP. *J Clin Invest* 81:1962-1970.

Sugimoto, T., M. Haneda, M. Togawa, M. Isono, T. Shikano, S.-I. Araki, T. Nakasawa, A. Kashiwagi, K.-L. Guan, et R. Kikkawa. 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.

Sun, Y., et K.T. Weber. 1996. Angiotensin converting enzyme and myofibroblasts during tissue repair in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 28:851-858.

Suzuki, T., H. Hoshi, Y. Mitsui. 1990. Endothelin stimulates hypertrophy and contractility of neonatal cardiac myocytes in a serum-free medium. *FEBS Lett* 268:149-151.

Takada Y., M.J. Elices, C. Crouse, et M.E. Hemler. 1989. The primary structure of the  $\alpha_4$  subunit of VLA-4: homology to other integrins and a possible cell-cell adhesion function. *EMBO J* 8:1361-1368.

Takada, Y., C. Huang, et M.E. Hemler. 1987. Fibronectin receptor structure in the VLA family of heterodimers. *Nature* 326:607-609.

Takada, Y., J.L. Strominger, et M.E. Hemler. 1987. The very late antigen family of heterodimers is part of a superfamily of molecules involved in adhesion and embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:3239-3243.

Takahashi, N., A. Calderone, N.J. Izzo Jr., T.M. Mäki, J.D. Marsh, et W.S. Colucci. 1994. Hypertrophic stimuli induce transforming growth factor- $\beta_1$  expression in rat ventricular myocytes. *J Clin Invest* 94:1470-1476.

Tallerico-Melnyk, T., C.C. Yip, et V.M. Watt. 1992. Widespread colocalization of messenger RNAs encoding the guanylate cyclase-coupled natriuretic peptide receptors in the rat and human tissue. *Biochem Biophys Res Comm* 189:610-616.

Tamburini, P.P., J.A. Koehn, J.P. Gilligan, D. Charles, R.A. Palmesino, R. Sharif, C. McMartin, M.D. Erion, et J.M. Miller. 1989. Rat vascular tissue contains a neutral endopeptidase capable of degrading atrial natriuretic peptide. *J Pharmacol Exp Ther* 251:956-961.

Tan P.B., J.E. Jalil, R. Prick, J.S. Janicki, et K.T. Weber. 1991. Cardiac myocytes necrosis induced by angiotensin II. *Circ Res* 69:1185-1195.

Terracio, L. K. Rubin, D. Gullberg, E. Balog, W. Carver, R. Jyring, et T.K. Borg. 1991. Expression of collagen binding integrins during cardiac development and hypertrophy. *Circ Res* 68:734-744.

Terracio, L., et T.K. Borg. 1988. Factors affecting cardiac cell shape. *Heart Failure* 4:354-371.

Thaik, C.M., A. Calderone, N. Takahashi, et W.S. Colucci. 1995. Interleukin-1 $\beta$  modulates the growth and phenotype of neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* 96:1093-1099.

Thibault, G., K.L. Grove, et C.F. Deschepper. 1995. Reduced affinity of iodinated forms of Tyr<sup>0</sup> C-type natriuretic peptide for rat natriuretic peptide receptor B. *Mol Pharmacol* 48:1046-1053.

Thibault, G., A.F. Doubell, R. Garcia, R. Larivière, et E.L. Schiffrin. 1994. Endothelin-stimulated secretion of natriuretic peptides by rat atrial myocytes is mediated by endothelin A receptors. *Circ Res* 74:460-470.

Thibault, G., C. Charbonneau, J. Bilodeau, E.L. Schiffrin, et R. Garcia. 1992. Rat brain natriuretic peptide is localized in atrial granules and released into the circulation. *Am J Physiol* 263:R301-R309.

Thibault, G., K.K. Murphy, J. Gutkowska, N.G. Seidah, C. Lazure, M. Chrétien, et M. Cantin. 1988. NH<sub>2</sub>-terminal fragment of rat pro-atrial natriuretic factor in the circulation: identification, radioimmunoassay and half-life. *Peptides* 9:47-53.

Thibault, G., R. Garcia, J. Gutkowska, J. Bilodeau, C. Lazure, N.G. Seidah, M. Chrétien, J. Genest, et M. Cantin. 1987. The propeptide Asn1-Tyr26 is the storage form of rat atrial natriuretic factor. *Biochem J* 241:265-272.

Thibault, G., R. Garcia, J. Gutkowska, C. Lazure, N.G. Seidah, M. Chrétien, J. Genest, et M. Cantin. 1986. Identification of the released form of atrial natriuretic factor by the perfused rat heart. *Proc Soc Exp Biol Med* 182:137-141.

Thibault, G., C. Lazure, E. L. Schiffrin, J. Gutkowska, L. Chantier, R. Garcia, N.G. Seidah, M. Chrétien, J. Genest, et M. Cantin. 1985.

Identification of a biologically active circulating form of rat atrial natriuretic factor. *Biochem Biophys Res Comm* 130:977-986.

Thompson, N. L., F. Bazoberry, E.H. Speir, W. Casscells, V.J. Ferrans, K.C. Fernanders, P. Kondaiah, A.G. Geiser, et M.B. Sporn. 1988. Transforming growth factor beta-1 in acute myocardial infarction in rats. *Growth Factors* 1:91-99.

Tsuzuki, S., T. Matoba, S. Eguchi, et T. Inagami. Angiotensin II type-2 receptor inhibits cell proliferation and activates tyrosine phosphatase. *Hypertension* 28:916-918.

Tyagi, S.C., S.G. Kumar, J. Banks, et W. Fortson. 1995a. Co-expression of tissue inhibitor and matrix metalloproteinase in myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 27:2177-2189.

Tyagi, S.C., S.G. Kumar, J. Banks, et G. Glover. 1995b. Induction of tissue inhibitor and matrix metalloproteinase by serum in human heart-derived fibroblast and endomyocardial endothelial cells. *J Cell Biochem* 58:360-371.

Villareal, F.J., et W.H. Dillmann. 1992. Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF- $\beta_1$ , fibronectin, and collagen. *Am J Physiol* 262:H1861-H1866.

Villareal, F.J., N.N. Kim, G.D. Ungab, M.P. Prinzt, et W.H. Dillmann. 1993. Identification of functional angiotensin II receptors on rat cardiac fibroblasts. *Circulation* 88:2849-2861.

Vollmar, A.M., K.-N. Schmidt, et R. Schulz. 1996. Natriuretic peptide receptors on rat thymocytes: inhibition of proliferation by atrial natriuretic peptide. *Endocrinology* 137:1706-1713.

Wayner, E.A., et W.G. Carter. 1987. Identification of multiple cell adhesion receptors for collagen and fibronectin in human fibrosarcoma cells possessing unique  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. *J Cell Biol* 105:1873-1884.

Weber, D.R., E.D. Stroud, et S.M. Prescott. 1989. Arachidonate metabolism in cultured fibroblasts derived from normal and infarcted canine heart. *Circ Res* 65:671-683.

Weber, K.T., Y. Sun, L.C. Katwa, J.P. Cleutjens, et G. Zhou. 1995. Connective tissue and repair in the heart: potential regulatory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 752:286-299.

Weber, K.T., Y. Sun, S.C. Tyagi, et J.P. Cleutjens. 1994. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling, and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* 26:279-292.

Weber, K.T., et C.G. Brilla. 1991. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. *Circulation* 83:1849-1865.

Weber, K.T. 1989. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol* 13:1637-1652

Wei, C., L.L. Aarhus, V.M. Miller, et J.C. Burnett. 1993. Action of C-type natriuretic peptide in isolated canine arteries and veins. *Am J Physiol* 264:H71-H73.

Weiner, HL, et J.L. Swan. 1989. Acidic fibroblast growth factor is expressed by cardiac myocytes in culture and the protein is localized to the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2683-2687.

Westenfelder, C., et R.L. Baranowski. 1987. Angiotensin II is a potent secretagogue of atrial natriuretic peptide in nephrectomized rats. *Kidney Intern* 31:292. (Résumé).

Wilcox, J.N., A. Augustine, D.V. Goeddel, et D.G. Lowe. Differential regional expression of three natriuretic peptide genes within primate tissues. *Mol Cell Biol* 11:2454-2462.

Winston, J., F. Dong, et W.J. Pledger. 1996. Differential modulation of G<sub>1</sub> cyclins and the Cdk inhibitor p27<sup>kip1</sup> by platelet-derived growth factor and plasma factors in density-arrested fibroblasts. *J Biol Chem* 271:11253-11260.

Wypij, D.M., et R.B. Harris. 1992. Characterization of homogenous atrial granule serine proteinase, a candidate processing enzyme of pro-atrial natriuretic factor. *Life Sci* 50:523-531.

Yamada, T., M. Horiuchi, et V.J. Dzau. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:156-160.

Yamamoto, A., T. Shoji, T. Tamaki, K. Fukui, H. Iwao. et Y. Abe. 1988. Effects of calcium and ouabain on the release of atrial natriuretic factor. *J Hypertens* 6:S317-S319.

Yandle, T.G. 1994. Minisymposium : The natriuretic peptide hormones. Biochemistry of natriuretic peptides. *J Intern Med* 235:561-576.

Yandle, T.G., S. Fisher, E.A. Espiner, et A.M. Richards. 1993. The ovine hypothalamus and pituitary have markedly different distributions of C-type natriuretic peptide forms. *Peptides* 14:713-716.

Yandle, T.G., M.A. Fitzpatrick, E.A. Espiner, M. Richards, S. Fisher, et A. Carne. 1991. Ovine atrial natriuretic factor: sequence of circulating forms and metabolim in plasma. *Peptides* 12:279-283.

Yandle, T.G., E.A. Espiner, M.G. Nicholls, et H. Duff. 1986. Radioimmunoassay and characterization of atrial natriuretic peptide in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 63:72-79.

Yokota, N., B.G. Bruneau, B.E. Fernandez, M.L. Muroski-de Bold, L.A. Piazza, H. Eid, et A.J. de Bold. Dissociation of cardiac hypertrophy, myosin heavy chain isoforms expression, and natriuretic peptide production in DOCA-salt rats. *Am J Hypertens* 8:301-310.

Younes, A., M.O. Boluyt, L. O'Neil, A.L. Meredith, M.T. Crow, et E.G. Lakatta. 1995. Age-increase in rat ventricular ANP gene expression corrolates with cardiac hypertrophy. *Am J Physiol* 269:H1003-H1008.

Yu, S.-M., L.-M. Hung, et C.-C. Lin. 1997. cGMP-elevating agents suppress proliferation of vascular smooth muscle cells by inhibiting the

activation of epidermal growth factor signaling pathway. *Circulation* 95:1269-1277.

Zak, R. 1973. Cell proliferation during cardiac growth. *Am J Cardiol* 31:211-219.

Zhou, G., S.C. Tyagi, et K.T. Weber. 1993. Bradykinin regulates collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Clin Res* 41:630A. (Résumé).