

Université de Montréal

**Régulation du cycle cellulaire par le récepteur natriurétique de type C dans les
cellules du muscle lisse vasculaire : mécanismes moléculaires**

Par

Jasmine El Andaloussi

Département de physiologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures

en vue d'obtention du grade de

Maîtrise ès Sciences (M.Sc.)

mai 2010

© Jasmine El Andaloussi, 2010 Université de Montréal

Université de Montréal

Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Régulation du cycle cellulaire par le récepteur natriurétique de type C dans les
cellules du muscle lisse vasculaire : mécanismes moléculaires**

Présenté par

Jasmine El Andaloussi

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Vincent Castellucci (président-rapporteur)

Dr Madhu B. Anand-Srivastava (directrice de recherche)

Dr Suhayla Mukaddam-Daher (membre du jury)

Résumé

Nous avons précédemment montré que l'activation du récepteur natriurétique de type C (NPR-C) par son agoniste spécifique, le C-ANP₄₋₂₃, atténue l'augmentation de la prolifération des cellules du muscle lisse vasculaire (CMLV) induite par les peptides vasoactifs (Ang II, ET-1 et l'AVP). Puisque les CMLV provenant de rats spontanément hypertendus (SHR) montrent elles aussi un taux de prolifération plus élevé que leur contrôle, les CMLV de rats Wistar-Kyoto (WKY), nous avons entrepris cette étude dans le but de déterminer si C-ANP₄₋₂₃ peut également diminuer le taux élevé de prolifération des CMLV de SHR et, le cas échéant déterminer les mécanismes responsables de cette réponse. Nos résultats montrent que le taux de prolifération des CMLV de SHR est significativement plus élevé que celui des CMLV de WKY et que la présence de C-ANP₄₋₂₃ diminue de manière-dose dépendante le taux de prolifération des CMLV de SHR. En plus, l'expression des protéines de la phase G1 du cycle cellulaire, la cycline D1, la kinase dépendante des cyclines 2 (cdk2) et la forme phosphorylée de la protéine du rétinoblastome (pRb) est augmentée dans les CMLV de SHR comparativement aux CMLV de WKY et est atténué par C-ANP₄₋₂₃. De plus, nos résultats montrent que les inhibiteurs du complexe cycline D1/cdk4 (NSC 625987) et cdk2 (NU2058) diminuent le taux de prolifération élevé des CMLV de SHR. Les CMLV de SHR montrent également un taux de phosphorylation de ERK1/2 et d'AKT et est atténué par C-ANP₄₋₂₃. De plus, le taux d'expression élevé des protéines cycline D1, cdk2 et pRb des CMLV de SHR est diminué par la toxine pertussis qui inactive la protéine G α , le PD 98095, un inhibiteur de MEK de la voie des MAPK, du wortmannin, un inhibiteur de la PI3-K et finalement du losartan, un antagoniste du récepteur AT1. Ces résultats suggèrent que l'activation du récepteur NPR-C par C-ANP₄₋₂₃ diminue le taux de prolifération élevé des CMLV de SHR par une régulation à la baisse des composantes du cycle cellulaire via l'inhibition de la protéine G α et des voies signalétique MAP kinase/PI3-K.

Mots clés: hypertension, SHR, NPR-C, cycle cellulaire, Gi, AKT, MAPK, PI3-K

Abstract

We have previously shown that natriuretic peptide receptor-C (NPR-C) activation by C-ANP₄₋₂₃ decreased the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) induced by vasoactive peptides (Ang II, ET-1 and AVP). Since, VSMC from SHR also exhibit an enhanced proliferation as compared to VSMC from WKY, we undertook the present study to investigate if C-ANP₄₋₂₃ could also attenuate the enhanced proliferation of VSMC from SHR and to further explore the underlying mechanisms responsible for this response. The proliferation of VSMC from SHR was significantly increased as compared to VSMC from WKY as determined by [³H]thymidine incorporation and was attenuated by C-ANP₄₋₂₃ in a concentration-dependent manner. Furthermore the expression of cyclin D1, cyclin-dependent kinase 2 (cdk2) and phosphorylated retinoblastoma protein (pRb) was enhanced in VSMC from SHR compared to WKY which was attenuated by C-ANP₄₋₂₃. In addition, the inhibitor of cdk4/cyclinD1 (NSC 625987) and cdk2 (NU2058) also attenuated the enhanced proliferation of VSMC from SHR in a concentration-dependent manner. VSMC from SHR also exhibited the enhanced phosphorylation of ERK1/2 and AKT as compared to WKY which was attenuated by C-ANP₄₋₂₃. Furthermore, the enhanced expression of cyclin D1, cdk2 and pRb in VSMC from SHR were also attenuated by pertussis toxin that inactivates G α protein, PD 98095, a MEK kinase inhibitor, wortmannin, PI3K inhibitor as well as by losartan, an AT1 receptor antagonist. These results suggest that NPR-C activation attenuates the enhanced proliferation of VSMC from SHR which may be attributed to G α /MAP kinase/PI3K-mediated inhibition of the expression of cell cycle components.

Key words: hypertension, SHR, NPR-C, cell cycle, Gi, AKT, MAPK, PI3-K

Table des matières

| | |
|--|----|
| 1. Le système cardiovasculaire..... | 2 |
| 1.1 La pression artérielle..... | 2 |
| 1.1.1 Régulation de la pression artérielle..... | 2 |
| 1.1.1.1 Mécanismes de régulation à court terme..... | 3 |
| 1.1.1.1.1 Mécanismes nerveux..... | 3 |
| 1.1.1.1.2 Mécanismes chimiques..... | 5 |
| 1.1.2 Mécanismes de régulation à long terme..... | 5 |
| 1.1.3 Structure vasculaire..... | 6 |
| 1.2 Les artères de résistance..... | 8 |
| 1.3 Remodelage vasculaire..... | 8 |
| 2. L'hypertension..... | 9 |
| 2.1 Facteurs de risques..... | 9 |
| 2.2 Conséquences de l'hypertension..... | 10 |
| 2.3 Traitement de l'hypertension..... | 10 |
| 2.4 Les rats SHR : un modèle d'hypertension..... | 11 |
| 2.5 Hyperplasie des cellules du muscle lisse vasculaire..... | 11 |
| 3 Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypertension..... | 12 |
| 3.1 Récepteurs couplés aux protéines G..... | 12 |
| 3.1.1 Les protéines G..... | 12 |
| 3.1.2 La protéine Gi..... | 13 |
| 3.2 L'angiotensine II | 14 |
| 3.2.1 Récepteurs à l'angiotensine II | 14 |
| 3.2.2 Signalisation du récepteur AT ₁ à l'angiotensine II | 15 |
| 3.3 Voie signalétique de la phospholipase C..... | 16 |
| 3.4 Voie des MAP kinases..... | 16 |
| 3.5 La voie de la Phosphoinositide 3-kinase..... | 18 |
| 3.6 La voie d'AKT..... | 18 |
| 4 Les peptides natriurétiques..... | 19 |
| 4.1 Les récepteurs aux facteurs natriurétiques..... | 20 |

| | |
|--|----|
| 5 Le récepteur natriurétique de type C (NPR-C)..... | 21 |
| 5.1 Distribution du récepteur NPR-C..... | 22 |
| 5.2 Signalisation du récepteur NPR-C..... | 23 |
| 5.3 Rôle physiologique du récepteur NPR-C | 25 |
| 5.4 Régulation du récepteur NPR-C en condition pathologique..... | 26 |
| 5.5 Le récepteur NPR-C et le remodelage vasculaire..... | 27 |
| 6 Le cycle cellulaire..... | 29 |
| 6.1 Les protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire..... | 30 |
| 6.2 Entrée en G ₁ | 31 |
| 6.3 Transition G ₁ -S..... | 31 |
| 6.4 Progression du cycle cellulaire..... | 33 |
| 6.5 Les voies signalétiques qui contrôlent le cycle cellulaire..... | 33 |
| 6.6 Contrôle du cycle cellulaire et Hypertension..... | 35 |
| 7. Hypothèse et Objectifs..... | 37 |
| chapitre 2- Article scientifique..... | 39 |
| chapitre 3-Discussion et conclusion..... | 58 |
| 8. Discussion..... | 59 |
| 9. Conclusions..... | 63 |
| 10. Perspectives..... | 64 |
| 11. Bibliographie | 66 |

LISTES DES FIGURES

Chapitre 1

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Structure d'une artère..... | 7 |
| Figure 2 : Schéma intégratif des voies de signalisation de l'Angiotensine II..... | 17 |
| Figure 3 : Structures des récepteurs natriurétiques..... | 21 |
| Figure 4 : Signalisation du récepteur NPR-C..... | 25 |
| Figure 5 : Les phases du cycle cellulaire et les complexes qui les régulent..... | 30 |
| Figure 6 : Transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire..... | 32 |
| Figure 7 : Schéma illustratif des objectifs..... | 38 |

Chapitre 2

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Effect of C-ANP ₄₋₂₃ on SHR VSMC proliferation..... | 49 |
| Figure 2 : Effect of 10 ⁻⁷ M of C-ANP ₄₋₂₃ on cell cycle components expression..... | 50 |
| Figure 3 : Effect of NSC 625987 and NU2058 on the enhanced proliferation of SHR VSMC proliferation..... | 51 |
| Figure 4 : Effect of pertussis toxin on expression of cell cycle components from G1-phase in VSMC from SHR..... | 52 |
| Figure 5 : Effect of C-ANP ₄₋₂₃ on ERK and AKT phosphorylation in VSMC from SHR..... | 53 |
| Figure 6 : Effect of PD 98059 on expression of cell cycle components from G1-phase in VSMC from SHR. | 54 |
| Figure 7 : Effect of wortmannin on expression of cell cycle components from G1-phase in VSMC from SHR. | 55 |
| Figure 8 : Effect of losartan on expression of cell cycle components from G1-phase in VSMC from SHR..... | 56 |

| | |
|--|----|
| Figure 9: Schematic model showing potential mechanisms responsible for the antiproliferative effect of NPR-C receptor activation by C-ANP ₄₋₂₃ in VSMC from SHR..... | 57 |
|--|----|

Chapitre 3

| | |
|--|----|
| Figure 1: Schéma intégratif des conclusions | 64 |
|--|----|

LISTES DES ABBRÉVIATIONS

| | |
|------------------|--|
| Aa | Acide aminé |
| AC | Adénylate cyclase |
| ADN | Acide déoxyribonucléique |
| ADP | Adénosine biphosphate |
| AKT/PKB | Protéine kinase B |
| AMPc | 3', 5' adénosine monophosphate cyclique |
| Ang II | angiotensine II |
| ANP | peptide natriurétique auriculaire |
| AT ₁ | Récepteur à l'angiotensine de type 1 |
| ATP | adénosine triphosphate |
| AVP | Arginine-vasopressine |
| bFGF | Facteur de croissance basique des fibroblastes |
| BNP | Peptide natriurétique cérébral |
| Ca ²⁺ | Calcium |
| Cdk | Kinase dépendante des cyclines |
| cki | Inhibiteur des cdk |
| CMLV | Cellule du muscle lisse vasculaire |
| CNP | Peptide natriurétique de type C |
| Cys | cystéine |
| DAG | Diacylglycerol |
| EGF | Facteur de croissance épidermique |
| EGF-R | Récepteur au facteur de croissance épidermique |
| ET-1 | Endothéline-1 |
| ERK1/2 | extracellular signal-regulated kinase |
| GDP | Guanosine biphosphate |
| GPCR | Récepteurs couplés aux protéines G |
| GTP | Guanosine triphosphate |
| IGF | Facteur de croissance apparenté à l'insuline |
| IP ₃ | inositol triphosphate |

| | |
|------------------|--|
| JAK | Kinase de la famille janus |
| JNK | Kinase N-terminale c-jun |
| MAPK | Protéines kinases activées par les mitogènes |
| PDGF-R | Récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol |
| PI3K | Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate |
| PKA | Protéine kinase A |
| PKC | Protéine kinase C |
| PLC | Phospholipase C |
| PLC β | Phospholipase C β |
| PRB | Forme phosphorylée de la protéine Rb |
| NPR-A | Récepteur natriurétique de type A |
| NPR-B | Récepteur natriurétique de type B |
| NPR-C | Récepteur natriurétique de type C |
| SHR | Rat spontanément hypertendu |
| RAS | Système rénine-angiotensine |
| Rb | Protéine du rétinoblastome |
| TGF β | Facteur de croissance transformant |
| WKY | Rat Wistar Kyoto |

*Cette étape de ma vie est dédiée
à mon père qui rêvait d'une fille indépendante et instruite,
et à ma mère qui en a été l'exemple.*

Remerciements

Je tiens à remercier D^{re} Madhu Anand-Srivastava de m'avoir donné l'opportunité d'entreprendre ces études de maîtrise, de m'avoir fait confiance avec ce nouveau projet sur le cycle cellulaire et pour son enseignement scientifique.

Je tiens également à remercier notre assistante de recherche, D^{re} Yuan Li pour tous les échanges que nous avons eus. Je la remercie d'avoir partagé son expérience et aussi pour son soutien indéfectible. Je veux aussi remercier mes collègues de laboratoire et amis pour leurs appuis, leurs encouragements et pour tous les échanges constructifs. J'ai eu la chance de faire partie d'une équipe formidable, merci beaucoup.

Finalement, je voudrais remercier les membres de mon jury pour d'avoir si gentiment accepté de faire partie de mon comité de maîtrise et du temps qu'ils ont accordé à la correction de mon mémoire.

CHAPITRE 1.

INTRODUCTION ET REVUE DE LITTÉRATURE

1. Le système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire a pour fonction d'assurer à toutes les cellules de l'organisme un apport constant d'oxygène et de nutriments essentiels à la croissance, la réparation cellulaire et l'élimination des déchets cellulaires. Pour y parvenir, il met à profit un système circulatoire complexe. On distingue la circulation pulmonaire dont le rôle est d'effectuer l'échange d'oxygène et de dioxyde de carbone au niveau des poumons et la circulation systémique qui propulse le sang dans tous les tissus du corps. Ce sont les vaisseaux sanguins, principalement des artères, qui conduisent le sang en provenance du cœur aux autres organes. La pression exercée par le sang doit être suffisante pour le propulser à travers tout le système vasculaire (Boron et Boulpaep, 2009).

1.1 La pression artérielle

La pression artérielle est la pression qu'exerce le sang dans les artères. Elle se définit en deux mesures qui sont la pression systolique et la pression diastolique. La pression systolique est la pression maximale exercée par le sang au moment où le cœur se contracte. La pression diastolique, quant à elle, est la pression minimale exercée au moment du relâchement du cœur. Chez un individu sain, la pression artérielle varie entre 80 et 120 mmHg. Lors de la contraction du cœur la pression observée est la plus élevée, c'est la systole. Lorsque le cœur se relâche, on observe la pression la plus basse, c'est la diastole.

1.1.1 Régulation de la pression artérielle

La pression artérielle est déterminée par deux facteurs : la résistance périphérique totale et le débit cardiaque. Le débit cardiaque est défini comme la quantité de sang propulsée par le cœur dans le système vasculaire par unité de temps. La résistance périphérique totale est quant à elle déterminée par l'ensemble des forces qui s'oppose à l'écoulement du sang dans les vaisseaux. La loi de Poiseuille illustre ces forces. Cette loi stipule que la résistance

(R) est directement liée à la longueur d'un vaisseau (L) et à la viscosité sanguine (η) et est inversement liée à au rayon (r) à la puissance quatre.

$$R = \frac{8 \times \eta \times L}{\pi \times r^4}$$

Cette loi signifie que plus le diamètre est grand, plus le débit est important et inversement plus le diamètre est petit, plus la résistance est importante. De plus, plus la viscosité est élevée, plus le débit est faible. En condition normale, la longueur des vaisseaux et la viscosité du sang sont des paramètres qui restent constants. Le diamètre est le paramètre qui varie en réponse aux besoins des organes. En effet, l'équilibre vasodilatation/vasoconstriction permet de varier le diamètre de façon à maintenir la pression artérielle au niveau adéquat. Afin d'éviter les variations brusques ou subites, il existe également plusieurs mécanismes régulateurs qui agissent à court et à long terme (Pocock et Richards, 2004).

1.1.1 Mécanismes de régulation à court terme

Les mécanismes de régulation à court terme ont pour effet de contrer les fluctuations régulières de la pression artérielle en modifiant la résistance périphérique. Pour ce faire, ils oeuvrent par l'intermédiaire soit du système nerveux, soit de substances chimiques.

1.1.1.1 Mécanismes nerveux

Les structures nerveuses qui régulent la pression artérielle sont le centre vasomoteur du bulbe rachidien, les neurofibres vasomotrices, les barorécepteurs et leurs neurofibres associées, le muscle lisse vasculaire et les chémorécepteurs (Marieb, 2008).

Le centre vasomoteur est un centre du système nerveux sympathique situé dans le bulbe rachidien. Il forme avec les centres cardiaques, les centres cardiovasculaires responsables de la modification du débit cardiaque et du diamètre des vaisseaux. À partir

du centre vasomoteur, les neurofibres vasomotrices projettent vers la couche de muscle lisse de tous les vaisseaux sanguins. Ce faisant, elles transmettent continuellement les influx nerveux qui calibrent le diamètre des vaisseaux. L'inhibition du centre vasomoteur provoque la vasodilatation des artérioles, diminuant la résistance périphérique, et des veines, créant une baisse du retour veineux et du débit cardiaque. L'activité du centre vasomoteur peut être régulée par les barorécepteurs, les chémorécepteurs et les centres cérébraux supérieurs (Marieb, 2008).

Les barorécepteurs sont situés dans les sinus carotidiens et dans l'aorte, ainsi que dans les parois de presque toutes les grandes artères du cou et du thorax. Ils se divisent en deux groupes: les barorécepteurs attachés au réflexe sinu-carotidien qui protègent l'approvisionnement sanguin de l'encéphale et ceux du réflexe aortique qui régulent la circulation systémique. Les barorécepteurs sont des récepteurs sensoriels qui ont pour rôle de détecter le degré d'étirement des vaisseaux. Ils agissent afin de rétablir la tension artérielle lorsque ce que celle-ci augmente ou baisse significativement. Dans le cas d'une augmentation de la tension artérielle, les barorécepteurs vont s'étirer et transmettre l'information au centre vasomoteur *via* les nerfs crâniens IX et X, ce qui aura pour effet d'inhiber le centre vasomoteur. Les barorécepteurs projettent également aux centres cardiaques où ils ont pour effet de stimuler l'activité parasympathique et d'inhiber le centre cardioaccélérateur provoquant, de ce fait, une réduction de la fréquence cardiaque et de la force de contraction du cœur. Dans le cas d'une baisse de la tension artérielle, les barorécepteurs rétablissent la pression en stimulant une vasoconstriction réflexe et une augmentation du débit cardiaque (Marieb, 2008).

Bien que les chémorécepteurs soient principalement impliqués dans la régulation de la fréquence respiratoire, ils jouent un rôle non négligeable dans la régulation de la pression artérielle. Les chémorécepteurs ont pour rôle de détecter les fluctuations de pH, de la concentration d'oxygène et de gaz carbonique dans le sang. Dans le cas d'une fluctuation d'un de ces paramètres, l'information est transmise au centre cardioaccélérateur et au centre vasomoteur. Le centre cardioaccélérateur augmentera le débit cardiaque et le centre vasomoteur déclenchera la vasoconstriction réflexe ce qui aura pour effet de précipiter le retour veineux au cœur et aux poumons. L'action des chémorécepteurs sur les centres

cardioaccélérateur et vasomoteur permet donc de rétablir la pression artérielle dans les conditions de baisse de pression (Marieb, 2008).

1.1.1.2 Mécanismes chimiques

L'oxygène et le gaz carbonique ne sont pas les seules substances chimiques qui influencent la tension artérielle. D'autres substances chimiques peuvent également réguler la pression artérielle. Il s'agit des catécholamines (l'adrénaline et la noradrénaline), des peptides vasoactifs (Ang II, ET-1, AVP) et des peptides natriurétiques (l'ANP, le BNP et le CNP). Contrairement à l'oxygène et au gaz carbonique, ces substances agissent directement sur le muscle lisse, ce qui leur permet ainsi d'adapter immédiatement la résistance périphérique. Dans les conditions de baisse de pression, les reins offrent un mécanisme hormonal pour la régulation de la pression artérielle en contrôlant le volume sanguin. Cette étape s'échelonne sur des heures, voire des jours, mais permet des gains totaux (Marieb, 2008).

1.1.2 Mécanismes de régulation à long terme

Les mécanismes de régulation à long terme contrôlent la pression artérielle en régulant le volume sanguin par l'intermédiaire du système rénal. En effet, une augmentation du volume sanguin provoquera une augmentation de la pression artérielle. Au contraire, une baisse du volume sanguin provoquera une baisse de la tension artérielle. Afin de réguler le volume sanguin, le système rénal agit par l'intermédiaire de mécanismes directs et indirects (Marieb, 2008).

Le système rénal direct régule la quantité de liquide réabsorbé dans le sang en régulant la vitesse à laquelle le sang circule dans le rein. Les liquides passeront plus rapidement, de la circulation sanguine aux tubes rénaux, dans le cas d'une hausse de la pression artérielle. Il en résultera le rétablissement de la pression puisque une plus grande quantité de liquide sera expulsée dans l'urine (le rein ne pouvant pas traiter efficacement tout le liquide) (Marieb, 2008).

Le système rénal agit indirectement par l'intermédiaire du système rénine-angiotensine. Ce système est considéré comme un des mécanismes majeurs dans le maintien de la tension artérielle. Il joue un rôle dans la régulation de la balance sodique et de l'excrétion d'eau. La rénine, synthétisée par les cellules rénales juxtaglomérulaires clive l'angiotensinogène en angiotensine I. L'angiotensine I est par la suite clivée par l'enzyme de conversion (ECA) pour finalement donner le peptide actif angiotensine II. L'Ang II, possède un fort pouvoir vasoconstricteur ce qui contribue à augmenter la pression systémique, la vitesse du transport sanguin vers les reins et la perfusion rénale. L'Ang II stimule également la libération d'une autre hormone produite par le cortex surrénal, l'aldostérone qui favorise la réabsorption du sodium par le rein. La réabsorption du sodium, étant liée à la réabsorption d'eau, cause l'augmentation du volume sanguin. De plus, l'Ang II stimule la libération de l'hormone antidiurétique (l'ADH) par la neurohypophyse. Cette hormone stimule également la réabsorption rénale de l'eau. L'effet combiné de l'Ang II, l'aldostérone et l'hormone antidiurétique permet de restaurer la pression artérielle (Marieb, 2008).

1.1.3 Structure vasculaire

En plus des nombreux mécanismes de régulation à court et long terme, la structure vasculaire joue un rôle important dans le maintien de la pression artérielle. En effet, sa composition unique permet un contrôle précis de la tension artérielle. La composition des vaisseaux sanguins diffère selon leur fonction. Tout d'abord, la paroi des artères, comme illustrée à la figure 1, est composée de trois tuniques qui sont de l'intérieur vers l'extérieur : l'intima, la média et l'adventice. L'intima est constituée d'un endothélium qui se trouve en contact avec le liquide sanguin. De plus, celui-ci sécrète plusieurs substances vasoactives. Le monoxyde d'azote, l'ET-1 et le peptide natriurétique de type C (CNP) sont des exemples de substances sécrétées par l'endothélium qui modifient le diamètre des vaisseaux. Après l'intima vient la média qui est constituée de cellules musculaires lisses (CML). Elle joue un rôle primordial dans la réactivité vasculaire permettant la vasodilatation et la vasoconstriction de l'artère. L'adventice quant à elle est constituée de fibre élastique et de fibres de collagène permettant ainsi l'ancrage des vaisseaux aux structures environnantes (Berne et Levy, 2001; Tortora et Derrickson, 2009).

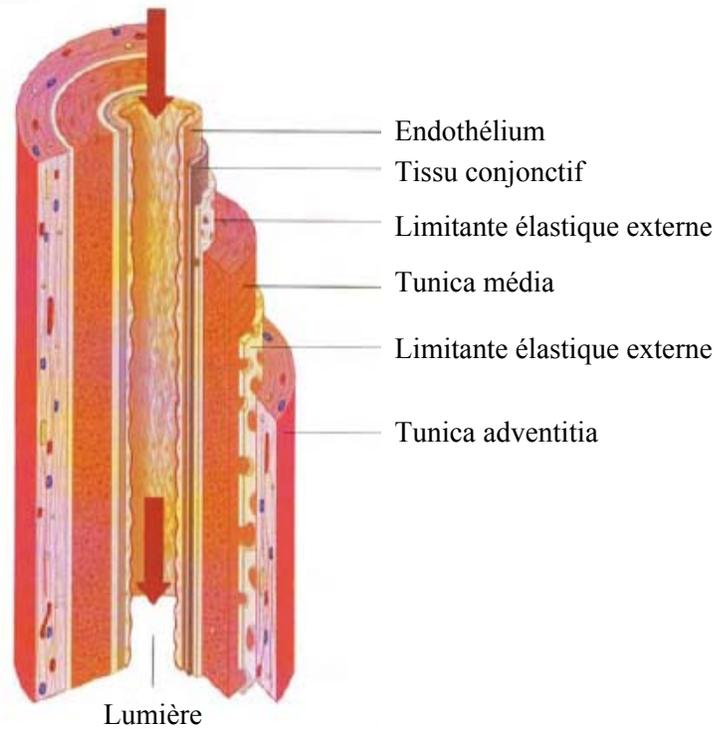


Figure 1: Structure d'une artère. (Modifiée de (Marieb, 2008))

On distingue les vaisseaux de conduction qui sont des vaisseaux de gros calibre et dont la structure doit résister à d'énormes pressions et les vaisseaux de résistances qui déterminent, comme leur nom l'indique, la résistance artérielle. Comme mentionné plus haut, le rôle joué par un vaisseau est intimement lié sa composition. Dans le cas de l'aorte, sa structure est très élastique ce qui permet son extension lors de l'arrivée du sang. Plus le diamètre des vaisseaux diminue, plus la composition change pour devenir, plus musculaire dans les artères de résistance jusqu'à ce que le muscle lisse domine au niveau des artérioles (Berne et Levy, 2001).

1.2 Les artères de résistance

Les artères de résistance ont l'important rôle de réguler la distribution du sang vers les organes. Elles répondent aux changements de pression et de débit sanguin. Elles ont donc la capacité, par des mécanismes locaux, de s'adapter à leur environnement biomécanique. Ainsi, lorsque le flux sanguin change, l'artère répond rapidement par des modifications fonctionnelles et structurales. Cette réponse est assurée par des mécanismes humoraux autocrines et/ou paracrines. Par contre, lorsque la réponse vasomotrice est insuffisante pour compenser une augmentation chronique du débit sanguin, l'artère subit un remodelage vasculaire.

1.3 Remodelage vasculaire

Le remodelage vasculaire est un processus pathologique qui joue un rôle prépondérant dans les complications cardiovasculaires. Il se définit comme une réorganisation de la structure des vaisseaux en réaction aux forces de cisaillement exercées et/ou à des facteurs humoraux comme l'Ang II et l'ET-1. Ils induisent une augmentation du ratio média/lumière (Hayashi et Naiki, 2009). Les changements se trouvent non seulement au niveau structurel, mais également au niveau de la composition et des propriétés des vaisseaux. Les vaisseaux les plus touchés par le remodelage vasculaire sont les petites artères : les artérioles et les artères de résistance. Il en est ainsi puisque ce sont les plus sensibles aux facteurs vasoconstricteurs (Berne et Levy, 2001).

Il y existe deux processus majeurs dans le remodelage vasculaire : l'hypertrophie et l'hyperplasie des CMLV. L'hypertrophie se définit comme l'augmentation de la taille de la cellule. Elle est associée à une synthèse accrue de protéine. En revanche, l'hyperplasie se définit par l'augmentation du taux de prolifération augmente le nombre de cellules et est, quant à elle, associée à une augmentation de la synthèse d'ADN. Les changements structurels et morphologiques sont impliqués dans le remodelage vasculaire et dans l'augmentation de la résistance périphérique à l'origine de l'hypertension.

2. L'hypertension

L'hypertension est caractérisée par une augmentation soutenue et significative de la pression artérielle. Une pression chronique au-dessus de 140/90 mmHg systolique/diastolique est considérée comme à risque. Bien que l'hypertension soit une condition répandue et très étudiée, des statistiques démontrent qu'elle s'avère difficile à maîtriser chez un nombre élevé de patients (Joffres, Hamet, MacLean, L'Italien G, et Fodor, 2001).

Il existe deux types d'hypertension artérielle, soit l'hypertension essentielle et l'hypertension secondaire. Les causes de l'hypertension secondaire contrairement à l'hypertension essentielle sont connues. L'hypertension secondaire résulte le plus souvent de causes sous-jacentes telles les atteintes rénales stimulant le système rénine-angiotensine ou encore les maladies endocriniennes comme les cancers sécrétant de l'adrénaline en excès. L'hypertension essentielle quant à elle représente 95 % des cas d'hypertension et n'a pas de cause clairement définie. Néanmoins, certains facteurs sont clairement définis comme facteurs de risques.

2.1 Facteurs de risques

Plusieurs facteurs augmentent le risque de souffrir d'hypertension. Il s'agit d'une combinaison de plusieurs facteurs génétiques et de facteurs environnementaux (Ruppert et Maisch, 2003). Parmi les facteurs environnementaux, citons en exemple le surplus de poids, le tabagisme, l'inactivité physique, le stress et la consommation de sel. En agissant sur ces facteurs, il est possible de diminuer les risques de souffrir d'hypertension. La combinaison d'autant de facteurs complexifie énormément la recherche touchant l'hypertension essentielle.

2.2 Conséquences de l'hypertension

L'Organisation mondiale de la santé publiait, en 2002, une étude démontrant que l'hypertension un des principaux facteurs de risque de mortalité en Amérique du Nord (Ezzati, Lopez, Rodgers, Vander Hoorn, et Murray, 2002). En effet, lorsqu'elle n'est pas traitée, elle entraîne des conséquences redoutables sur la santé d'un individu. Elle représente un facteur de risque associé aux maladies cardiovasculaires, aux accidents cérébraux vasculaires, aux défaillances rénales et la maladie d'Alzheimer (Khan et al., 2005; Vasan et al., 2001). Devant autant de conséquences potentielles, miser sur un contrôle serré de la pression artérielle semble plus que judicieux.

2.3 Traitement de l'hypertension

Plusieurs traitements contre l'hypertension se retrouvent sur le marché dont notamment les diurétiques, les bloqueurs des canaux calciques et les inhibiteurs du système rénine-angiotensine. Les diurétiques favorisent l'excrétion d'eau et de sel contribuant ainsi à diminuer le volume sanguin. Les bloqueurs des récepteurs β et α_1 adrénergiques agissent sur le système nerveux sympathique diminuant respectivement la fréquence et le débit cardiaque et la résistance périphérique totale. Les bloqueurs des canaux calciques causent une vasodilatation entraînant une baisse de la résistance périphérique totale. Parmi les inhibiteurs du système rénine-angiotensine, il y a les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) qui inhibe la formation de l'Ang II provoquant une diminution de la contraction des vaisseaux sanguins et une augmentation de la sécrétion de sel (Lilly, 2007). Malgré cette panoplie de médicaments, l'hypertension reste difficile à traiter. C'est pourquoi, encore aujourd'hui, un nombre important de groupes de recherche se penchent sur les mécanismes à l'origine de l'hypertension. Afin d'y parvenir, les chercheurs ont, au fil des années, élaborer plusieurs outils de recherche spécifiques à l'hypertension dont quelques modèles animaux d'hypertension.

2.4 Les rats SHR : un modèle d'hypertension

Le modèle de rats spontanément hypertendus (SHR) est un modèle analogue à l'hypertension essentielle chez l'humain. Il s'agit d'un modèle d'hypertension génétique créé à la suite de croisement entre rats hypertendus. Les rats SHR sont caractérisés par une hypertension qui apparaît spontanément vers la cinquième semaine et qui augmente avec l'âge (Okamoto et Aoki, 1963). L'augmentation du ratio média/lumière observée chez les humains souffrant d'hypertension a également été observée chez le modèle SHR (Heagerty, Aalkjaer, Bund, Korsgaard, et Mulvany, 1993). De plus, un article publié en 2000 par Intengan et Schiffrin suggère fortement que le remodelage vasculaire observé chez les rats SHR et chez les humains souffrant d'hypertension artérielle soient identiques (Intengan et Schiffrin, 2000). Ce modèle permet donc à la communauté scientifique d'approfondir ses connaissances relatives aux mécanismes à l'origine du remodelage vasculaire à tous les niveaux, que ce soit les mécanismes menant l'hypertrophie ou encore ceux qui induisent l'hyperplasie des CMLV.

2.5 Hyperplasie des cellules du muscle lisse vasculaire

L'hyperplasie des CMLV est impliquée dans plusieurs maladies cardiovasculaires comme l'hypertension, la resténose et l'athérosclérose (Intengan et Schiffrin, 2001; Libby et Tanaka, 1994; Liu, Roubin, et King, 1989; Ross, 1995). Elle est en cause dans l'épaississement des vaisseaux. Elle se définit comme une augmentation du nombre des CMLV associée à une augmentation de la synthèse d'ADN. Ainsi, elle contribue à l'augmentation du ratio média/lumière menant à une augmentation de la résistance périphérique. Le modèle de rats SHR est particulièrement indiqué pour l'étude des mécanismes moléculaires à l'origine de l'augmentation de la prolifération des CMLV. En effet, il est connu qu'une des différences entre les rats SHR et les rats normaux-tendus WKY est une augmentation de la prolifération des CMLV (Heagerty, Aalkjaer, Bund, Korsgaard, et Mulvany, 1993; Resink, Scott-Burden, Baur, et Buhler, 1987). Les mécanismes menant à l'hyperplasie du muscle lisse vasculaire ne sont pas encore totalement compris. Par contre, il a été démontré que les peptides vasoactifs, tels

l'angiotensine II (Ang II), l'endothéline (ET-1) et la vasopressine (AVP), jouent un rôle majeur dans ce processus (Michel et al., 1990).

3. Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypertension

L'augmentation de la prolifération résulte d'un déséquilibre de la balance entre les facteurs qui stimulent la prolifération et ceux qui l'inhibent. En conditions pathologiques, plusieurs molécules favorisent l'hypertension en faisant pencher la balance du côté de la vasoconstriction, de l'hypertrophie et de la prolifération. Ces facteurs, appelés messagers premiers, vont mettre à contribution tout un réseau de communication intracellulaire leur permettant ainsi d'activer ou d'inactiver les différentes fonctions cellulaires. Les messagers premiers sont, en règle générale, des hormones qui ne franchissent pas la membrane plasmique. Pour produire une réaction de l'autre côté de la membrane, les messagers premiers lient des récepteurs transmembranaires. Le récepteur ancré dans la membrane plasmique pourra activer une seconde protéine, intracellulaire cette fois, qui activera une ou plusieurs voies signalétiques (Voet et Voet, 2004; Berne et Levy, 2001).

3.1 Récepteurs couplés aux protéines G

La plus grande famille de récepteur transmembranaire est formée par les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Les RCPG sont des protéines caractérisées par un domaine à 7 passages transmembranaires. Ils relaient un grand nombre de signaux cellulaires et activent plusieurs voies signalétiques. Des acides aminés, des glycoprotéines, les peptides et des phospholipides sont des exemples de signaux capables d'activer les RCPG (Krauss, 2008). Étant couplés aux protéines G, les RCPG une fois activés vont activer à leur tour les protéines G.

3.1.1 Les protéines G

L'appellation protéine G provient de l'abréviation anglaise *guanine nucleotide-binding proteins*. Les protéines G appartiennent à la famille des GTPase et hydrolysent la

guanosine triphosphate (GTP) en guanosine diphosphate (GDP). Elles profitent de l'échange du GDP en GTP pour déclencher ou inhiber des cascades de signalisation cellulaire par l'intermédiaire d'un second messenger comme l'AMPc. Elles sont constituées de 3 sous-unités : une sous-unité α , une β et une γ . Lorsque le récepteur est stimulé par un ligand, il libère le GDP pour lier le GTP. Cette nouvelle liaison provoque la dissociation de la sous-unité α du complexe $G_{\beta\gamma}$. Une fois dissociée de la sous-unité $G_{\beta\gamma}$, la sous-unité G_{α} libre d'activer ou d'inactiver les voies signalétiques qui se trouvent en aval. Il existe 3 isoformes de la sous-unité α : $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$ et $G_{\alpha q}$. La sous-unité $G_{\alpha s}$ est une sous-unité stimulatrice qui comme son nom l'indique, augmente l'activité de l'adénylate cyclase (AC). L'activation de l'AC provoque une augmentation du taux d'AMPc qui interagit avec plusieurs protéines en aval pour produire ses effets. La protéine $G_{\alpha i}$ est quant à elle inhibitrice de l'AC ce qui a pour effet la diminution des taux AMPc (Voet et Voet, 2004).

3.1.2 La protéine Gi

Des études rapportent que l'expression de la protéine Gi est augmentée dans les CMLV de SHR comparativement aux CMLV de WKY (Anand-Srivastava, 1992; Anand-Srivastava, Picard, et Thibault, 1991). Marcil et al. ont prouvé que l'augmentation de l'expression de la protéine Gi précède l'établissement de l'hypertension (Marcil, Thibault, et Anand-Srivastava, 1997). Ces résultats suggèrent que la protéine Gi joue un rôle déterminant dans l'établissement de la pathologie. En ce sens, Li et Anand-Srivastava ont montré que chez les rats SHR, l'utilisation de la toxine pertussis qui inactive la protéine Gi en la bloquant dans son état lié au GDP, résultait en une diminution de leur pression artérielle (Li et Anand-Srivastava, 2002). Dans le but de déterminer si la baisse de pression artérielle dont les rats SHR ont bénéficié était due à une diminution de la prolifération des CMLV, ils ont étudié l'effet de l'inhibition de la protéine Gi sur la prolifération. Ils ont, ainsi, démontré que l'inhibition de la protéine Gi par la toxine pertussis inhibe l'augmentation de la prolifération des CMLV de SHR comparativement à celles de WKY (Li Y, 2005). Suite à ces recherches prometteuses, il semblait particulièrement pertinent d'approfondir le rôle de la protéine Gi et de déterminer les facteurs qui induisent une augmentation de son expression. Dans ce sens, Anand-Srivastava et al. ont montré que

l'Ang II augmentait le taux d'expression de la protéine Gi dans les CMLV de type A10 (Palaparti, Ge, et Anand-Srivastava, 1999). De plus, Palaparti et al. ont montré que le losartan, un antagoniste du récepteur à l'Ang II AT₁ diminuait l'augmentation de l'expression de la protéine Gi induite par l'Ang II.

3.2 L'angiotensine II

L'Ang II est un peptide connu pour son implication dans l'hypertension. Ces effets physiologiques sont relayés par l'intermédiaire de récepteurs couplés aux protéines G. Il est prouvé qu'en culture les CMLV de SHR produisent de l'Ang II de façon endogène (Fukuda et al., 1999). En 2001, Satoh et al. ont montré qu'une augmentation de la génération d'Ang II est associée à une augmentation d'expression des facteurs de croissance TGF- β 1, *PDGF A-chain* et bFGF (Satoh et al., 2001). D'une part, ces résultats suggèrent que les taux élevés d'Ang II endogène contribuent à l'augmentation de la prolifération des CMLV de SHR en augmentant la synthèse des facteurs de croissance. D'autre part, des études démontrent que l'Ang II conduit également à l'hypertrophie des CMLV en activant la voie des MAPK, p38MAPK, ERK et JNK ainsi que la voie des JAK/STAT (Berk et Corson, 1997; Sugden et Clerk, 1997; Taniyama et al., 2004). Bref, l'Ang II contribue fortement à l'établissement et au maintien de la pathologie de l'hypertension puisque ce peptide augmente à la fois la prolifération et l'hypertrophie des CMLV.

3.2.1 Récepteurs à l'angiotensine II

Les effets de l'Ang II sont relayés par de nombreuses voies signalétiques par l'intermédiaire des récepteurs à l'Ang II (Berk et Corson, 1997). En effet, l'Ang II lie deux sous-types de récepteurs: AT₁ et AT₂ (Timmermans et al., 1993). Le récepteur AT₁ est prédominant dans le système cardiovasculaire et relaye la majorité des effets de l'Ang II. Conséquemment, l'utilisation d'un antagoniste sélectif du récepteur AT₁ comme le losartan permet de réduire les effets hypertensifs de l'Ang II (Goa et Wagstaff, 1996). La contribution biologique du récepteur AT₂ aux effets de l'Ang II est quant à lui assez

méconnue. Toutefois, des études semblent indiquer qu'il inhiberait les effets du récepteur AT₁ en condition physiologique (Ciuffo, Alvarez, et Fuentes, 1998; Yamada et al., 1998).

3.2.2 Signalisation du récepteur AT₁ à l'angiotensine II

AT₁, tel qu'illustré à la figure 2, est un récepteur couplé aux protéines G interagissant avec les protéines G_{αi} et G_{αq}. AT₁ active plusieurs voies de signalisations dont la voie des phospholipase C par l'intermédiaire de la protéine G_q (Lassegue, Alexander, Clark, Akers, et Griendling, 1993; Ullian et Linas, 1990). De plus, AT₁ est couplé à l'inhibition de l'adénylate cyclase par la protéine G_i (Anand-Srivastava, 1983) et à l'activation de canaux calciques-dépendants du voltage (Chiu et al., 1991). Des études ont montré que l'Ang II régule les canaux calciques voltages-dépendent de type L et T par l'intermédiaire de la protéine G_i (Lu et al., 1996; Maturana et al., 1999). En plus d'activer les canaux calciques, l'Ang II stimule la croissance cellulaire en stimulant la phosphorylation de tyrosines kinases. En effet, l'activation du récepteur AT₁ induit la phosphorylation de plusieurs tyrosines kinases dont les kinases de la famille janus (JAK, janus kinase family kinases), la PI3K et c-Src (Touyz et Schiffrin, 2000). Touyz et al. ont observé que chez les personnes souffrant d'hypertension, l'activation de c-Src induite par l'Ang II est associée à la croissance cellulaire des CMLV provenant d'artères (Touyz et al., 2001). c-Src active plusieurs molécules en aval, dont les MAPK, la PLC, les JAK, la PI3K et la NAD(P)H oxydase (Touyz et Schiffrin, 2000). D'un autre côté, l'Ang II active également les MAPK dont ERK1/2, la kinase p38 et JNK. L'Ang II active aussi les récepteurs tyrosines kinases bien que ceux-ci ne soient pas directement liés aux récepteurs à l'angiotensine. En effet, des études confirment que l'Ang II, par l'intermédiaire d'AT₁, transactive les récepteurs au facteur de croissance épidermique, EGF, au facteur de croissance dérivé des plaquettes, PDGF et au facteur de croissance apparenté à l'insuline IGF (Saito et Berk, 2001). Plus récemment, des évidences apportées suggère que l'Ang II transactive le récepteur EGF par la voie signalétique des MAPK et que cette transactivation jouerait un rôle dans l'augmentation de l'expression la protéine G_i et dans l'augmentation de la prolifération des CMLV (Gomez Sandoval, Lévesque, et Anand-Srivastava, 2009). La transactivation des récepteurs aux facteurs de croissance potentialise les effets

pathologiques relayés par les différentes voies signalétiques de l'Ang II. En somme, toutes les voies signalétiques couplées à AT₁ contribuent aux effets physiologiques de l'Ang II et contribuent à l'établissement de l'hypertension et aux complications qui lui sont associées.

3.3 Voie signalétique de la phospholipase C

L'Ang II active la phospholipase C (PLC) par l'intermédiaire de deux voies : celle de la protéine G_q et celle de la protéine G_i. En effet, comme l'illustre la figure 2, la liaison de l'Ang II à son récepteur AT₁ active la protéine G_qα qui, à son tour, active la PLCβ. AT₁ étant également couplé à G_i, l'Ang II provoque l'inhibition de l'AC ce qui diminue la production d'AMPc. La baisse du taux d'AMPc permet alors l'activation de la PLC. Les phospholipases C sont des enzymes qui hydrolysent les phospholipides. La PLC hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PIP₂). Cette réaction donne deux produits : l'inositol trisphosphate (IP₃) et le 1,2-diacylglycérol (DAG) (Berridge, 1987; Smrcka, Hepler, Brown, et Sternweis, 1991). L'IP₃ se lie à des récepteurs-canaux calciques spécifiques sur le réticulum sarcoplasmique pour libérer le [Ca²⁺]_i. C'est l'augmentation du [Ca²⁺]_i qui provoque la contraction des CMLV. Le DAG, quant à lui, active la protéine kinase C (PKC) qui phosphoryle de nombreuses protéines dont la protéine G_i (Katada, Gilman, Watanabe, Bauer, et Jakobs, 1985; Tsuda et Alexander, 1990). De plus, la PKC peut directement activer la kinase Raf de la voie des MAPK (Daum, Eisenmann-Tappe, Fries, Troppmair, et Rapp, 1994).

3.4 Voie des MAP kinases

Les MAP kinases constituent une famille de protéines sérine/thréonine spécifiques activées par des facteurs mitogéniques. Cette famille est divisée en trois voies. Il y a la voie de ERK, la voie de JNK et la voie de p38. Ces voies sont impliquées dans la croissance et l'apoptose (Force et Bonventre, 1998; Mii, Khalil, Morgan, Ware, et Kent, 1996). La voie de ERK1/2 est particulièrement connue pour son implication dans la prolifération cellulaire, incluant la prolifération des CMLV. En effet, il est clairement établi que l'activation de ERK1/2 joue un rôle dans l'augmentation du taux de prolifération des

CMLV en condition d'hypertension (Force et Bonventre, 1998). La voie de ERK1/2 consiste en une cascade de phosphorylation (voir la figure 2). Cette cascade s'amorce lorsqu'un agoniste se lie à son récepteur. L'activation du récepteur permet d'activer la première MAP kinase Ras. Ras à son tour phosphoryle Raf qui active MEK. La cascade se finie lorsque ERK1/2 est activé par MEK. ERK1/2 agit sur plusieurs substrats dont la majorité se trouve être des facteurs de transcription. Toutefois, ERK1/2 peut également activer des protéines kinases et des phospholipases (Widmann, Gibson, Jarpe, et Johnson, 1999). Plusieurs stimuli peuvent activer ces cascades par exemple les peptides vasoactifs tels l'angiotensine, les facteurs de croissance et les cytokines. L'augmentation de ces facteurs contribuerait à l'activation de ERK1/2 en condition pathologique. De plus, Hashim et al. ont prouvé que l'augmentation de la prolifération induite par l'Ang II est inhibée par la présence de l'inhibiteur de MEK1 de la voie de ERK (PD98059) dans des cellules de type A10 (Hashim, Li, et Anand-Srivastava, 2006). Dans le cas, des CMLV de rats SHR qui ont un taux de production d'Ang II endogène plus élevé que les CMLV de WKY, le taux de phosphorylation de ERK1/2 est également augmenté en comparaison aux CMLV de SHR (Jing, Zhang, Wang, et Guo, 2006; Lappas, Daou, et Anand-Srivastava, 2005). Ces résultats soulignent l'importance de la voie de ERK1/2 dans la transduction des signaux moléculaires de l'Ang II.

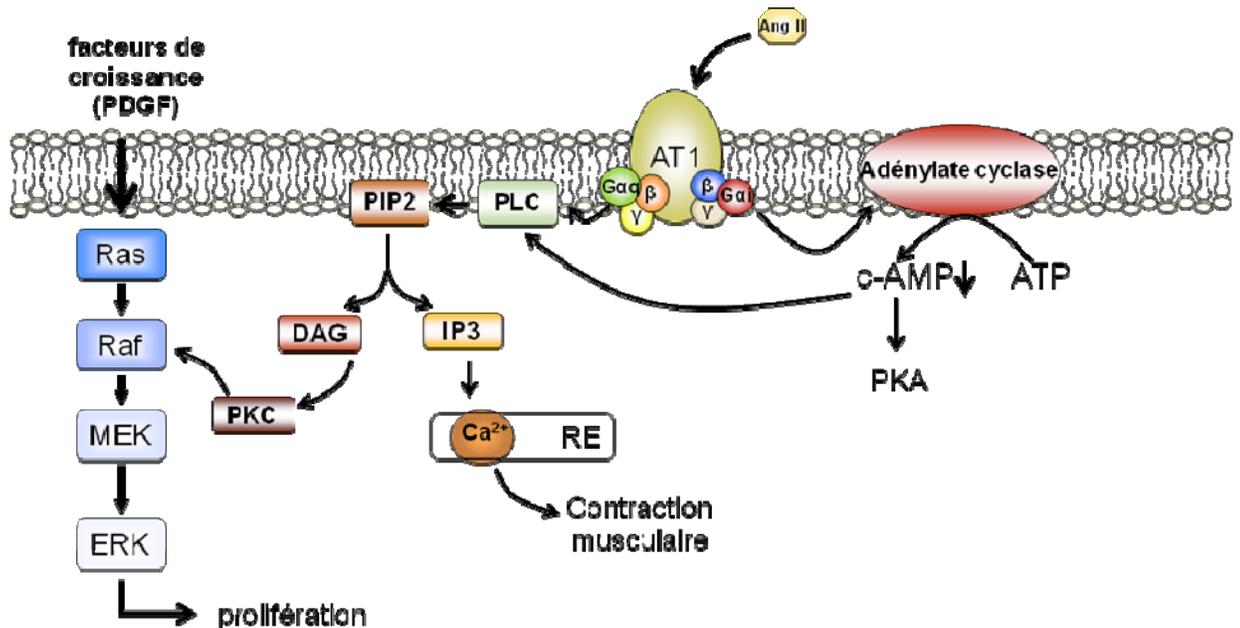


Figure 2 : Schéma intégratif des voies de signalisation de l'Angiotensine II

3.5 La voie de la Phosphoinositide 3-kinase

Une autre voie activée par l'Ang II est la voie des phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Les PI3K constituent une famille de lipides kinases importante dans la transduction des signaux cellulaires. Elles sont impliquées dans la croissance, la prolifération, la différenciation et la mobilité cellulaires. Il existe 3 classes de PI3K : la classe I, la classe II et la classe III. Cette classification est basée sur leur structure primaire, leur régulation et leur substrat *in vitro*. La classe I est la forme prédominante du système vasculaire. Les PI3K de classe I des protéines hétérodimériques composées d'une sous-unité catalytique (p110) et d'une sous-unité régulatrice (p85 ou p101) (Leevers, Vanhaesebroeck, et Waterfield, 1999). Cette classe est activée par les récepteurs tyrosines kinases et par les RCPG. Les PI3Ks catalysent la formation de phosphatidylinositols (PtdIns) (3,4,5)P₃, ce qui conduit à l'activation de plusieurs protéines kinases dont la protéine AKT (également appelée PKB) (Oudit et al., 2004). L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ciblant la PI3K par Seki et al. a permis de faire la démonstration que l'augmentation de calcium intracellulaire par l'Ang II dans les CMLV requiert l'activation de la PI3K (Seki, Yokoshiki, Sunagawa, Nakamura, et Sperelakis, 1999). De plus, Vecchione et al. ont montré que la délétion de la sous-unité p110 γ dans des modèles de souris transgéniques avait un effet protecteur contre l'hypertension induite par l'administration d'Ang II *in vivo* (Vecchione et al., 2005). Ces études soulignent l'importance primordiale de la PI3K dans la transduction des signaux moléculaires de l'Ang II tant *in vitro* qu'*in vivo*.

3.6 La voie d'AKT

AKT également connue sous le nom de protéine kinase B a été identifié comme une importante cible en aval de la PI3K dans la signalisation de l'Ang II des CMLV (Takahashi et al., 1999). En effet, il a été prouvé qu'AKT est responsable de l'activation des canaux calciques impliqués dans la relâche du calcium intracellulaire induite par l'Ang II (Seki, Yokoshiki, Sunagawa, Nakamura, et Sperelakis, 1999). De plus, une étude montre qu'AKT régule la synthèse protéique en activant la p70 S6-kinase (p70^{S6K}) (Eguchi et al.,

1999). AKT inhibe l'apoptose et stimule la survie des CMLV en régulant également l'expression de c-Myc et de Bcl-2 et en inhibant les caspases (Coffer, Jin, et Woodgett, 1998). Bien que le rôle d'AKT dans la signalisation de l'Ang II ne soit pas totalement élucidé, ces études laissent croire qu'un dérèglement de la balance entre l'effet mitogénique et l'effet apoptotique d'AKT est un processus impliqué dans l'établissement de l'hypertension.

4. Les peptides natriurétiques

La découverte des facteurs natriurétiques par De Bold (de Bold, Borenstein, Veress, et Sonnenberg, 1981) fut une percée capitale qui ouvrit la voie à la recherche et au développement de nouveaux médicaments contre l'hypertension. Son laboratoire montra que des extraits salins d'atrium de rats provoquaient une réponse natriurétique et hypotensive lorsqu'ils étaient injectés chez d'autres rats. D'autres groupes d'études isolèrent par la suite un peptide de 28 aa qu'ils nommèrent facteur natriurétique auriculaire, ANF (maintenant connu comme l'ANP) (Flynn, de Bold, et de Bold, 1983; Napier et al., 1984). Aujourd'hui, nous savons que la famille des peptides natriurétiques comporte trois membres : le peptide natriurétique auriculaire (ANP), le peptide natriurétique cérébral (BNP) et le peptide natriurétique de type C (CNP) (Brenner, Ballermann, Gunning, et Zeidel, 1990; Sudoh, Kangawa, Minamino, et Matsuo, 1988; Sudoh, Minamino, Kangawa, et Matsuo, 1990). Le BNP et le CNP agissent comme des antagonistes de la vasopressine, de l'endothéline et du système rénine-angiotensine-aldostérone. L'ANP régule diverses fonctions biologiques, dont la pression sanguine, la sécrétion de progestérone ainsi que la relâche de rénine, de vasopressine et d'endothéline (Anand-Srivastava et Trachte, 1993). Les peptides natriurétiques sont tous produits dans le cœur humain, ainsi que dans celui des autres mammifères (Levin, Gardner, et Samson, 1998; Yandle, 1994). Ils contiennent une structure en forme de boucle composée par une séquence conservée d'une longueur de 17 aa : CFGXXXDRXXXXGLGC (les X étant n'importe quel aa). Les deux résidus cystéines créent le lien disulfide qui forme la boucle nécessaire à la reconnaissance du peptide natriurétique par le récepteur (Misono, Grammer, Fukumi, et Inagami, 1984). Les peptides natriurétiques sont relâchés de manière continue. Cependant, leur sécrétion est augmentée

en réponse à des stimuli comme les peptides vasoactifs qui vont causer une augmentation de la pression artérielle (Focaccio et al., 1993; Mantymaa, Leppaluoto, et Ruskoaho, 1990; Veress, Milojevic, Yip, Flynn, et Sonnenberg, 1988). En effet, le taux de peptides natriurétiques est augmenté en hypertension artérielle. Les peptides natriurétiques sont métabolisés grâce à leur internalisation par le récepteur NPR-C et par protéolyse par l'endopeptidase neutre (Potter, Yoder, Flora, Antos, et Dickey, 2009).

4.1 Les récepteurs aux facteurs natriurétiques

Les peptides natriurétiques exercent leur effet par l'intermédiaire de trois types de récepteurs natriurétiques. Les récepteurs natriurétiques sont divisés en deux catégories, ceux ayant une activité guanylate cyclase et ceux qui n'en ont pas (voir la figure 3). Les récepteurs qui possèdent une activité guanylate cyclase sont les récepteurs NPR-A et NPR-B. Ils ont un poids approximatif de 120 kDa et possèdent une homologie de 64 % entre eux. NPR-A possède une affinité pour l'ANP et le BNP. NPR-B est plus sélectif pour le CNP (Chang et al., 1989; Chinkers et al., 1989). Les peptides natriurétiques qui lient les récepteurs NPR-A et NPR-B stimulent l'activité de la cyclase guanylate, ce qui augmente rapidement et de façon soutenue la production des taux de cGMP intracellulaire entraînant des nombreuses actions biologiques. Le cGMP agit sur plusieurs cibles moléculaires comme certaines kinases, des phosphodiésterases et des canaux ioniques. Le cGMP active la PKG, ce qui provoque l'inhibition de la PLC causant une diminution de l'IP₃ formé. La baisse du taux d'IP₃ diminue entraîne à son tour une diminution du Ca²⁺ intracellulaire provoquant une baisse de la contraction musculaire (Rapoport, 1986).

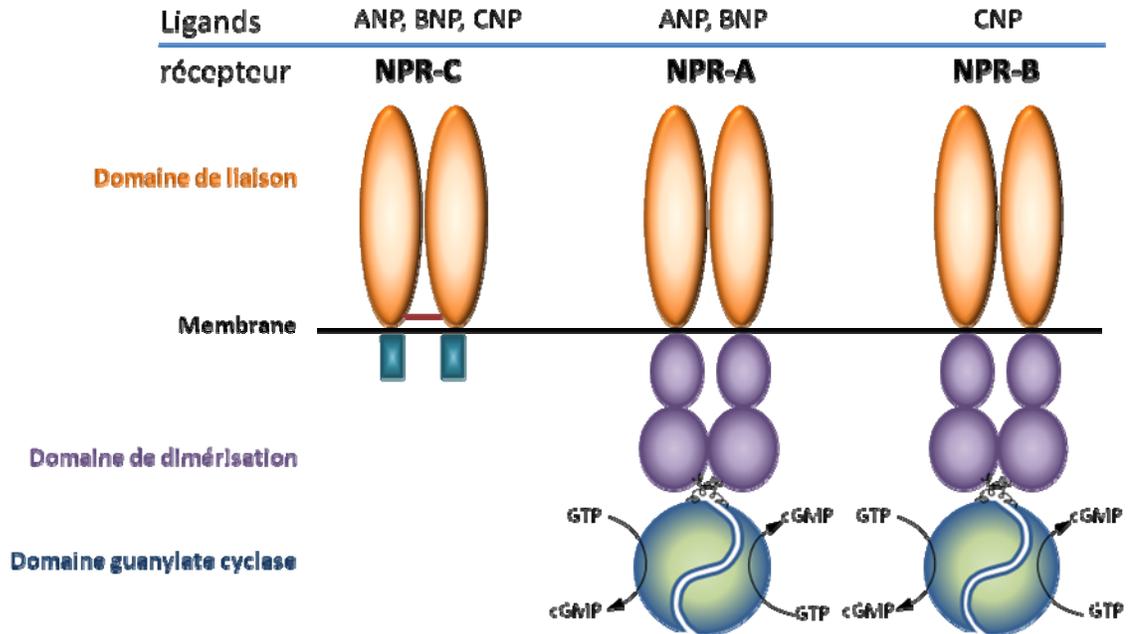


Figure 3: Structures des récepteurs natriurétiques. Figure inspirée de (Potter, Abbey-Hosch, Dickey, 2006)

5. Le récepteur natriurétique de type C (NPR-C)

NPR-C est quant à lui dépourvu d'activité guanylate cyclase et lie les trois types de peptides natriurétiques. Il a également une forte affinité pour l'analogue tronqué de forme cyclique [des(Glu¹⁸, Ser¹⁹, Glu²⁰, Leu²¹, Gly²²)ANP₄₋₂₃-NH₂], le C-ANP₄₋₂₃ avec lequel il interagit de manière spécifique (Maack et al, 1987). Le domaine extracellulaire du récepteur NPR-C est à 30 % homologue à ceux des récepteurs NPR-A et NPR-B (van den Akker, 2001). Par contre, contrairement à ces récepteurs, il ne contient pas de domaine guanylate cyclase et son domaine intracellulaire ne contient que 37 aa. Ce récepteur possède un domaine transmembranaire de 23 aa ainsi qu'un domaine extracellulaire de 440 aa (Fuller et al., 1988). Le récepteur NPR-C existe sous forme de monomère de 66 kDa et de dimère de 133 kDa (Leitman et al., 1986). Deux différents ADN complémentaires ont été identifiés codant pour NPR-C par Nunez et al. en 1992 dans les veines ombilicales humaines (Nunez, Dickson, et Brown, 1992). Kato et al. ont apporté des indices supplémentaires quant à l'existence deux sous-types de récepteurs NPR-C vasculaires de

60 et 70 kDa (Kato, Lanier-Smith, et Currie, 1991). Des études provenant du groupe de recherche Trachte et al. ont aussi supporté l'existence de deux sous-types différents (Trachte, Kanwal, Elmquist, et Ziegler, 1995). De plus, l'étude de l'interaction entre les peptides CNP et BNP avec le récepteur NPR-C suggèrent qu'il y aurait deux sous-types de NPR-C. Tous deux seraient couplés à l'inhibition de l'adénylate cyclase (Savoie, de Champlain, et Anand-Srivastava, 1995; Trachte, Kanwal, Elmquist, et Ziegler, 1995). Des études plus récentes ont prouvé que l'existence de deux différents sous-types de récepteur NPR-C de 67 et de 77 kDa. Le sous-type de 77 kDa est impliquée dans la clairance des facteurs natriurétiques (Woodard, Zhao, Rosado, et Brown, 2004). Il possède un faible affinité pour le CNP contrairement au sous-type de 67 kDa qui possède une forte affinité pour le CNP (Chen et Burnett, 1998). Ce dernier est couplé à l'inhibition de l'AC par l'intermédiaire de la protéine Gi, l'activation de la PLC (Anand-Srivastava, Sairam, et Cantin, 1990; Anand-Srivastava, Srivastava, et Cantin, 1987; Hirata, Chang, et Murad, 1989).

5.1 Distribution du récepteur NPR-C

NPR-C est distribué dans de nombreuses cellules et dans plusieurs tissus, notamment les CMLV, les plaquettes, les glomérules, la glande surrénale, le cortex cérébral, les fibres de Purkinje du système de conduction cardiaque (Anand-Srivastava, 2005). Des études récentes prouvent qu'il est également distribué dans les cellules ganglionnaire de la rétine (Xu, Tian, Zhong, et Yang, 2010) et dans les cellules amacrine cholinergiques et dopaminergiques de la rétine chez les rats (Abdelalim et Tooyama, 2010). Dans la plus part des tissus la densité du récepteur NPR-C est plus importante que celle des récepteurs NPR-A/B. Par exemple, dans les cellules endothéliales le ratio de récepteurs NPR-C constitue 94% des récepteurs à l'ANP (Leitman et al., 1986).

5.2 Signalisation du récepteur NPR-C

Le récepteur NPR-C a tout d'abord été identifié comme récepteur de clairance des peptides natriurétiques. Toutefois, il est maintenant prouvé que NPR-C est couplé à l'inhibition de l'AC (Anand-Srivastava et Trachte, 1993; Tseng et al., 1990). En effet, Anand-Srivastava et al. en ont fait la démonstration par leur étude de l'effet d'ANP sur l'activité de l'adénylate cyclase dans des myocytes ventriculaires et auriculaires de cœurs de rats nouveau-nés. Ils ont montrés que l'ANP inhibait de manière dose-dépendante l'activité de l'AC. De plus, l'ANP inhiba l'effet activateur de l'isoprotérénol et de la forskoline (Anand-Srivastava et Cantin, 1986). Par la suite, la preuve de l'implication de la protéine Gi dans l'inhibition de l'AC par l'ANP fut apportée par l'utilisation de la toxine pertussis qui catalyse l'ADP ribosylation de la protéine Gi, ce qui empêche celle-ci d'échanger son GTP lié pour un GDP et ainsi d'inhiber l'AC. Anand-Srivastava et al. montrèrent, en 1987, que la toxine pertussis atténua l'inhibition de l'AC par différentes doses d'ANP (Anand-Srivastava, Srivastava, et Cantin, 1987). Ces résultats appuyèrent fortement l'hypothèse qu'un récepteur à l'ANP est couplé à la voie de l'AC par la protéine Gi. Ce fut l'utilisation de l'agoniste sélectif C-ANP₄₋₂₃ (Maack et al., 1987) qui prouva que c'était le récepteur NPR-C. En effet, l'activation du récepteur NPR-C par C-ANP₄₋₂₃ provoque l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC) par la voie de la protéine G inhibitrice (Gi) ce qui a pour effet d'inhiber la production AMP_c (Anand-Srivastava, Gutkowska, et Cantin, 1991). De plus, l'analyse du domaine cytoplasmique du récepteur NPR-C résulta en l'identification de séquences activatrices de la protéine Gi (Murthy et Makhoulf, 1999; Pagano et Anand-Srivastava, 2001). Pagano et al. identifièrent quatre régions du domaine cytoplasmique ayant des similarités avec les séquences d'activation de la protéine Gi trouvées chez le récepteur au facteur de croissance apparenté à l'insuline (IGFR) (Pagano et Anand-Srivastava, 2001). Les séquences peptiques correspondant à ces régions ont été synthétisées. Les peptides contenant les séquences d'activation ont inhibé l'activité de l'AC, alors qu'aucuns peptides ayant une séquence d'activation incomplète n'a inhibé l'activité de l'AC. Ces résultats prouvent que la région cytoplasmique de 37 aa du récepteur NPR-C contient des séquences activatrices fonctionnelles de la protéine Gi qui sont

responsables de l'inhibition de l'AC. En plus, d'inhiber l'AC, NPR-C active également la voie de la PLC. En 1989, Murad et al. ont apporté les premières évidences montrant que NPR-C active l'isoforme β de la PLC par l'activation d'une protéine G (Hirata, Chang, et Murad, 1989). L'ANP augmenta la formation d'inositol phosphate et l'activité de la GTPase dans des homogénats de cellules aortiques du muscle lisse de culture bovine. Puisqu'il était déjà prouvé que NPR-C est couplé à la protéine G_i , il fut suggérer que NPR-C était couplé à la voie de la PLC par l'intermédiaire de la protéine G_i . Murthy et Makhoul en firent la démonstration en 1999 lorsqu'ils testèrent l'effet de différents peptides correspondant à des séquences activatrices de G_i du domaine cytoplasmique du récepteur NPR-C sur l'activité de la PLC- β . Ces peptides inhibèrent la formation d' IP_3 , un indicateur de l'activité de la PLC- β dans des membranes de muscle lisse et dans les cellules du muscle lisse de *tenia coli* (Murthy et Makhoul, 1999). Toutefois, les mécanismes impliqués restaient encore inconnus. Hirata et al. ont montré en 1989 qu'un analogue de peptide auriculaire tronqué à la région cytosolique liant spécifiquement le récepteur NPR-C, l'ANP₁₀₃₋₁₂₃ stimulait le renouvellement de PI en présence de nucléotides guanines dans les homogénats de cellules de muscle lisse d'aorte bovine (Hirata, Chang, et Murad, 1989). Par la suite Abdel-Latif suggéra, en 2001, que le cAMP et le cGMP régulaient le renouvellement du phosphatidylinositol (PI) (Abdel-Latif, 2001). Face aux résultats de ces études, Mouawad et al. suggérèrent, en 2004 que le récepteur NPR-C activait la signalisation liée à la PLC en régulant à la baisse le taux de cAMP (Mouawad, Li, et Anand-Srivastava, 2004). Ils montrèrent que le fragment C-ANP₄₋₂₃ stimule l'activité de la PLC (par la formation d' IP_3) de manière dose et temps-dépendante et que le traitement des cellules à la toxine pertussis abolit totalement la stimulation d' IP_3 par le C-ANP₄₋₂₃. Par leurs observations, Mouawad et al. apportèrent les premières évidences que le récepteur NPR-C active la signalisation liée à la PLC en diminuant le taux de cAMP (Mouawad, Li, et Anand-Srivastava, 2004). Leurs résultats furent appuyés par l'ablation du récepteur NPR-C, dans des cellules A10, réalisée par utilisation d'oligonucléotides antisens du récepteur NPR-C ce qui atténua l'inhibition de l'AC sans affecter la stimulation de l'AC régulée par le récepteur β -adrénergique (Palaparti, Li, et Anand-Srivastava, 2000).

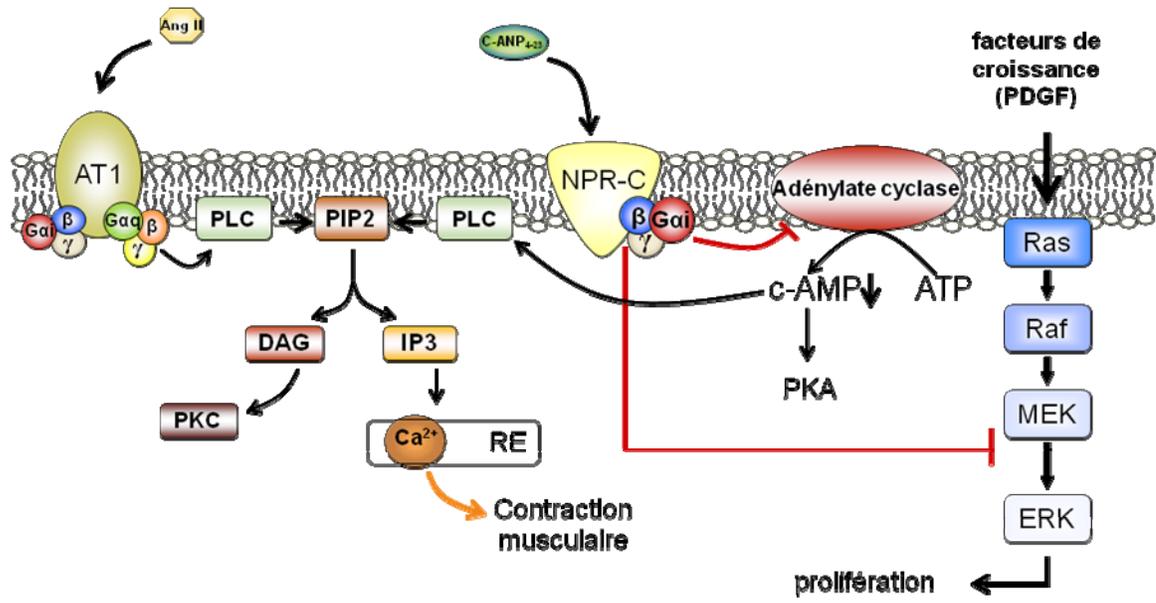


Figure 4: Signalisation du récepteur NPR-C

5.3 Rôle physiologique de NPR-C

Bien que Maack et al. (Maack et al., 1987) est tout d'abord été identifié NPR-C comme un récepteur biologiquement silencieux, plusieurs recherches ont rapporté des rôles physiologiques associés à ce récepteur. L'établissement d'une lignée dont le gène *NPR-C* est invalidé chez la souris apporta plusieurs éléments de réponse (Matsukawa et al., 1999). Des malformations squelettiques profondes chez les souris *NPR-C*^{-/-} démontrent que NPR-C joue un rôle important dans la formation osseuse. Anand-Srivastava et al. ont quant à eux prouvé que l'activation de NPR-C par C-ANP₄₋₂₃ inhibait la sécrétion de progestérone dans les cellules de tumeur de Leydig (Anand-Srivastava, Sairam, et Cantin, 1990). D'autres études montrent que l'ANP en se liant à NPR-C inhibe la prolifération astrogliale chez les rats (Levin et Frank, 1991; Nussenzveig, Lewicki, et Maack, 1990). NPR-C inhibe également la prolifération des CMLV et des cellules endothéliales (Cahill et Hassid, 1991; Itoh, Pratt, Ohno, et Dzau, 1992). Des études suggèrent que l'ANP inhibe la relâche de l'adrénaline dans les canaux déférents de lapin et les cellules phéochromocytomes (PC12) traitées au facteur de croissance nerveux (NGF) (Drewett, Trachte, et Marchand, 1989; Drewett, Ziegler, Marchand, et Trachte, 1989). Kanwal et al.

ont rapporté que l'activation du récepteur NPR-C par un fragment de 15 aa correspondant à la région cytosolique juxtamembranaire de NPR-C diminue l'afflux de dopamine dans les cellules phéochromocytomes (PC12) (Kanwal, Lowe, et Trachte, 1999). Mises ensembles ces deux études suggèrent que le récepteur NPR-C joue un rôle régulateur des effets neuromodulateurs des peptides natriurétiques. Dans le système gastrique, NPR-C joue également un rôle au niveau de la sécrétion de la bile par le foie. Sabbatini et al. ont prouvé que l'action inhibitrice du CNP sur la régulation de la sécrétion de bile était relayée par le récepteur NPR-C (Sabbatini et al., 2003). L'utilisation du C-ANP₄₋₂₃, l'agoniste sélectif de NPR-C diminua la sécrétion de la bile autant que son administration combinée au CNP suggérant ainsi un rôle prépondérant du récepteur NPR-C au niveau du foie.

5.4 Régulation du récepteur NPR-C en condition pathologique

Le récepteur NPR-C peut être positivement ou négativement régulés dans les pathologies associées à une augmentation des taux plasmiqes d'ANP (Anand-Srivastava et Trachte, 1993). Par exemple, l'ARNm du récepteur NPR-C est régulé à la baisse dans l'aorte de rats SHR prédisposés aux accidents vasculaires (stroke-prone SHR, SHR-SP). De plus, le traitement des rats SHR-SP avec un antagoniste du récepteur AT1, le TCV-116 renverse la régulation à la baisse de l'ARNm de NPR-C (Yoshimoto et al., 1996). Cette étude suggère que la régulation à la baisse de l'ARNm du récepteur NPR-C est régulée par des mécanismes moléculaires impliquant l'Ang II. Similairement, une régulation de NPR-C à la baisse fut observée dans les aortes de rats hypertendus DOCA-Salt (Naruse, Yoshimoto, Tanabe, et Naruse, 1998). De plus, NPR-C est régulé à la baisse dans les poumons et le cortex rénal des rats hypertendus DOCA-Salt alors que le taux de ANP est augmenté (Liu LM, et Yoshimi T., 1995). Ces études suggèrent que l'augmentation de l'ANP plasmiqie pourrait être responsable de la régulation à la baisse du récepteur NPR-C en condition pathologique au niveau vasculaire. Par contre, aucune étude n'a été faite afin de déterminer si NPR-C est régulé à la baisse dans les CMLV de SHR. Néanmoins, Anand-Srivastava a démontré que dans des CMLV de type A10 traitées C-ANP₄₋₂₃, le récepteur NPR-C/système AC/AMP protéine Gi était négativement régulé (Anand-Srivastava, 2000). De plus, en présence d'Ang II, C-ANP₄₋₂₃ régule positivement le

récepteur NPR-C/système AC/AMP protéine Gi indiquant que l'activation du récepteur NPR-C antagoniser les effets physiologiques de l'Ang II sur la pression artérielle (Anand-Srivastava, 2000). En effet, Hobbs et al. montrèrent en 2004 que l'activation du récepteur NPR-C par le C-ANP₄₋₂₃ et le CNP induisaient une baisse de pression de perfusion coronaire et diminuaient significativement la taille de l'infarctus dans les cœurs isolés de Langendorff (Hobbs, Foster, Prescott, Scotland, et Ahluwalia, 2004). Ces résultats suggèrent que l'activation de NPR-C peut diminuer la pression artérielle. En 2007, le même groupe expérimenta l'effet d'antagonistes de NPR-C sur l'activité vasodilatatrice de CNP dans les artères de résistances mésentériques de rats. L'antagoniste M372049 inhiba de manière dose dépendante l'effet vasorelaxant du peptide CNP (Villar et al., 2007). Ces études laissent penser que CNP/NPR-C joue un rôle majeur dans la régulation de la pression artérielle. De plus, les auteurs suggèrent qu'il faudrait d'autres études afin d'élucider le rôle de la signalisation CNP/NPR-C dans la régulation de la pression artérielle puisque selon eux celle-ci y joue un rôle fondamentale.

5.5 Le récepteur NPR-C et le remodelage vasculaire

Prins et al. ont montré en 1996 que l'ANP, mais également le fragment C-ANP₄₋₂₃ jouent un rôle anti-mitogénique dans les astrocytes (Levin et Frank, 1991). Ils ont par la suite montré que l'ANP et le C-ANP₄₋₂₃ inhibait l'activité et la phosphorylation de la MAPK induite par les agents mitogéniques ET-3, PDGF et le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Prins et al., 1996). Ils ont aussi prouvé que l'inhibition de la voie de MAPK est due à l'inhibition de la MAP kinase MEK. Puisque l'action inhibitrice du fragment C-ANP₄₋₂₃ s'est démontré être équivalente à celle de l'ANP, cette étude suggère fortement que l'action anti-mitogénique de l'ANP est relayée par le récepteur NPR-C. L'ANP a également des effets anti-prolifératifs dans plusieurs tissus dont les cellules endothéliales, les fibroblastes cardiaques et les cellules du muscle lisse vasculaire (Cao et Gardner, 1995; Morishita et al., 1994; Suhasini, Li, Lohmann, Boss, et Pilz, 1998). De plus, plusieurs études prouvent que l'ANP peut également inhiber l'hypertrophie des myocytes cardiaques (Calderone, Thaik, Takahashi, Chang, et Colucci, 1998; Horio et al., 2000; Silberbach et al., 1999).

Hashim et al. ont précédemment montré que l'activation du récepteur NPR-C par C-ANP₄₋₂₃ permet de réduire l'augmentation de la prolifération induite par les peptides vasoactifs (Ang II, ET-1 et AVP) (Hashim, Li, et Anand-Srivastava, 2006). En effet, la mesure de la synthèse d'ADN déterminée par incorporation de thymidine radioactive montra que l'augmentation de la synthèse d'ADN induite par les peptides vasoactifs est atténuée par la présence de C-ANP₄₋₂₃. De plus, l'augmentation de la synthèse d'ADN causée par les peptides vasoactifs fut inhibée par l'inhibiteur de MEK de la voie des MAPK, le PD-98059 et l'inhibiteur de la voie de la PI3K, le wortmannin. Cette inhibition fut potentialisée par un fragment peptidique de 12 aa correspondant à la région cytoplasmique du récepteur NPR-C incluant une séquence activatrice complète de Gi (K⁴⁶¹-H⁴⁷²), le peptide 1 suggérant que le récepteur NPR-C diminue la prolifération en régulant la voie des MAPK et la voie de la PI3K. Afin de confirmer cette hypothèse, l'effet du peptide 1 sur les taux de phosphorylation des protéines ERK1/2 et AKT ainsi que sur l'expression protéique de Gi fut étudié. La présence de ce peptide inhiba l'augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 et d'AKT et de l'expression de la protéine Gi induite par les peptides vasoactifs. Ces résultats suggèrent que l'activation du récepteur NPR-C inhibe la prolifération induite par les peptides vasoactifs par l'intermédiaire de l'inhibition de la protéine Gi et des voies MAPK/PI3K/AKT (Hashim, Li, et Anand-Srivastava, 2006). Il reste cependant à déterminer si l'activation du récepteur NPR-C peut diminuer la prolifération des CMLV en condition pathologique, c'est-à-dire dans les CMLV de rats SHR et le cas échéant, déterminer par quelles voies signalétiques. Toutefois, la littérature suggère que l'activation du récepteur NPR-C pourrait être bénéfique pour contrecarrer l'augmentation de la prolifération lors du remodelage vasculaire.

Lorsqu'une artère subit du remodelage vasculaire, l'augmentation de la prolifération des CMLV n'en ait pas la seule cause. L'hypertrophie des CMLV est également une cause de remodelage vasculaire. Li et al. ont montré de façon similaire que l'activation du récepteur NPR-C inhibait l'hypertrophie vasculaire induite par les peptides vasoactifs des cellules A10 (Li, Hashim, et Anand-Srivastava, 2006). La mesure de la synthèse protéique déterminée par le taux d'incorporation de leucine radioactive montra que l'activation du

récepteur NPR-C par C-ANP₄₋₂₃ inhibe l'augmentation de la synthèse protéique induite par les peptides vasoactifs. L'augmentation de la synthèse protéique fut inhibée par la présence de PD-98059 et du wortmannin, la présence du peptide 1 potentialisa cette inhibition. De plus, le peptide 1 atténua l'augmentation de l'expression de la protéine Gq et des taux de phosphorylation d'ERK1/2 et d'AKT induite par les peptides vasoactifs. Cette étude apporta ainsi les évidences que NPR-C atténua la synthèse protéique induite par les peptides vasoactifs par l'intermédiaire de la régulation de l'expression de la protéine Gq et des voies signalétiques MAPK/P13K/AKT. Les actions anti-prolifératives et anti-hypertrophiques discutées dans ces articles portent à croire que l'investigation de nouvelles thérapies ciblant le récepteur NPR-C pourraient être ce démontrer fructueuses et très utile.

6. Le cycle cellulaire

La prolifération est sous le contrôle du cycle cellulaire qui se définit comme l'ensemble des phases par lequel une cellule se divise pour donner deux cellules-filles. Il contribue au développement de l'organisme, à la réparation des dommages à l'ADN, à la régénération tissulaire, à la croissance et la prolifération cellulaire. Il est principalement divisé en deux événements majeurs : l'interphase et la mitose. L'interphase est l'intervalle entre la fin d'une division et le début d'une autre. Pendant l'interphase, il y a réplication de l'ADN et croissance cellulaire. Cette phase est la succession de trois différentes phases G₁, S et G₂. La phase G₁ est une phase de croissance pour la cellule en vue de la réplication de l'ADN qui a lieu à la phase S. (Les différentes phases du cycle cellulaire sont illustrées à la figure 5.)

Situé à la fin de la phase G₁, le point de restriction est le point d'entrée irréversible en prolifération. Il empêche la division lorsque, par exemple l'ADN est endommagé (Pardee, 1974). La progression du cycle cellulaire vers la phase S se fait uniquement lorsque les dommages à l'ADN ont été réparés. Si les dommages à l'ADN sont irréversibles la cellule retournera en phase G₀/G₁. La phase S est suivie d'une phase de croissance et de préparation à la division : la phase G₂. Cette phase permet de vérifier encore une fois l'intégrité moléculaire de la cellule avant de procéder à la mitose. La mitose

(phase M) termine le cycle cellulaire par la division de la cellule en deux cellules-filles. Une fois sa division terminée, la cellule peut commencer un autre cycle ou entrer dans une phase de quiescence, appelée G_0 . Cette phase ne fait pas partie intégrante du cycle cellulaire, mais une cellule dans cette phase peut réintégrer le cycle cellulaire suite à différents stimulus.

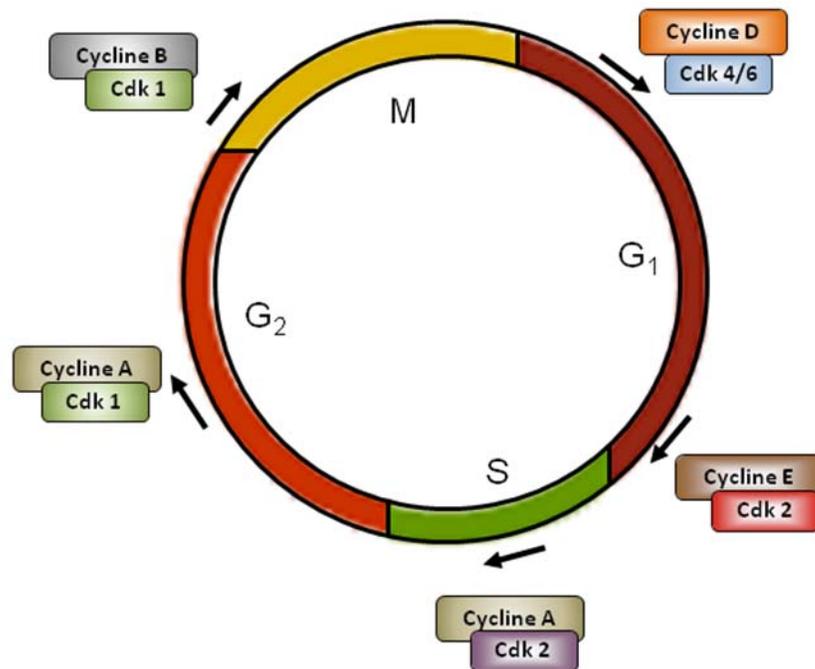


Figure 5: Les phases du cycle cellulaire et les complexes qui les régulent

6.1 Les protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est sous le contrôle d'un nombre important de protéines. L'expression de ces protéines est régulée de façon très transitoire et dans un ordre très précis. La progression du cycle cellulaire est assurée la phosphorylation et déphosphorylation des kinases cyclines-dépendantes (cdk) permettant l'activation

réversible de ces protéines (Nurse, 1996). Ce jeu subtil d'activation et inactivation est assuré par l'association des cdk à une cycline correspondante. La synthèse et la dégradation des différentes cyclines permettent leur expression seulement à des moments précis du cycle cellulaire (Glotzer, Murray, et Kirschner, 1991). Elles dictent l'affinité des cdk à leur substrat activant ainsi les événements spécifiques à chaque étape du cycle cellulaire (voir la figure 5). L'activité des complexes cdk/cycline est également régulée par deux familles d'inhibiteurs dépendants des cyclines, les CKI. Les membres de la famille des Ink4 inhibent la formation des complexes avec les kinases cdk4 et cdk6. Quant à ceux de la famille Cip/Kip, ils inhibent les complexes cdk/cycline retardant ainsi la progression du cycle cellulaire (Sherr et Roberts, 1999). De plus, la localisation au noyau ou au cytoplasme d'une cycline est un contrôle supplémentaire utilisé par la cellule afin de réguler précisément la progression du cycle cellulaire (Gladden et Diehl, 2005; Porter et Donoghue, 2003).

6.2 Entrée en G₁

Une cellule passe de la phase G₀ vers la phase G₁ sous l'influence de stimuli extracellulaires. L'entrée en phase G₁ peut être induite des facteurs mitogéniques ou encore par des facteurs de croissance. Les facteurs de croissance peuvent induire une entrée en prolifération en liant leur récepteur spécifique. Ceci a pour effet d'activer la voie des MAP kinases. Une fois activée, cette voie active le facteur de transcription myc qui promeut la transcription du gène de la cycline D. Il est admis que les cyclines D couplent la signalisation extracellulaire à la machinerie du cycle cellulaire (Sherr, 1993).

6.3 Transition G₁-S

Pour passer en phase S et de ce fait entamer la division de façon irréversible, les cellules doivent passer le point de restriction. Pour ce faire, l'assemblage des complexes cdk/cyclines est critique. Dans un premier temps, la cycline de type D (cycline D1, D2 ou D3) forme un complexe avec cdk4 ou cdk6. Ce complexe a pour but principal de phosphoryler la protéine du rétinoblastome (Rb) (Matsushime et al., 1994). Lorsque la

protéine Rb est sous sa forme hypophosphorylée, elle bloque la progression du cycle cellulaire en s'associant au facteur d'élongation 2 (E2F). La phosphorylation de Rb permet la relâche de E2F et par le fait même la transcription coordonnée de plusieurs gènes dont l'activité est requise pour la phase S dont notamment les gènes de la cycline A, de la cycline E et des sous-unités de l'ADN polymérase (Sun, Bagella, Tutton, Romano, et Giordano, 2007). Donc, le complexe cdk4/cycline D phosphoryle la protéine Rb initiant ainsi l'activation partielle de la transcription des gènes de la phase S. L'activité du complexe cdk4/cycline D entraîne également l'activation du complexe cdk2/cycline E. Ce dernier mène à l'activation complète de E2F en phosphorylant à son tour la protéine Rb. A cette étape la protéine Rb est complètement phosphorylée, ce qui permet l'activation complète des gènes de la phase S (Buchkovich, Duffy, et Harlow, 1989; Chen, Scully, Shew, Wang, et Lee, 1989; Genovese, Trani, Caputi, et Claudio, 2006). La prolifération est alors irrémédiablement amorcée. La figure 6 illustre clairement les étapes nécessaires à la transition de la phase G₁ à la phase S.

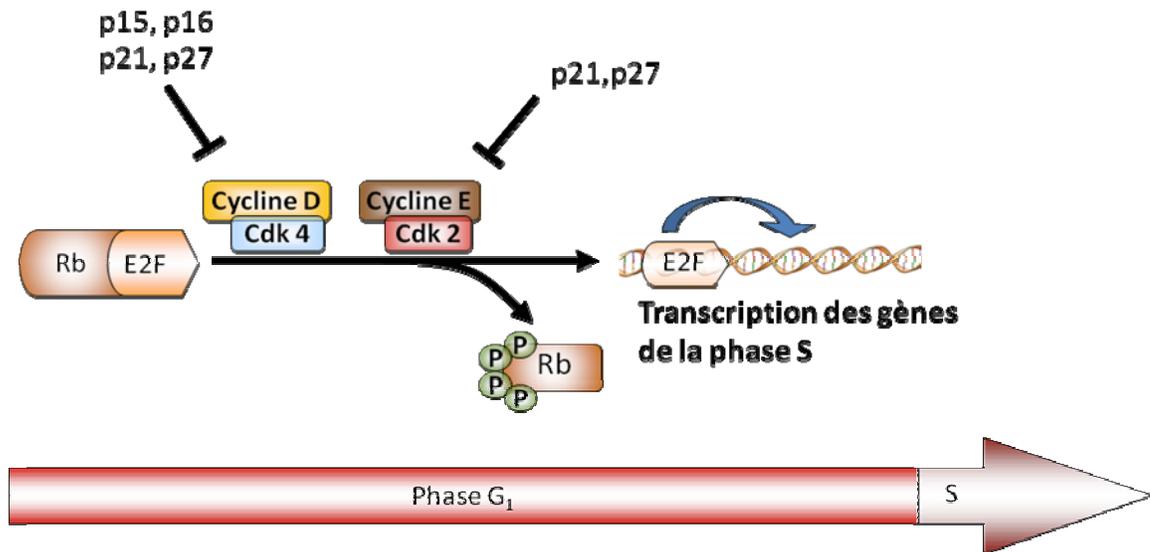


Figure 6 : Transition de la phase G₁ à la phase S du cycle cellulaire

6.4 Progression du cycle cellulaire

Les différents complexes cdk/cyclines sont essentiels au déroulement des autres phases. En effet, les complexes spécifiques (cycline A/cdk2) à la phase S phosphorylent des substrats qui participent à la réplication de l'ADN. De même manière lorsque la réplication de l'ADN est terminée, d'autres complexes (cdk1/cycline A ou B) initient et régulent les différents événements de la mitose. La phosphorylation de substrats conduisant à la phase M assure la transition G₂/M. La protéine Rb reste hyperphosphorylée pendant les phases S, G₂ et M. Toutefois, lorsque le cycle est terminé elle est déphosphorylée (Buchkovich, Duffy, et Harlow, 1989; Chen, Scully, Shew, Wang, et Lee, 1989).

6.5 Les voies signalétiques qui contrôlent le cycle cellulaire

L'activation de la voie signalétique de l'Ang II est impliquée dans la prolifération. Les mécanismes moléculaires impliqués sont la stimulation de la phospholipase C et la phosphorylation de plusieurs sérine/thréonine et tyrosine kinases. L'activation de ces protéines résulte en l'activation des voies de la MAPK, les voies des JAK/STAT, de la voie de la PI3K/AKT ce qui active finalement les facteurs de transcription c-Fos, C-Jun et c-Myc (Seta, Nanamori, Modrall, Neubig, et Sadoshima, 2002; Touyz et Schiffrin, 2000).

Les premières évidences suggérant que la signalisation moléculaire de la voie de ERK1/2 des MAPK était cruciale dans le contrôle de la prolifération cellulaire proviennent de l'observation que ces kinases sont fortement et rapidement phosphorylées en réponse à des stimuli d'origine mitogénique (Cooper, Sefton, et Hunter, 1984; Nakamura, Martinez, et Weber, 1983). Par la suite, d'autres études identifièrent un autre pic de phosphorylation plus faible, mais dont l'activité est soutenue tout au long de la phase G₁ (Kahan, Seuwen, Meloche, et Pouyssegur, 1992; Meloche, 1995; Meloche, Seuwen, Pages, et Pouyssegur, 1992). De plus, ces études mirent en évidence une corrélation entre l'habilité des facteurs extracellulaires à induire l'activation soutenue de ERK1/2 et la synthèse d'ADN. Par la suite, en 1997, Peeper et al. montrèrent que l'activation de la signalisation liée à la kinase Ras était essentielle pour que les cellules en quiescence amorcent leur entrée dans le cycle cellulaire et à leur passage à travers la phase G₁ (Peeper et al., 1997). Une étude plus

récente, effectuée par Yamamoto et al. et analysant systématiquement l'effet de la durée de l'activité de ERK1/2, confirma l'étude de Peeper et al. à l'effet activité de ERK1/2 est nécessaire à l'entrée en phase S (Yamamoto et al., 2006). L'expression de Ras s'est démontrée être suffisante à l'accumulation de la cycline D1 dans différents types cellulaires (Albanese et al., 1995; Arber et al., 1996; Filmus et al., 1994; Liu et al., 1995). De plus, Cheng et al. ont montré que l'activation de MEK1, en plus de favoriser l'accumulation de cyclines D, favorise l'assemblage du complexe cycline D1/cdk4 dans les fibroblastes (Cheng, Sexl, Sherr, et Roussel, 1998). Toutefois, les détails mécanistiques ne sont pas encore élucidés. D'autre part, ERK1/2 stimule la progression du cycle cellulaire en activant d'autres voies signalétiques. Sears et al. ont montré que l'activation de ERK1/2 augmentait remarquablement la stabilité de c-Myc (Sears et al., 2000). c-Myc est un proto-oncogène surexprimé dans de nombreux cas de cancer et qui a une grande influence sur la prolifération (Grandori, Cowley, James, et Eisenman, 2000; Patel, Loboda, Showe, Showe, et McMahon, 2004). En effet, son expression est fortement corrélée à la croissance cellulaire. La protéine c-Myc est absente chez les cellules quiescentes, mais son expression est induite par la présence de facteurs de croissance (Spencer et Groudine, 1991). c-Myc active entre autres la transcription des gènes codant pour de la cycline D, de cdk4, de la cycline E et des facteurs de transcription E2F (Grandori, Cowley, James, et Eisenman, 2000). En 2001, Sears et al. ont rapporté que Ras contrôle l'accumulation de c-Myc en stabilisant la phosphorylation de la sérine 62 de c-Myc, alors que la phosphorylation du résidu Thr58 par la glycogène-synthase kinase-3 (GSK3) est nécessaire à sa dégradation (Sears et al., 2000). De plus, leur étude montre que la régulation de la phosphorylation de ces sites peut être contrôlée par les effecteurs en amont de Ras, c'est-à-dire par la kinase Raf et la voie de la PI3K/AKT. En effet, la voie de la PI3K/AKT est également très importante dans la progression du cycle cellulaire. Des études ont clairement établi que l'activation de la PI3K régule positivement la progression de la phase G1 et la réentrée dans le cycle cellulaire (Jones et Kazlauskas, 2001; Kumar, Marques, et Carrera, 2006). La voie PI3K/AKT inactive les CKI p27 et p21 (Liang et Slingerland, 2003). Puisque p21 et p27 ont le rôle d'inhiber la progression du cycle cellulaire, leur inactivation par AKT diminue la durée de la transition G1 vers S.

6.6 Contrôle du cycle cellulaire et Hypertension

Chez un individu sain, le potentiel de prolifération des cellules du muscle lisse vasculaire est presque nul. Les cellules qui ne cyclent pas se trouvent dans une phase appelée G_0 , phase durant laquelle les cellules sont dites en quiescence. Le facteur de transcription E2F est maintenu inactif par la protéine Rb. Toutefois, l'hypertension est associée à une augmentation de la prolifération des CMLV (Intengan et Schiffrin, 2001). Tanner et al. ont prouvé en 2003 que la progression de la phase G_1 des CMLV de SHR est plus rapide que celles des WKY (Tanner, Greutert, Barandier, Frischknecht, et Luscher, 2003). C'est donc dire que l'augmentation de la prolifération des CMLV de rats SHR est due à une transition plus rapide de la phase G_1 vers la phase S. Des études démontrent que l'expression de certaines protéines de la phase G_1 , la cycline D1, cdk2 et la cycline E, la cycline A est accrue en condition pathologique (Lee, Kim, et Moon, 2009; Tanner, Greutert, Barandier, Frischknecht, et Luscher, 2003). Plusieurs facteurs pourraient expliquer la surexpression des composantes de la phase G_1 . Il est en effet démontré que l'angiotensine mène à une surexpression de la cycline D1 et de cdk2 dans les CMLV (Braun-Dullaues, Mann, Ziegler, von der Leyen, et Dzau, 1999). Kubo et al. suggèrent que la production endogène d'Ang II régule la progression de la phase G_1 à la phase S en augmentant l'activité de cdk2. Ils ont montré que l'activité de la kinase cdk2 est plus élevée dans les CMLV de SHR dont la production d'Ang II est augmentée en comparaison aux CMLV de WKY. De plus, leur étude montre que l'augmentation de l'activité de cdk2 pouvait être atténuée par un antagoniste du récepteur AT_1 , le CV11974 (Kubo et al., 2000). Des recherches supplémentaires seront nécessaires afin de déterminer l'implication d'autres voies signalétiques telles les voies des facteurs de croissances, de l'endothéline et des espèces réactives oxygénées. Cependant, il est établi que l'activation du récepteur NPR-C conduit à une inhibition de la prolifération, il semble particulièrement intéressant d'étudier son effet sur les composantes du cycle cellulaire. De plus, il est prouvé que l'ANP empêche la transition de la phase G_1 à S du cycle cellulaire dans les astrocytes en inhibant l'expression des composantes du cycle cellulaire (Pedram, Razandi, Hu, et Levin, 1998). Ces résultats suggèrent que l'activation de NPR-C dans les CMLV de SHR diminue la

prolifération en inhibant les composantes de la phase G_1 du cycle cellulaire puisqu'il s'agit des composantes qui promeuvent la transition G_1 vers S.

7. Hypothèse et Objectifs

L'augmentation de la prolifération des CMLV est un processus impliqué dans plusieurs maladies cardiovasculaires dont l'hypertension. Nous avons précédemment montré dans une étude *in vitro* que l'activation du récepteur NPR-C par C-ANP₄₋₂₃ diminue la prolifération induite par les peptides vasoactifs. Dans cette présente étude nous voulons déterminer si l'activation de NPR-C inhibe la prolifération des CMVL provenant de rats SHR. De plus, des études montrent que l'expression des composantes de la phase G₁ du cycle cellulaire est augmentée dans les CLMV de SHR. Nous voulons donc également déterminer l'implication des composantes dans l'augmentation de la prolifération des CMLV de SHR comparativement à celles des WKY et l'effet de l'activation du récepteur NPR-C sur leur expression.

Nous allons aussi déterminer l'implication des voies signalétiques responsables de l'effet antiprolifératif du fragment C-ANP₄₋₂₃ dans la régulation des composantes de la phase G₁ du cycle cellulaire. Tout d'abord, il est prouvé que l'activation du récepteur NPR-C par C-ANP₄₋₂₃ diminue l'augmentation de la prolifération induite par l'Ang II *via* la régulation de l'expression de la protéine Gi. Nous voulons donc déterminer si NPR-C module l'expression des composantes du cycle cellulaire *via* la diminution de l'expression de la protéine Gi. Dans un deuxième temps, il est prouvé que le C-ANP₄₋₂₃ inhibe l'augmentation de la phosphorylation de ERK et d'AKT induite par les peptides vasoactifs dans les cellules de type A10. Nous voulons déterminer, l'effet du C-ANP₄₋₂₃ sur les taux de phosphorylation des protéines ERK1/2 et AKT dans les CMLV de SHR et l'implication de ces voies dans la régulation de l'expression des composantes de la phase G₁ par le récepteur NPR-C.

Finalement, nous nous intéressons au rôle de l'angiotensine endogène puisque des études rapportent que l'angiotensine II (Ang II) endogène joue un rôle dans la prolifération des CMLV. De plus, il est également prouvé que l'Ang II augmente l'expression des certaines protéines de la phase G₁ du cycle cellulaire. Cette présente étude vise donc

également à déterminer le rôle de l'Ang II endogène dans la surexpression des composantes du cycle cellulaire.

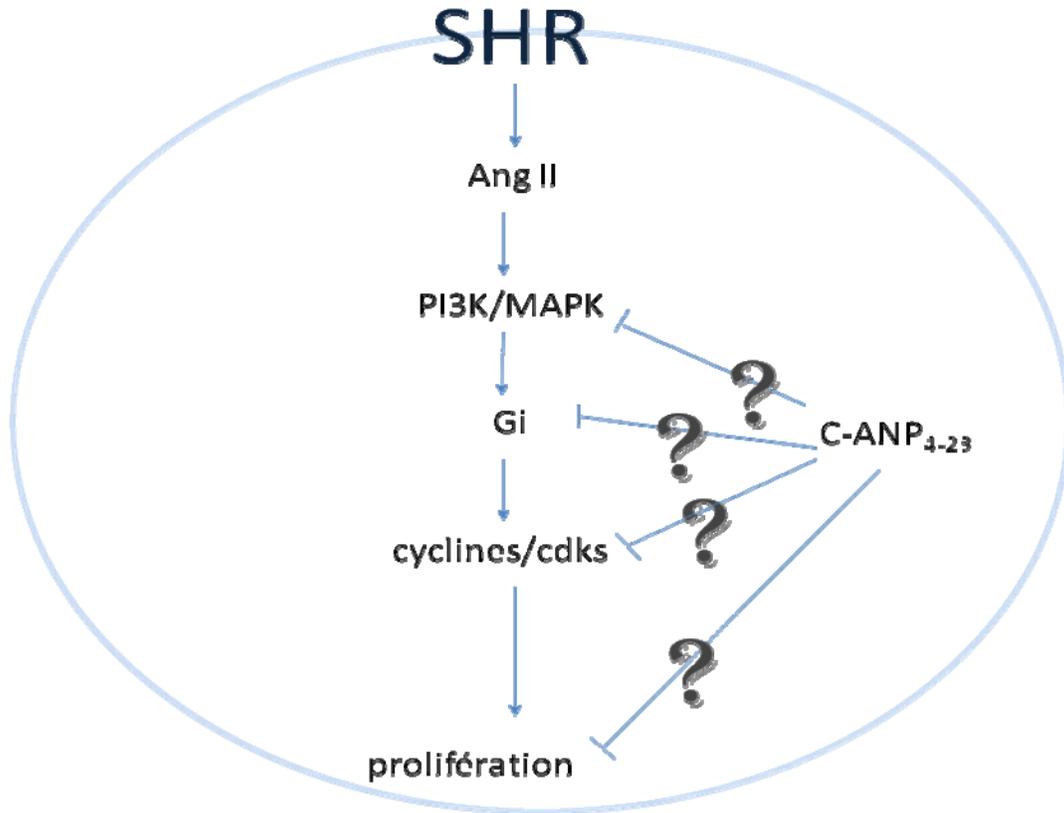


Figure 7 : Schéma illustratif des objectifs

CHAPITRE 2.

ARTICLE

Natriuretic peptide receptor-C activation inhibits hyperproliferation of vascular smooth muscle cell from spontaneously hypertensive rats: molecular mechanisms

Jasmine El Andalousi, Yuan Li et Madhu B. Anand-Srivastava

(Article soumis pour publication à *Journal of Biological Chemistry*)

**NATRIURETIC PEPTIDE RECEPTOR-C ACTIVATION INHIBITS
HYPERPROLIFERATION OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS FROM
SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS: MOLECULAR MECHANISMS**

Jasmine El Andalousi, Yuan Li and Madhu B. Anand-Srivastava*

Department of Physiology, Université de Montréal, Quebec, Canada

Running Head: NPR-C, cell cycle protein expression and proliferation

*Correspondence and request for printing: Dr Madhu B. Anand-Srivastava, Department of
Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-Ville Montréal
(Québec) H2X 1H1, Canada, Tel: +1 514-343-2091, Fax: +1 514-343-2111

The present study was undertaken to investigate if C-ANP₄₋₂₃, a specific agonist of natriuretic peptide receptor-C (NPR-C) that was shown to inhibit the vasoactive peptide-induced hyperproliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) could also attenuate the enhanced proliferation of aortic VSMC from SHR and to further explore the underlying mechanisms responsible for this response. Aortic VSMC from SHR exhibited enhanced proliferation as compared to VSMC from WKY as determined by [³H]thymidine incorporation and was attenuated by C-ANP₄₋₂₃ in a concentration-dependent manner. The maximal inhibition (35%) was observed at a concentration of 10⁻⁷M of C-ANP₄₋₂₃. Furthermore the expression of cyclin D1, cyclin-dependent kinase 2 (cdk2) and phosphorylated retinoblastoma protein (pRb) was significantly enhanced in VSMC from SHR compared to WKY and was attenuated by C-ANP₄₋₂₃. In addition, the inhibitors of cdk4/cyclin D1 (NSC 625987) and cdk2 (NU2058) also attenuated the enhanced proliferation of VSMC from SHR in a concentration-dependent manner. VSMC from SHR also exhibited an enhanced phosphorylation of ERK1/2 and AKT as compared to WKY which was attenuated by C-ANP₄₋₂₃. Furthermore, the enhanced expression of cyclin D1, cdk2 and pRb in VSMC from SHR was also attenuated by pertussis toxin that inactivates G_i protein, PD 98095, a MEK inhibitor, wortmannin, PI3K inhibitor as well as by losartan, an AT1 receptor antagonist. These results suggest that NPR-C activation attenuates the enhanced proliferation of VSMC from SHR which may be attributed to G_i /MAP

kinase/PI3K-mediated inhibition of the expression of cell cycle components.

Natriuretic peptides (NP) are a family of three peptide hormones termed atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), and C-type natriuretic peptide (CNP) (1-3). All of these peptides are produced in mammalian hearts including humans (4). ANP regulates a variety of physiological parameters including blood pressure, progesterone secretion, renin release, vasopressin release and endothelin release by interacting with receptors on the plasma membrane either to alter the levels of second messengers such as cAMP, cGMP (5-11) or to affect ion channels (12).

Three subtypes of natriuretic peptide receptors (NPR): NPR-A, NPR-B and NPR-C have been described (12). NPR-A and NPR-B are membrane guanylyl cyclases, whereas NPR-C (clearance receptor) lacks guanylyl cyclase activity. NPR-A catalyzes the production of cGMP in response to ANP and BNP, whereas NPR-B is the target for CNP. NPR-C appears to exist as a disulfide-linked homodimer with a molecular mass of 64–66 KDa and is coupled to adenylyl cyclase inhibition through inhibitory guanine nucleotide-regulatory protein G_i (13,14) or to activation of phospholipase C (15). However, we have recently shown that NPR-C-mediated decrease in cAMP levels contributes to the activation of PLC signaling and suggested a cross talk between NPR-C-mediated adenylyl cyclase and PLC signaling pathways (16). NPR-C has a single transmembrane domain, an extracellular domain and a short 37 amino acid cytoplasmic domain or tail (17). The cytoplasmic domain of NPR-C contains

several G_i activator sequences which were shown to inhibit adenylyl cyclase activity in heart particulate fractions and A-10 VSMC (18).

Increased proliferation in vascular smooth muscle cells (VSMC) is implicated in the arterial remodelling occurring in hypertension (19). VSMC from spontaneously hypertensive rats (SHR) have been shown to proliferate to a greater extent as compared to VSMC from normotensive wistar-kyoto rats (WKY) (20) which was attributed to the increased production of vasoactive peptides (21). We have previously shown that C-ANP₄₋₂₃ as well as by small peptide fragments of cytoplasmic domain of NPR-C containing G_i activator sequences attenuated the vasoactive peptides including Angiotensin II (Ang II), endothelin-1 (ET-1) and Arginine-Vasopressin (AVP)-induced increased proliferation of A10 VSMC via MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathways (22).

Proliferation is driven by the formation of complexes between cyclin dependent kinase (cdk) and cyclins. D type-cyclins are associated with cdk4 or cdk6 (23). This complex initiate the phosphorylation of the retinoblastoma protein (Rb) which result in the partial release of the transcription factor (E2F) and hence in the transcription of S-phase genes (24). In late G₁, cdk2 form a complex with cyclin E resulting in the release of E2F (23,25). Previous studies have shown that cell cycle components from G₁-phase were up-regulated in VSMC from SHR (26,27). In addition, Ang II has been shown to increase the expression of the cell cycle components in VSMC (28). Taken together, it was interesting to investigate if NPR-C activation by C-ANP₄₋₂₃ could also inhibit the enhanced proliferation of VSMC from SHR and to further explore the implication of cell cycle components and MAP kinase/PI3kinase pathways as underlying mechanism/s responsible for this response.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials The antibodies and Western blotting reagents were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). All other chemicals were purchased from Sigma.

Cell culture and incubation VSMC from 12-week-old SHR and their age-matched WKY rats were cultured from aortas as described previously (29). The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing normal glucose (5.5 mM), 10% FBS, and 1% antibiotic-antimycotic (containing penicillin, streptomycin, and amphotrecin B) at 37°C in 95% room air-5% CO₂. The cells were passaged upon reaching confluence with 0.5% trypsin and used between *passages* 3 and 12. The confluent VSMCs after 24 h of incubation in a serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium were then incubated in the absence or presence of various concentration of C-ANP₄₋₂₃, pertussis toxin (100 ng/ml), PD98059 (10 μmol), wortmannin (10 μM) or losartan (10⁻⁵M).

[Methyl-³H]thymidine incorporation DNA synthesis was evaluated by incorporation of [³H]thymidine into cells. Subconfluent VSMC from SHR and WKY rats were plated in 6-well plates for 24 h and were serum deprived for 24 h to induce cell quiescence. The cells were then incubated with various concentration of NSC 625987, NU2058 or C-ANP₄₋₂₃. [³H]thymidine (1 μCi) was added and further incubated for 4 h before the cells were harvested. The cells were rinsed twice with ice-cold PBS and incubated with 5% trichloroacetic acid for 1 h at 4°C. After being washed twice with ice-cold water, the cells were incubated with 0.4 N sodium hydroxide solution for 30 min at room temperature, and radioactivity was determined by liquid scintillation counter.

Cell lysis and Western blotting Cells incubated in the absence or presence of various agents were washed three times with 1X PBS and lysed in 30 μl of buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM NaCl, 1 mM Na orthovanadate, 10 mM Na fluoride, 10 mM Na pyrophosphate, 2 mM ethylene, bis(oxyethylenenitrolo)tetracetic acid 2 mM ethylenediamine tetracetic acid, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μg/ml

aprotinin, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS), and 0.5 µg/ml leupeptin) on ice. The cell lysates were centrifuged at 12,000 g for 5 min at 4 °C. Protein concentrations were measured with the Bradford assay. Equal amounts of protein were subjected to 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), transferred to nitrocellulose membranes and incubated with the respective primary antibodies: cyclin D1 (DCS-6), cdk4 (DCS-35), cdk2 (D-12), p-Rb (Ser 249/Thr 252), Rb (IF8), p-Akt1/2/3 (Ser 473)-R, Akt1/2/3 (H-136), ERK 2 (C-14) and p-ERK (E-4). The antibody-antigen complexes were detected by second antibody, and protein bands were visualized by enhanced-chemiluminescence Western-blotting detection reagents from Santa Cruz Biotechnology. Quantitative analysis of specific bands was performed by densitometric scanning of the autoradiographs with an enhanced laser densitometer (LKB Ultrascan XL, Pharmacia, Dorval, Quebec, Canada) and quantified by using gel-scan XL evaluation software (version 2.1) from Pharmacia.

Statistical analysis Results are expressed as mean±SEM. Comparisons between groups were made with ANOVA in conjunction with the Newman-Keuls test. Results were considered significant at a value of $P < 0.05$.

RESULTS

Effect of C-ANP₄₋₂₃ on enhanced proliferation of VSMC from SHR. Since the activation of natriuretic peptide receptor-C (NPR-C) by C-ANP₄₋₂₃ has been shown to attenuate the enhanced proliferation of VSMC induced by vasoactive peptides Ang II, ET-1 and AVP in A10 VSMC (22), it was of interest to examine whether NPR-C activation could also decrease the proliferation of VSMC from SHR. To investigate this, the effect of various concentrations of C-ANP₄₋₂₃ on DNA synthesis was examined in VSMC from SHR and WKY rats. Results shown in figure 1 indicate that VSMC from SHR exhibit enhanced proliferation (by about 500%) compared to VSMC from WKY which was attenuated by C-ANP₄₋₂₃ in a concentration-dependent manner. At the optimal

concentration of 10^{-7} M the augmented proliferation of VSMC from SHR was decreased by about 35%.

Effect of C-ANP₄₋₂₃ on the expression of cell cycle components from G1-phase in VSMC from SHR. To investigate the mechanism by which NPR-C activation inhibits the enhanced proliferation of VSMC from SHR, we examined the effect of C-ANP₄₋₂₃ on the expression of the cell cycle proteins. As shown in figure 2, the expression of cyclin D1 and cdk2 was significantly enhanced by about 350% and 270% respectively in VSMC from SHR as compared to WKY and C-ANP₄₋₂₃ attenuated the enhanced expression by about 30% and 20% respectively. In addition, the expression of cdk4 protein was also significantly enhanced by about 150% in VSMC from SHR compared to WKY. However, C-ANP₄₋₂₃ was not able to decrease the enhanced expression of cdk4 protein. These results suggest that NPR-C activation decreased the expression of cell cycle components from G1-S phase. Furthermore, the expression of phosphorylated retinoblastoma protein (pRb) was enhanced by about 35% in VSMC from SHR which was also attenuated by C-ANP₄₋₂₃ (10^{-7} M) by about 30%. Since levels of phosphorylation of pRb protein is a marker of cell cycle progression, this result suggested that NPR-C activation leads to an inhibition of the cell cycle progression.

Effect of NSC 625987 and NU2058 on enhanced proliferation of VSMC from SHR. To investigate the implication of enhanced expression of cell cycle components in the hyperplasia of VSMC from SHR, we examined the effect of selective inhibitors of cdk4/cyclin D1 complex (NSC 625987) and cdk2 (NU2058) on DNA synthesis in VSMC from SHR and WKY rats. Results shown in figure 3 indicate that both the inhibitors NSC 625987 and NU2058 attenuated the enhanced proliferation of VSMC from SHR by 25 and 35% respectively whereas these inhibitors did not have any significant effect on the proliferation of VSMC from WKY rats.

Effect of pertussis toxin on the expression of cell cycle components in VSMC from SHR. We have previously shown the implication of

enhanced levels of $G_{i\alpha}$ proteins in the enhanced proliferation of VSMC from SHR (30). Since C-ANP₄₋₂₃ has been shown to decrease the enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins in VSMC from SHR (31), it was of interest to examine if C-ANP₄₋₂₃-induced decreased expression of G_i proteins contributes to the attenuation of the expression of cell cycle components in VSMC from SHR. As shown in figure 4, the treatment of VSMC from SHR with pertussis toxin attenuated the expression of cell cycle components, cyclin D1, cdk2 and pRb by about 30%, 25% and 30% respectively.

Effect of C-ANP₄₋₂₃ on the phosphorylation of ERK1/2 and AKT in VSMC from SHR. The implication of MAP kinase/PI3kinase in enhanced proliferation of VSMC has been well documented (32). Since, the short cytoplasmic domain peptide fragment of NPR-C consisting of 12 amino acids with G_i activator sequence attenuated the vasoactive peptide-induced ERK1/2 phosphorylation and proliferation of A10 VSMC (22), it was desirable to test if C-ANP₄₋₂₃-induced decreased proliferation of VSMC from SHR is attributed to its ability to attenuate the enhanced activity of MAP kinase/PI3kinase in VSMC from SHR. For this, the effect of C-ANP₄₋₂₃ on phosphorylation of ERK1/2 and AKT was examined and the results are shown in figure 5. As reported earlier (33), the phosphorylation levels of ERK1/2 as well as AKT were increased by about 50% in VSMC from SHR as compared to VSMC from WKY and this enhanced phosphorylation was abolished by C-ANP₄₋₂₃.

Implication of MAP kinase and PI3-kinase on the expression of cell cycle components in VSMC from SHR. To determine if C-ANP₄₋₂₃-evoked decreased activation of MAPK and PI3K contributes to the decreased expression of cell cycle components, the effects of PD 98059, a MEK inhibitor and wortmannin, a PI3K inhibitor on the expression of cell cycle components were examined in VSMC from SHR. As shown in figures 6 and 7, PD98059 (Fig 6) as well as wortmannin (Fig 7) inhibited the enhanced expression of cyclin D1, cdk2 and pRb by 30%, 20% and 30% respectively.

Implication of Angiotensin AT1 receptor in the enhanced expression of cell cycle components in VSMC from SHR. Ang II has been reported to increase the expression of cell cycle components in VSMC (28). Since the endogenous levels of Ang II are increased in VSMC from SHR compared to VSMC from WKY (21), it was of interest to examine if the enhanced expression of different cell cycle components in VSMC from SHR is attributed to the endogenous Ang II. For this, we examined the effect of losartan (AT1 inhibitor) on the expression of cell cycle components in VSMC from SHR. As shown in figure 8, losartan attenuated the enhanced expression of cyclin D1, cdk2 and pRb by 30% in VSMC from SHR and suggest that endogenous Ang II contribute to the enhanced expression of G_i -components in VSMC from SHR.

DISCUSSION

Increased proliferation of VSMC has been shown to be implicated in cardiovascular pathologies such as restenosis, atherosclerosis and hypertension (34-37). We and others reported earlier that VSMC from SHR exhibit exaggerated cell growth (proliferation) compared to VSMC from WKY rats (20,30,38). The enhanced proliferation of VSMC from SHR was shown to be attributed to the increased activity of MAPkinase/PI3kinase and enhanced levels of $G_{i\alpha}$ proteins, because the treatment of VSMC from SHR with PD98059, an inhibitor of MAP kinase, wortmannin, an inhibitor of PI3-K and pertussis toxin that inactivates $G_{i\alpha}$ proteins resulted in the restoration of enhanced proliferation to control WKY levels (30). In addition, the implication of Ang II AT₁ receptor in the enhanced proliferation of VSMC from SHR has been demonstrated (39). We recently reported that Ang II, ET-1 and arginine-vasopressin (AVP) increased the proliferation of A10 VSMC *via* $G_{i\alpha}$ /MAP kinase pathways which was attenuated by the activation of NPR-C receptor by C-ANP₄₋₂₃ as well as by small peptide fragments of cytoplasmic domain of NPR-C having G_i activator sequences (22).

In the present study, we demonstrate that the activation of NPR-C by C-ANP₄₋₂₃ attenuates the enhanced proliferation of VSMC from SHR which was attributed to regulation of cell cycle components from G₁-phase. Our results showing that treatment of VSMC from SHR with cyclin D1/cdk4 and cdk2 inhibitors, NSC 625987 and NU2058 respectively that decreased the enhanced proliferation suggest the implication of cyclin D1 and cdkinase in the enhanced proliferation of VSMC of SHR. This is further supported by the fact that VSMC from SHR exhibit enhanced expression of cyclin D1, cdk4 and cdk2 as compared to VSMC from WKY. In this regard, the exaggerated proliferation rate of VSMC from SHR was also shown to be attributed to higher expression of proteins, cyclin D, cdk2 and cdk4 from G₁-phase of cell cycle (26,27). In addition, we showed that the expression of phosphorylated form (pRb) of Rb but not Rb *per se* was significantly increased in VSMC from SHR as compared to VSMC from WKY. Since, Rb needs to be phosphorylated to initiate the transition from G₁ phase to S phase, these results show that the activities of cyclin D1/cdk4 and cyclin E/cdk2 complexes are enhanced in VSMC from SHR as compared to VSMC from WKY which is consistent with studies from Se-Jung Lee et al. who have shown that cdk2 and cdk4 kinase activities were increased in VSMC from SHR (26).

ANP has been shown to restrain astrocyte G₁-S cell cycle progression by a regulation of the expression of the cell cycle proteins (40). However, in the present study, we show for the first time that NPR-C activation by C-ANP₄₋₂₃ decreased the enhanced expression of cyclin D1 and cdk2 in VSMC from SHR. However, the enhanced expression of cdk4 was not significantly attenuated by C-ANP₄₋₂₃. It may be possible that C-ANP₄₋₂₃ decreases the activity of cdk4 and not the expression, which may contribute to its antihyperproliferative effect, however, this need to be investigated. Furthermore, the results showing that the phosphorylation of pRb protein is attenuated by C-ANP₄₋₂₃ suggest that the activities of cyclin D1/cdk4 and cyclin E/cdk2 complexes are decreased by C-

ANP₄₋₂₃. From these results, it may be suggested that the activation of NPR-C by C-ANP₄₋₂₃ attenuates the enhanced proliferation by regulating the expression of cell cycle proteins.

We also examined the intracellular signaling mechanisms responsible for C-ANP₄₋₂₃-induced decreased expression of cell cycle components contributing to the antiproliferative effect of C-ANP₄₋₂₃. Our results showing that inactivation/inhibition of G_i protein by pertussis toxin attenuated the enhanced expression of cdk2, cyclin D1 and enhanced phosphorylation of Rb from VSMC from SHR as compared to VSMC from WKY suggest the implication of enhanced levels of G_i proteins in enhanced expression of cell cycle components. The implication of enhanced levels of G_iα proteins in the enhanced proliferation of VSMC from SHR has been demonstrated (30). In addition, C-ANP₄₋₂₃ was shown to attenuate the expression of G_i proteins in A10 VSMC (41) and VSMC from SHR (31). Taken together, it may suggest that C-ANP₄₋₂₃-mediated decreased expression of G_i proteins contributes to the downregulation of the expression of cell cycle components from G₁ phase and resultant attenuation of cell proliferation.

The implication of MAP kinase and PI3-kinase in cell proliferation has been reported (42,43). In addition, the hyperproliferation of VSMC from SHR was also shown to be attributed to the augmented activity of MAP kinase and PI3-kinase (22,32,44). We have earlier shown that small peptide fragments of cytoplasmic domain of NPR-C attenuated the vasoactive peptide-induced enhanced proliferation via MAP kinase /PI3Kinase signaling in A10 cells (22). In the present study, we show that C-ANP₄₋₂₃ attenuated the enhanced ERK1/2 and AKT phosphorylation in VSMC from SHR and suggest that the antiproliferative effect of C-ANP₄₋₂₃ in VSMC from SHR may also be mediated through the inhibition of MAP kinase/PI3-kinase/AKT signaling pathways. Furthermore, our results showing that the enhanced expression of cyclin D1, cdk2 and pRb phosphorylation in VSMC from SHR was attenuated by MEK inhibitor PD98059 and wortmannin, a PI3-

kinase inhibitor suggest the implication of MAP kinase and PI3-kinase in enhanced levels of cell cycle components in VSMC from SHR. Thus, taken together, it may be suggested that NPR-C-mediated attenuation of MAP kinase and PI3-kinase activation in VSMC from SHR may be responsible for decreased expression of cell cycle components and thereby decreased cell proliferation.

Ang II has been shown to increase the proliferation of VSMC (22,45) and also the expression of cell cycle components in VSMC (28). In addition, VSMC from SHR have been reported to hyperproliferate and exhibit increased levels of Ang II than VSMC from WKY (21). Our results showing that treatment of VSMC from SHR with losartan, an AT1 inhibitor attenuated the expression of cell cycle components from G1-phase suggest the implication of endogenous Ang II in enhanced

expression of cell cycle components in VSMC from SHR. In this regard, Kubo et al. have also shown that CV11974 (AT1 antagonist) decreased the enhanced cdk2 activity in VSMC from SHR as compared to VSMC from WKY (46).

In conclusion, we demonstrate for the first time that the activation of NPR-C by C-ANP₄₋₂₃ inhibits the enhanced proliferation of VSMC from SHR by decreasing the enhanced expression of cell cycle proteins through the inhibition of enhanced expression of G α proteins and enhanced activation of MAP kinase and PI3K/AKT pathways (Figure 9). From these studies, it can be suggested that C-ANP₄₋₂₃ could be used as a treatment against the enhanced proliferation of VSMC associated with hypertension but also with atherosclerosis and restenosis.

REFERENCES

1. Brenner, B. M., Ballermann, B. J., Gunning, M. E., and Zeidel, M. L. (1990) *Physiol Rev* 70, 665-699
2. Sudoh, T., Minamino, N., Kangawa, K., and Matsuo, H. (1990) *Biochem Biophys Res Commun* 168, 863-870
3. Sudoh, T., Kangawa, K., Minamino, N., and Matsuo, H. (1988) *Nature* 332, 78-81
4. Levin, E. R., Gardner, D. G., and Samson, W. K. (1998) *N Engl J Med* 339, 321-328
5. Anand-Srivastava, M. B., Franks, D. J., Cantin, M., and Genest, J. (1984) *Biochem Biophys Res Commun* 121, 855-862
6. Anand-Srivastava, M. B., Cantin, M., and Genest, J. (1985) *Life Sci* 36, 1873-1879
7. Anand-Srivastava, M. B., Genest, J., and Cantin, M. (1985) *FEBS Lett* 181, 199-202
8. Anand-Srivastava, M. B., and Cantin, M. (1986) *Biochem Biophys Res Commun* 138, 427-436
9. Anand-Srivastava, M. B., Vinay, P., Genest, J., and Cantin, M. (1986) *Am J Physiol* 251, F417-423
10. Hamet, P., Tremblay, J., Pang, S. C., Garcia, R., Thibault, G., Gutkowska, J., Cantin, M., and Genest, J. (1984) *Biochem Biophys Res Commun* 123, 515-527
11. Winquist, R. J., Faison, E. P., Waldman, S. A., Schwartz, K., Murad, F., and Rapoport, R. M. (1984) *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 7661-7664
12. Anand-Srivastava, M. B., and Trachte, G. J. (1993) *Pharmacol Rev* 45, 455-497
13. Anand-Srivastava, M. B., Srivastava, A. K., and Cantin, M. (1987) *J Biol Chem* 262, 4931-4934
14. Anand-Srivastava, M. B., Sairam, M. R., and Cantin, M. (1990) *J Biol Chem* 265, 8566-8572
15. Hirata, M., Chang, C. H., and Murad, F. (1989) *Biochim Biophys Acta* 1010, 346-351
16. Mouawad, R., Li, Y., and Anand-Srivastava, M. B. (2004) *Mol Pharmacol* 65, 917-924
17. Fuller, F., Porter, J. G., Arfsten, A. E., Miller, J., Schilling, J. W., Scarborough, R. M., Lewicki, J. A., and Schenk, D. B. (1988) *J Biol Chem* 263, 9395-9401
18. Pagano, M., and Anand-Srivastava, M. B. (2001) *J Biol Chem* 276, 22064-22070
19. Heagerty, A. M., Aalkjaer, C., Bund, S. J., Korsgaard, N., and Mulvany, M. J. (1993) *Hypertension* 21, 391-397
20. Resink, T. J., Scott-Burden, T., Baur, U., and Buhler, F. R. (1987) *J Hypertens Suppl* 5, S145-148
21. Fukuda, N., Satoh, C., Hu, W. Y., Soma, M., Kubo, A., Kishioka, H., Watanabe, Y., Izumi, Y., and Kanmatsuse, K. (1999) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 1210-1217
22. Hashim, S., Li, Y., and Anand-Srivastava, M. B. (2006) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H3144-3153
23. Morgan, D. O. (1995) *Nature* 374, 131-134
24. Buchkovich, K., Duffy, L. A., and Harlow, E. (1989) *Cell* 58, 1097-1105
25. Sherr, C. J. (1993) *Cell* 73, 1059-1065
26. Lee, S. J., Kim, W. J., and Moon, S. K. (2009) *Int Immunopharmacol* 9, 837-843
27. Tanner, F. C., Greutert, H., Barandier, C., Frischknecht, K., and Luscher, T. F. (2003) *Hypertension* 42, 184-188
28. Braun-Dullaeus, R. C., Mann, M. J., Ziegler, A., von der Leyen, H. E., and Dzau, V. J. (1999) *J Clin Invest* 104, 815-823
29. Anand-Srivastava, M. B., Franks, D. J., Cantin, M., and Genest, J. (1982) *Biochem Biophys Res Commun* 108, 213-219

30. Li Y, B. G., and Anand-Srivastava MB. (2005) *Can J Cardiol* 21, 155C
31. Saha, S., Li, Y., Lappas, G., and Anand-Srivastava, M. B. (2008) *J Mol Cell Cardiol* 44, 336-344
32. Saward, L., and Zahradka, P. (1997) *Circ Res* 81, 249-257
33. Lappas, G., Daou, G. B., and Anand-Srivastava, M. B. (2005) *J Hypertens* 23, 2251-2261
34. Ross, R. (1995) *Annu Rev Physiol* 57, 791-804
35. Liu, M. W., Roubin, G. S., and King, S. B., 3rd. (1989) *Circulation* 79, 1374-1387
36. Libby, P., and Tanaka, H. (1994) *Clin Transplant* 8, 313-318
37. Intengan, H. D., and Schiffrin, E. L. (2000) *Hypertension* 36, 312-318
38. Paquet, J. L., Baudouin-Legros, M., Marche, P., and Meyer, P. (1989) *Am J Hypertens* 2, 108-110
39. El Mabrouk, M., Touyz, R. M., and Schiffrin, E. L. (2001) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281, H30-39
40. Pedram, A., Razandi, M., Hu, R. M., and Levin, E. R. (1998) *J Biol Chem* 273, 13966-13972
41. Anand-Srivastava, M. B. (2000) *Biochemistry* 39, 6503-6513
42. Varticovski, L., Harrison-Findik, D., Keeler, M. L., and Susa, M. (1994) *Biochim Biophys Acta* 1226, 1-11
43. Seger, R., and Krebs, E. G. (1995) *FASEB J* 9, 726-735
44. Molloy, C. J., Taylor, D. S., and Weber, H. (1993) *J Biol Chem* 268, 7338-7345
45. Powell, J. S., Muller, R. K., Rouge, M., Kuhn, H., Hefti, F., and Baumgartner, H. R. (1990) *J Cardiovasc Pharmacol* 16 Suppl 4, S42-49
46. Kubo, A., Fukuda, N., Teng, J., Satoh, C., Nakayama, M., Kishioka, H., and Kanmatsuse, K. (2000) *Am J Hypertens* 13, 1117-1124

FOOT NOTES

The work was supported by a grant from Canadian Institutes of Health Research (MOP 86569)

The abbreviation used are: NPR-C, natriuretic peptide receptor C, VSMC, vascular smooth muscle cell, SHR, spontaneously hypertensive rats, WKY, wistar-kyoto rats, NP, natriuretic peptide, ANP, atrial natriuretic peptide, BNP, brain natriuretic peptide, CNP, C-type natriuretic peptide, PLC, phospholipase C, Ang II, angiotensin II, ET-1, endothelin-1, AVP, arginine-vasopressin, AT1, angiotensin II receptor type 1.

FIGURES LEGENDS

Fig 1 Effect of C-ANP₄₋₂₃ on SHR VSMC proliferation. SHR and WKY VSMC were incubated in the absence (control) or presence of various concentrations C-ANP₄₋₂₃. Thymidine incorporation was determined as described in experimental procedures. Results are expressed as % of control (taken as 100%). Values are means \pm SE of 3 separate experiments. *** $P < 0.001$ vs WKY CTL, && $P < 0.01$ vs SHR CTL, &&& $P < 0.001$ vs SHR CTL.

Fig 2 Effect of 10^{-7} M of C-ANP₄₋₂₃ on cell cycle components expression. SHR and WKY VSMC were incubated in the absence (control) or presence 10^{-7} M of C-ANP₄₋₂₃. The cell lysates were used for Western blotting as described in experimental procedures. Results are expressed as % of control (taken as 100%). Values are means \pm SE of 3 separate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Fig 3 Effect of NSC 625987 and NU2058 on the enhanced proliferation of SHR VSMC proliferation. A) SHR and WKY VSMC were incubated in the absence (control) or presence of various concentrations NSC 625987 for 1 h. B) SHR and WKY VSMC were incubated in the absence (control) or presence of various concentrations NU2058. Thymidine incorporation was determined as described in experimental procedures. Results are expressed as % of control (taken as 100%). Values are means \pm SE of 3 separate experiments. *** $P < 0.001$ vs WKY CTL, ** $P < 0.01$ vs SHR CTL, *** $P < 0.001$ vs SHR CTL.

Fig 4 Effect of pertussis toxin on expression of cell cycle components from G1-phase in VSMC from SHR. SHR and WKY VSMC were incubated 24 h in the absence (control) or presence of pertussis toxin (PT). The cell lysates were used for Western blotting as described in experimental procedures. Results are expressed as % of control (taken as 100%). Values are means \pm SE of 3 separate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Fig 5 Effect of C-ANP₄₋₂₃ on ERK and AKT phosphorylation in VSMC from SHR. SHR and WKY VSMC were incubated in the absence (control) or presence 10^{-7} M of C-ANP₄₋₂₃. The cell lysates were used for Western blotting as described in experimental procedures. Results are expressed as % of control (taken as 100%). Values are means \pm SE of 3 separate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Fig 6 Effect of PD 98059 on expression of cell cycle components from G1-phase in VSMC from SHR. SHR and WKY VSMC were incubated 24 h in the absence (control) or presence of $10\mu\text{M}$ of PD 98059 (PD). The cell lysates were used for Western blotting as described in experimental procedures. Results are expressed as % of control (taken as 100%). Values are means \pm SE of 3 separate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Fig 7 Effect of wortmannin on expression of cell cycle components from G1-phase in VSMC from SHR. SHR and WKY VSMC were incubated 24 h in the absence (control) or presence of $10\mu\text{M}$ of wortmannin (WM). The cell lysates were used for Western blotting as described in experimental procedures. Results are expressed as % of control (taken as 100%). Values are means \pm SE of 3 separate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Fig 8 Effect of losartan on expression of cell cycle components from G1-phase in VSMC from SHR. SHR and WKY VSMC were incubated 24 h in the absence (control) or presence of 10^{-5} M of losartan (los). The cell lysates were used for Western blotting as described in experimental procedures. Results are expressed as % of control (taken as 100%). Values are means \pm SE of 3 separate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Fig 9 Schematic model showing potential mechanisms responsible for the antiproliferative effect of NPR-C receptor activation by C-ANP₄₋₂₃ in VSMC from SHR. C-ANP₄₋₂₃ attenuates the proliferation through the inhibition of the expression of G1-phase cell cycle proteins. Activation of NPR-C by C-ANP₄₋₂₃ attenuates the enhanced cell cycle proteins expression through the inhibition of enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins and enhanced activation of MAP kinase and PI3K/AKT pathways.

Figure 1

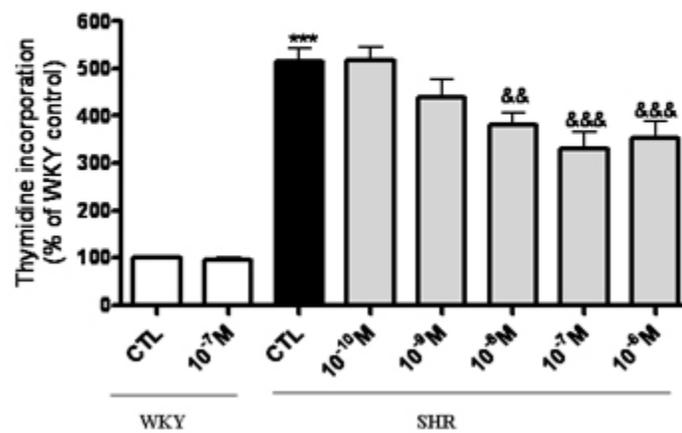


Figure 2

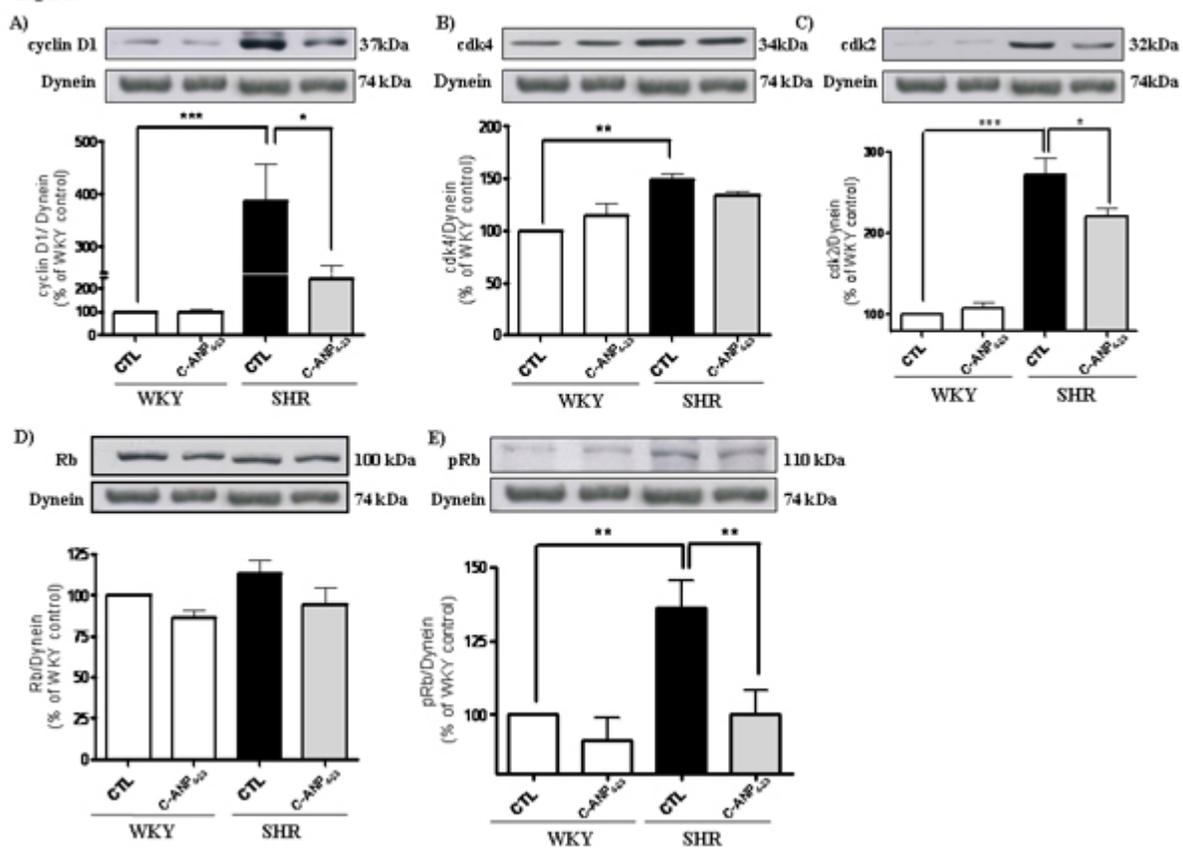


Figure 3

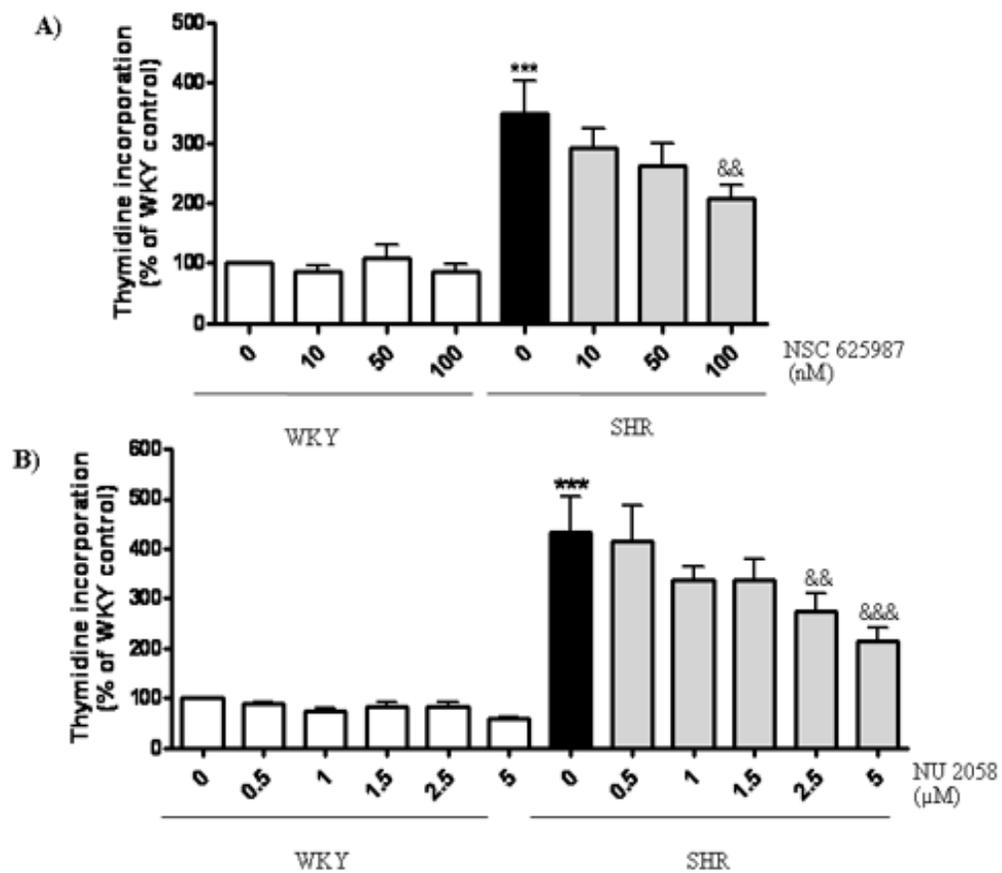


Figure 4

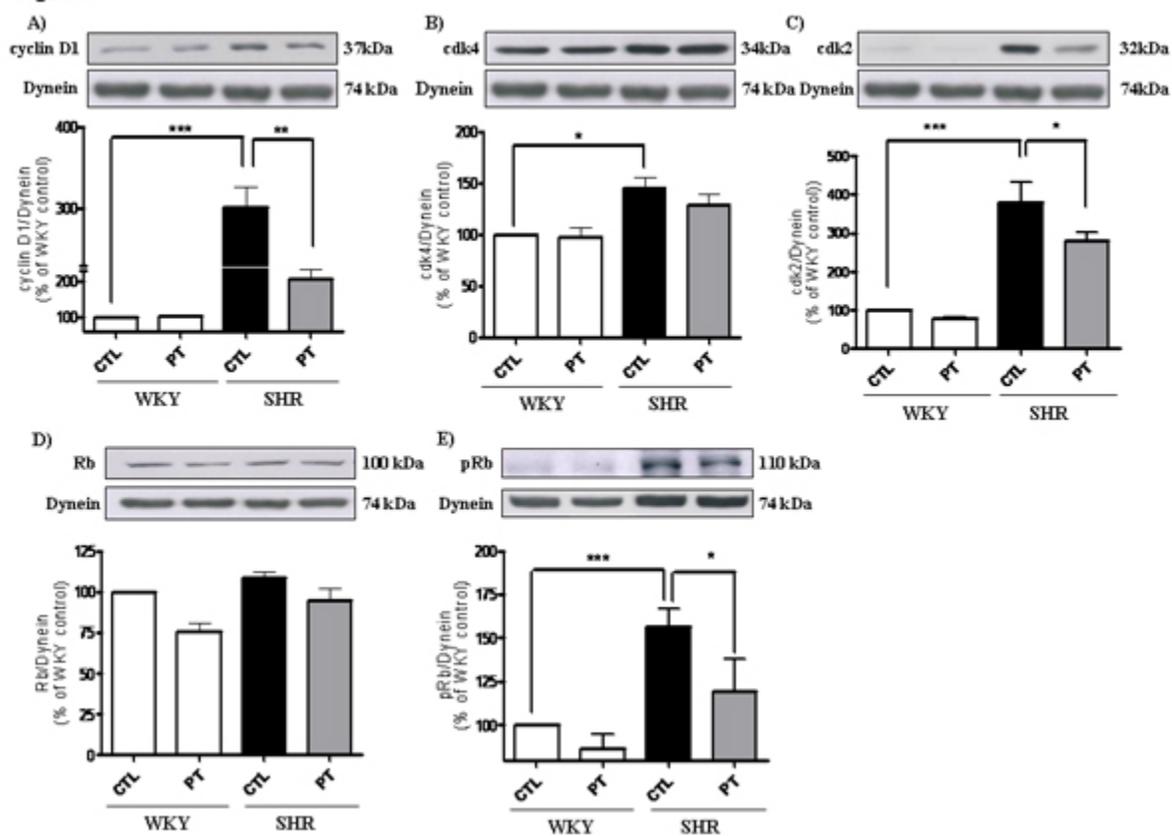


Figure 5

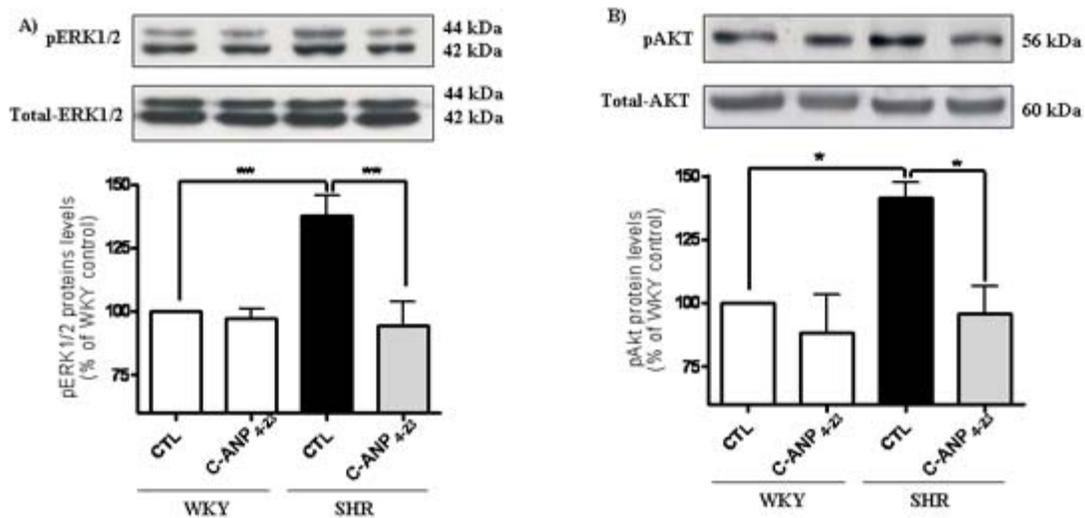


Figure 6

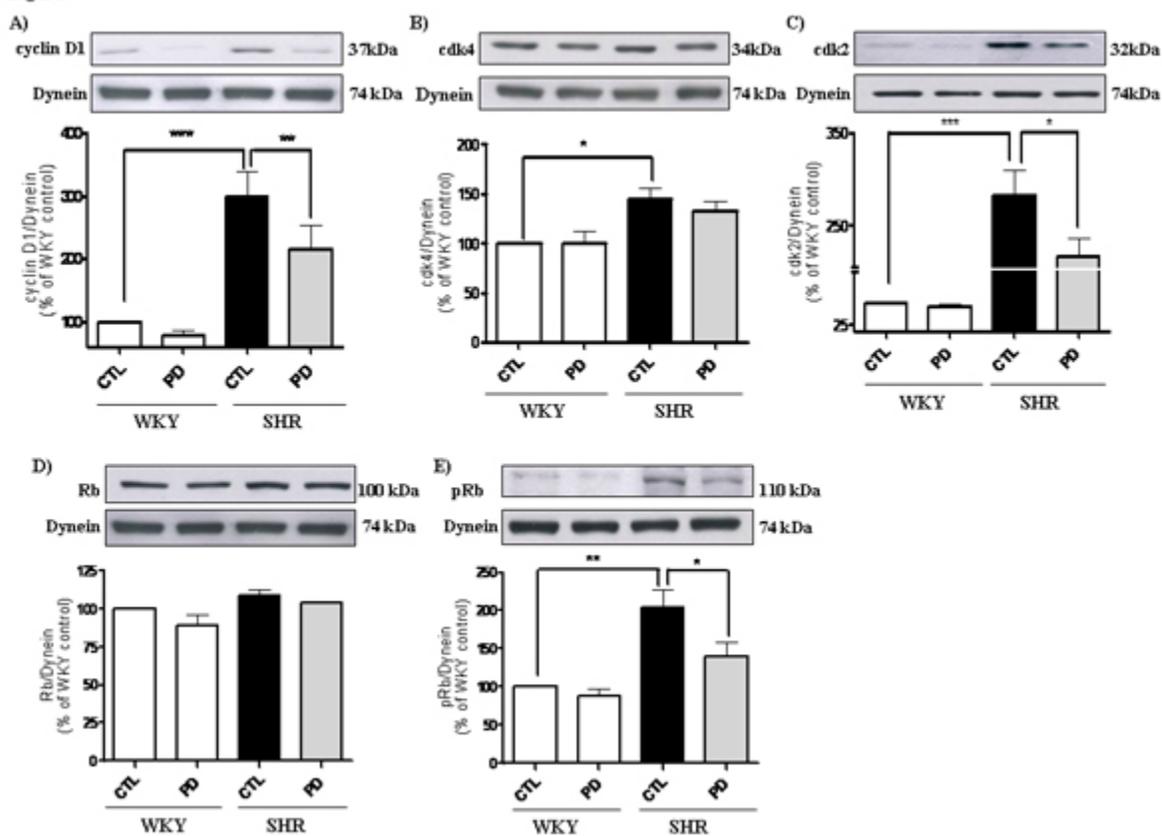


Figure 7

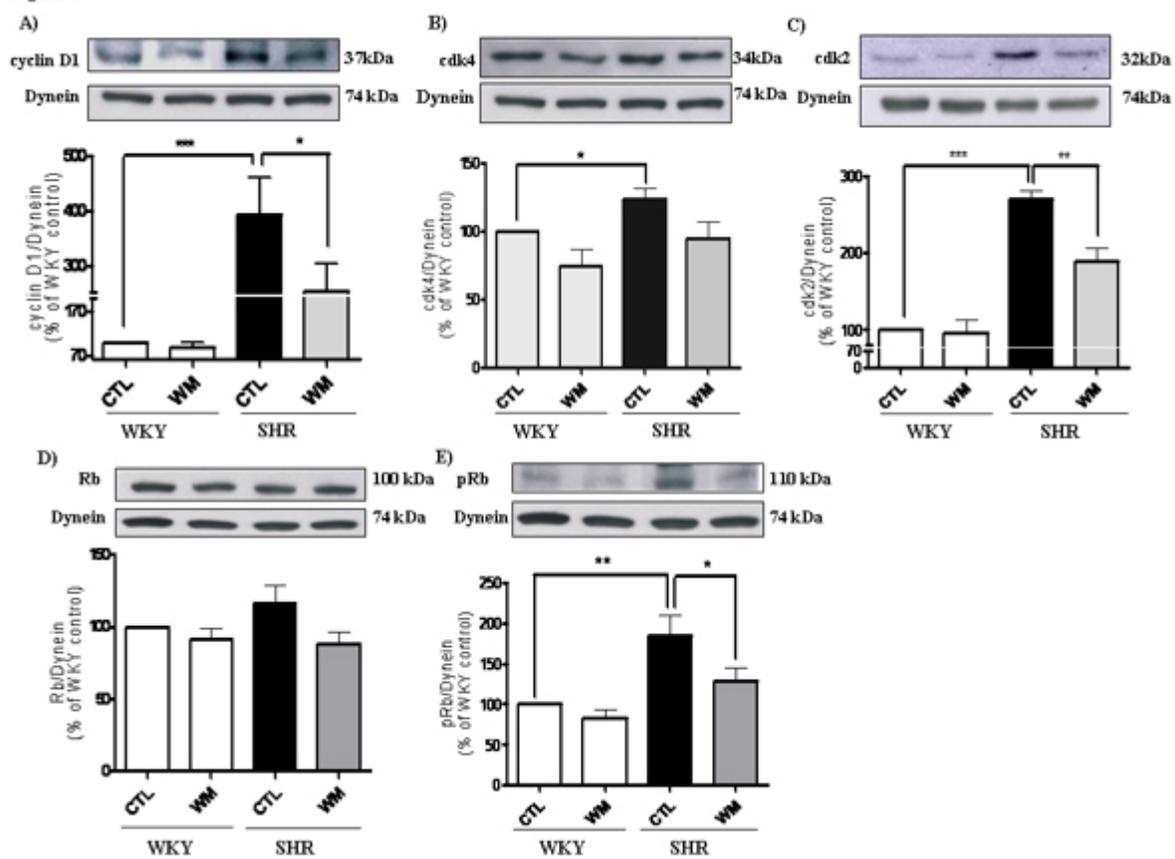


Figure 8

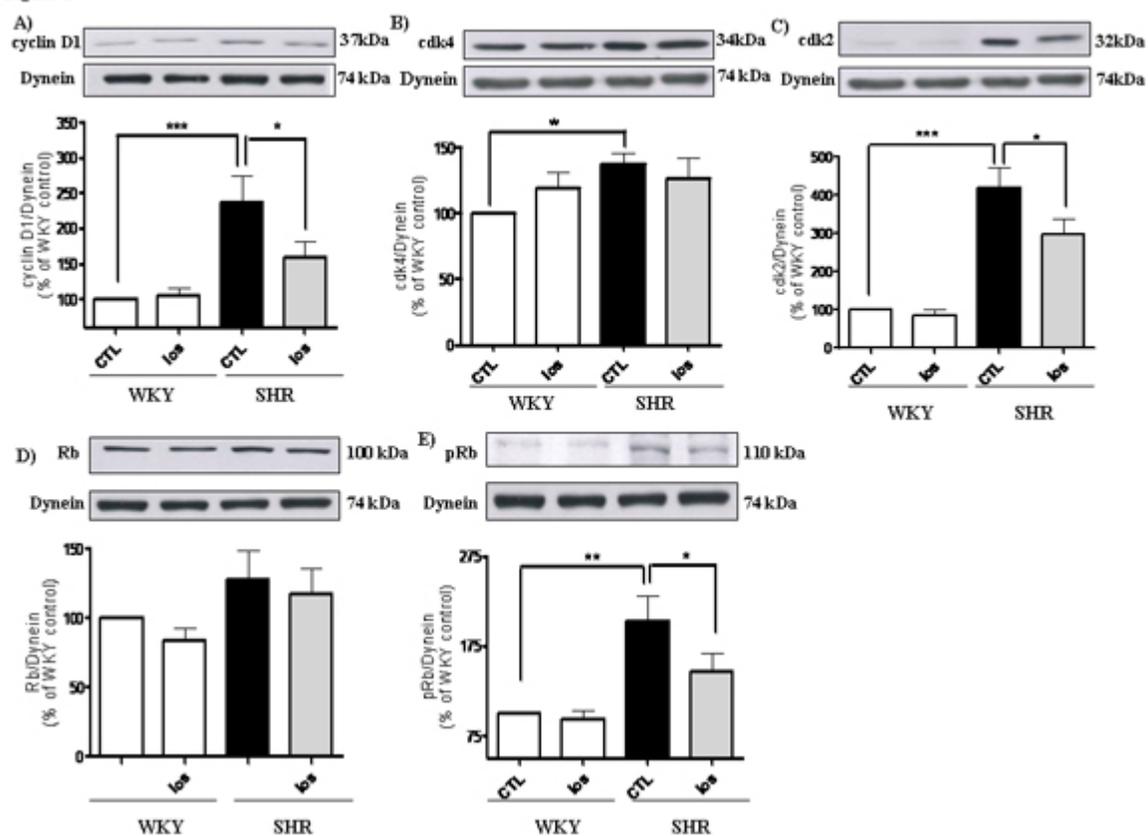
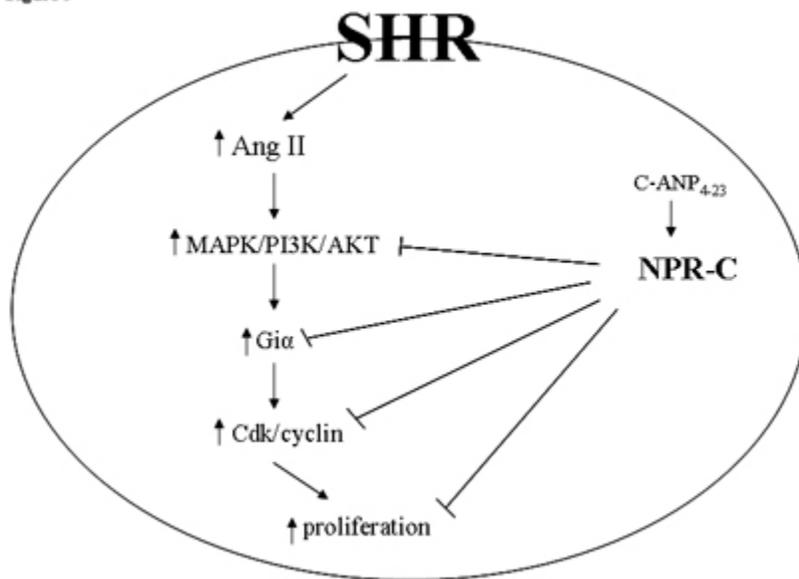


Figure 9



CHAPITRE 3.

DISCUSSION ET CONCLUSION

8. Discussion

L'augmentation de la prolifération des cellules du muscle lisse vasculaire est un processus à l'origine de plusieurs maladies cardiovasculaires dont notamment, la resténose, l'athérosclérose et l'hypertension (Intengan et Schiffrin, 2000; Libby et Tanaka, 1994; Liu, Roubin, et King, 1989; Ross, 1995). Le rat SHR est un bon modèle pour investiguer l'origine d'une telle augmentation. En effet, il est bien connu que les CMLV provenant de rats SHR ont un taux de prolifération plus élevé que les CMLV provenant des rats WKY (Li Y, 2005b; Paquet, Baudouin-Legros, Marche, et Meyer, 1989; Resink, Scott-Burden, Baur, et Buhler, 1987). L'augmentation de la prolifération est attribuée, d'une part, à une augmentation de l'activité des voies signalétiques MAPK/AKT et de l'expression de la protéine $G_{i\alpha}$ (Li Y, 2005b). D'autre part, il est également prouvé que le récepteur à l'Ang II, AT_1 joue un rôle dans l'augmentation de la prolifération des CMLV de rats SHR (El Mabrouk, Touyz, et Schiffrin, 2001).

Le récepteur NPR-C fait partie de la famille des récepteurs natriurétiques dont les deux autres membres sont NPR-A et NPR-B. NPR-A et NPR-B ont une activité guanylate cyclase. Le récepteur NPR-C quant à lui a tout d'abord été identifié comme récepteur de clairance des peptides natriurétiques. Toutefois, il est maintenant prouvé que NPR-C est couplé à l'inhibition de l'AC *via* la protéine G_i ou à l'activation de la PLC. Il a été récemment montré que l'Ang II, l'ET-1 et l'AVP augmentent la prolifération des CMVL de type A10 *via* la voie $G_{i\alpha}$ /MAPK et que l'activation du récepteur NPR-C, par C-ANP₄₋₂₃ et des fragments correspondant aux séquences activatrices de G_i du domaine cytosolique de NPR-C, inhibe cette augmentation (Hashim, Li, et Anand-Srivastava, 2006). L'effet antimitogénique du récepteur NPR-C a également été observé dans les cellules astrogliales et endothéliales de rats (Cahill et Hassid, 1991; Levin et Frank, 1991; Nussenzveig, Lewicki, et Maack, 1990). Dans cette présente étude, nous montrons que l'activation du récepteur NPR-C par le fragment C-ANP₄₋₂₃ diminue l'augmentation de la prolifération des CMLV de rats

SHR et que cette diminution est attribuable à la régulation de l'expression des composantes de la phase G₁ du cycle cellulaire. En effet, nos résultats montrent que le traitement des CMLV de SHR avec des inhibiteurs du complexe cycline D1/cdk4 et de la kinase cdk2 (NSC 625987 et NU2058 respectivement) diminue l'augmentation de la prolifération des CMLV de SHR comparativement aux CMLV de WKY. Ces résultats suggèrent une implication de la cycline D1 ainsi que des cdks dans l'augmentation de la prolifération des CMLV de SHR. Des études effectuées par d'autres groupes de recherches supportent également cette hypothèse. Ces études ont montré que dans les CMLV de SHR, l'expression des protéines cycline D1, cdk4 et cdk2 est plus élevée que dans les CMLV de WKY (Lee, Kim, et Moon, 2009; Tanner, Greutert, Barandier, Frischknecht, et Luscher, 2003). Dans ce sens, ces études ont permis d'attribuer le taux de prolifération exagéré des CMLV de SHR à des taux d'expression élevés des protéines de la phase G₁ du cycle cellulaire : la cycline D, cdk2 et cdk4. En revanche, dans cette étude, nous démontrons que l'expression de la forme phosphorylée (pRb) de la protéine Rb est augmentée dans les CMLV de SHR en comparaison à celles des WKY, mais que l'expression de la protéine Rb reste inchangée. Puisque la phosphorylation de la protéine Rb est nécessaire à la transition de la phase G₁ à la phase S du cycle cellulaire, ces résultats montrent que l'activité des complexes cycline D1/cdk4 et cycline E/cdk2 est augmentée dans les CMLV de SHR comparativement aux CMLV de WKY. Ces résultats concordent avec l'étude de Se-Jung Lee et al. qui a montré que l'activité des kinases cdk2 et cdk4 est augmentée dans les CMLV de SHR (Lee, Kim, et Moon, 2009).

Levin et al. ont montré que l'ANP augmentait la durée de la progression de la phase G₁ à la phase S en régulant l'expression des composantes du cycle cellulaire (Levin et Frank, 1991). Toutefois, dans cette étude nous montrons, pour la première fois que l'activation de NPR-C par C-ANP₄₋₂₃ atténue l'augmentation de l'expression de la cycline D1 et de cdk2. Par contre, le taux d'expression élevé de cdk4 n'a pas été significativement diminué en présence de C-ANP₄₋₂₃. Il est possible que, bien que l'expression de cdk4 ne soit pas diminuée, son activité soit atténuée par C-ANP₄₋₂₃.

D'autres études seront nécessaires afin de le déterminer. En revanche, le taux de phosphorylation de la protéine Rb a été atténué par le fragment C-ANP₄₋₂₃, ce qui suggère que l'activité des complexes cycline D1/cdk4 et cycline E/cdk2 est diminuée par le fragment peptidique C-ANP₄₋₂₃. Ainsi, d'après nos résultats, nous suggérons que l'activation du récepteur NPR-C par le fragment C-ANP₄₋₂₃ diminue la prolifération en régulant l'expression des protéines de la phase G₁ du cycle cellulaire. Nos résultats concordent avec ceux de Lee et al. qui démontrent une augmentation de l'activité de cdk2 et cdk4 dans les CMLV de SHR en comparaison aux CMLV de WKY (Lee, Kim, et Moon, 2009). Nos résultats montrent que l'activation du récepteur NPR-C permet de réduire l'expression des composantes de la phase G₁ du cycle cellulaire.

Dans cette étude, nous voulions également déterminer les mécanismes intracellulaires responsables de la diminution de l'expression des composantes de la phase G₁ et qui contribuent au rôle antiprolifératif du fragment C-ANP₄₋₂₃. Nos résultats montrent que l'inactivation/inhibition de la protéine Gi par la toxine pertussis atténue l'augmentation de l'expression de la cycline D1, de cdk2 et du taux de phosphorylation de la protéine pRb dans les CMLV de SHR comparativement aux CMLV de WKY. Ces résultats suggèrent que le taux d'expression protéique élevé de Gi est impliqué dans l'augmentation de l'expression des composantes du cycle cellulaire. L'implication du taux d'expression protéique élevé de Gi dans l'augmentation de la prolifération des CMLV de SHR comparativement aux CMLV de WKY a été prouvé (Li Y, 2005). De plus, il est démontré que le fragment C-ANP₄₋₂₃ diminue l'augmentation de l'expression de la protéine Gi dans les CMLV de type A10 (Anand-Srivastava, 2000) et de rats SHR (Saha, Li, Lappas, et Anand-Srivastava, 2008). Nous suggérons donc, que la diminution de l'expression de la protéine Gi par le fragment C-ANP₄₋₂₃ contribue à réguler à la baisse l'expression des protéines de la phase G₁ du cycle cellulaire, contribuant ainsi à diminuer la prolifération des CMLV.

L'implication des kinases MAPK et PI3-K dans la prolifération cellulaire est bien documentée (Seger et Krebs, 1995; Varticovski, Harrison-Findik, Keeler, et Susa, 1994). De plus, le taux de prolifération élevé des CMLV de SHR comparativement aux CMLV de WKY a été attribué à l'augmentation de l'activité des kinases MAPK et PI3-K (Hashim, Li, et Anand-Srivastava, 2006; Molloy, Taylor, et Weber, 1993; Saward et Zahradka, 1997). Il a été récemment montré que des petits fragments du domaine cytosolique du récepteur NPR-C inhibent l'augmentation des taux de phosphorylation de ERK1/2 et AKT induite par les peptides vasoactifs (Hashim, Li, et Anand-Srivastava, 2006). Dans cette étude nous démontrons que le fragment C-ANP₄₋₂₃ inhibe les taux de phosphorylation plus élevés des protéines ERK1/2 et AKT des CMLV de SHR en comparaison à ceux des CMLV de WKY. Nous suggérons que l'effet antiprolifératif de C-ANP₄₋₂₃ observé dans les CMLV de SHR soit attribuable à l'inhibition des voies signalétiques MAPK/PI3-K/AKT par C-ANP₄₋₂₃. De plus, nos résultats montrent que l'expression des protéines cycline D1, cdk2 et la phosphorylation de la protéine pRb plus élevées dans les CMLV de SHR est atténuée par l'inhibiteur de la kinase MEK de la voie des MAPK (PD98059) et de l'inhibiteur de la PI3-K (wortmannin). Ces résultats suggèrent l'implication des kinases MAPK et PI3-K dans l'augmentation des taux d'expression des protéines de la phase G₁ du cycle cellulaire dans les CMLV de SHR. Il peut donc être suggéré que l'atténuation de la voie des MAPK et de la PI3-K via l'activation du récepteur NPR-C est responsable de la diminution de l'expression des composantes de la phase G₁, et par conséquent, de la diminution de la prolifération.

Il a été prouvé que l'Ang II augmente la prolifération des CMLV (Hashim, Li, et Anand-Srivastava, 2006; Powell et al., 1990) et l'expression des composantes de la phase G₁ du cycle cellulaire (Braun-Dullaues, Mann, Ziegler, von der Leyen, et Dzau, 1999). De plus, les CMLV de SHR reconnues pour leur taux de prolifération élevé, produisent plus d'Ang II de façon endogène en culture que les CMLV de WKY. L'augmentation d'Ang II endogène semble donc être impliquée dans l'augmentation de la prolifération observée en hypertension (Fukuda et al., 1999). Nos résultats montrent que le traitement de CMLV de rats SHR avec un inhibiteur du

récepteur AT₁, le losartan diminue l'expression des protéines de la phase G₁ du cycle cellulaire. Dans cette optique, Kubo et al. ont montré que l'activation de la kinase cdk2 plus élevée dans les CMLV de SHR comparativement aux CMLV de WKY et pouvait être atténuée par le CV11974, un antagoniste du récepteur AT₁ (Kubo et al., 2000).

9. Conclusions

Nos résultats montrent que le taux de prolifération des CMLV de SHR est significativement plus élevé que celui des CMLV de WKY et que la présence de C-ANP₄₋₂₃ diminue de manière-dose dépendante le taux de prolifération des CMLV de SHR. De plus, l'expression des protéines de la phase G₁ du cycle cellulaire, la cycline D1, la kinase dépendante des cyclines 2 (cdk2) et la forme phosphorylée de la protéine du rétinoblastome (pRb) est augmentée dans les CMLV de SHR comparativement aux CMLV de WKY et est atténué par C-ANP₄₋₂₃. De plus, nos résultats montrent que les inhibiteurs du complexe cycline D1/cdk4 (NSC 625987) et cdk2 (NU2058) diminuent le taux de prolifération élevé des CMLV de SHR. Les CMLV de SHR montrent également un taux de phosphorylation de ERK1/2 et d'AKT et est atténué par C-ANP₄₋₂₃. De plus, le taux d'expression élevé des protéines cycline D1, cdk2 et pRb des CMLV de SHR est diminué par la toxine pertussis qui inactive la protéine G_{iα}, le PD 98095, un inhibiteur de MEK de la voie des MAPK, du wortmannin, un inhibiteur de la PI3-K et finalement du losartan, un antagoniste du récepteur AT₁. Ces résultats suggèrent que l'activation du récepteur NPR-C par C-ANP₄₋₂₃ diminue le taux de prolifération élevé des CMLV de SHR par une régulation à la baisse l'expression des composantes de la phase G₁ du cycle cellulaire *via* l'inhibition de la protéine G_{iα} et des voies signalétiques MAP kinase/PI3-K.

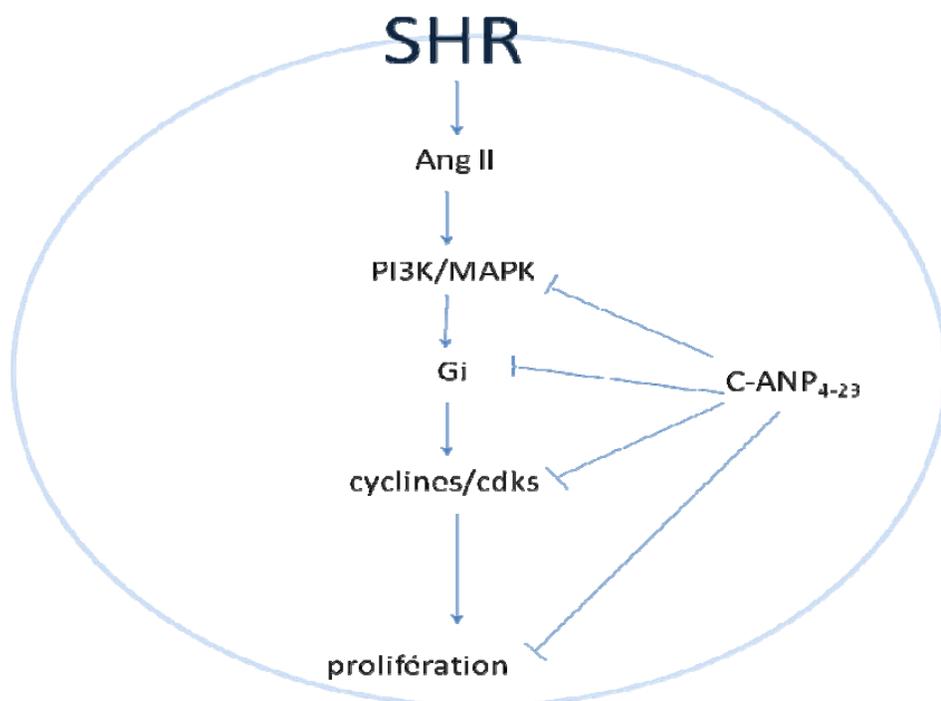


Figure 1 : Schéma intégratif des conclusions

10. Perspectives

Nous espérons que ces résultats ouvriront la voie à d'autres études qui permettront d'approfondir les mécanismes régulant le cycle cellulaire en hypertension. La régulation du cycle cellulaire détermine le taux de prolifération. En élucidant les mécanismes responsables de la régulation à la hausse des protéines du cycle cellulaire, il sera plus facile de déterminer le rôle précis des différentes voies signalétiques impliquées dans l'augmentation de la prolifération. Nous avons montré l'implication de la protéine $G_i\alpha$ et des voies signalétiques MAPK/AKT/PI3-K dans l'augmentation de l'expression des composantes de la phase G_1 du cycle cellulaire, il serait intéressant de déterminer l'implication d'autres acteurs comme, par exemple, le stress oxydatif.

Nos résultats démontrent clairement une augmentation de l'expression de la cycline D1, de cdk2, de cdk4 et de pRb. Toutefois, il existe plusieurs autres protéines impliquées dans la régulation de la phase G₁. Ainsi, il serait intéressant de déterminer quel est le taux d'expression des protéines inhibitrices du cycle cellulaire (les CKI) dans les CMLV de SHR et quel serait l'effet de l'activation du récepteur NPR-C. Dans cette étude, nous avons montré que l'activation du récepteur NPR-C diminue le taux de prolifération élevé des CMLV de SHR. Nous espérons que nos recherches aideront à mettre en évidence l'importance du récepteur NPR-C dans de futurs traitements. À ce jour, les traitements contre l'hypertension n'étant pas totalement efficaces, nous croyons que nos recherches soutiennent une piste intéressante dans le traitement de l'hypertension. Dans le but d'approfondir le rôle du récepteur NPR-C dans la régulation du cycle cellulaire, il serait intéressant de déterminer l'effet de C-ANP₄₋₂₃ sur la liaison des cyclines aux cdk. En effet, pour qu'une cellule traverse les différentes phases du cycle cellulaire, les cyclines et les cdk doivent être liées sous forme de complexes. Il est donc possible de croire que l'activation du récepteur NPR-C diminuerait le taux de liaison des cyclines aux cdk.

Finalement, l'augmentation du taux de prolifération des CMLV n'est pas unique à l'hypertension artérielle. La resténose et l'athérosclérose sont des pathologies où l'augmentation de la prolifération des CMLV représente une problématique de taille. Des études complémentaires pourraient être effectuées afin de déterminer si C-ANP₄₋₂₃ diminue le taux de prolifération dans le cas de l'athérosclérose. L'utilisation d'un modèle d'athérosclérose chez le rat ou encore le modèle de souris Apo E^{-/-} ou qui permettraient de le déterminer. Nous croyons fermement que des études en ce sens apporteraient des résultats probants.

11. Bibliographie

- Abdel-Latif, A. A. (2001). Cross talk between cyclic nucleotides and polyphosphoinositide hydrolysis, protein kinases, and contraction in smooth muscle. *Exp Biol Med (Maywood)*, 226(3), 153-163.
- Abdelalim, E. M., et Tooyama, I. (2010) NPR-C is expressed in the cholinergic and dopaminergic amacrine cells in the rat retina. *Peptides*, 31(1), 180-183.
- Albanese, C., Johnson, J., Watanabe, G., Eklund, N., Vu, D., Arnold, A., et al. (1995). Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J Biol Chem*, 270(40), 23589-23597.
- Anand-Srivastava, M. B. (1983). Angiotensin II receptors negatively coupled to adenylate cyclase in rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun*, 117(2), 420-428.
- Anand-Srivastava, M. B. (1992). Enhanced expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein in spontaneously hypertensive rats. Relationship to adenylate cyclase inhibition. *Biochem J*, 288 (Pt 1), 79-85.
- Anand-Srivastava, M. B. (2000). Downregulation of atrial natriuretic peptide ANP-C receptor is associated with alterations in G-protein expression in A10 smooth muscle cells. *Biochemistry*, 39(21), 6503-6513.
- Anand-Srivastava, M. B. (2005). Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation. *Peptides*, 26(6), 1044-1059.
- Anand-Srivastava, M. B., et Cantin, M. (1986). Atrial natriuretic factor receptors are negatively coupled to adenylate cyclase in cultured atrial and ventricular cardiocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 138(1), 427-436.
- Anand-Srivastava, M. B., Gutkowska, J., et Cantin, M. (1991). The presence of atrial-natriuretic-factor receptors of ANF-R2 subtype in rat platelets. Coupling to adenylate cyclase/cyclic AMP signal-transduction system. *Biochem J*, 278 (Pt 1), 211-217.
- Anand-Srivastava, M. B., Picard, S., et Thibault, C. (1991). Altered expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory proteins (Gi alpha) in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*, 4(10 Pt 1), 840-843.
- Anand-Srivastava, M. B., Sairam, M. R., et Cantin, M. (1990). Ring-deleted analogs of atrial natriuretic factor inhibit adenylate cyclase/cAMP system. Possible coupling of clearance atrial natriuretic factor receptors to adenylate cyclase/cAMP signal transduction system. *J Biol Chem*, 265(15), 8566-8572.

- Anand-Srivastava, M. B., Srivastava, A. K., et Cantin, M. (1987). Pertussis toxin attenuates atrial natriuretic factor-mediated inhibition of adenylate cyclase. Involvement of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein. *J Biol Chem*, 262(11), 4931-4934.
- Anand-Srivastava, M. B., et Trachte, G. J. (1993). Atrial natriuretic factor receptors and signal transduction mechanisms. *Pharmacol Rev*, 45(4), 455-497.
- Arber, N., Sutter, T., Miyake, M., Kahn, S. M., Venkatraj, V. S., Sobrino, A., et al. (1996). Increased expression of cyclin D1 and the Rb tumor suppressor gene in c-K-ras transformed rat enterocytes. *Oncogene*, 12(9), 1903-1908.
- Berk, B. C., et Corson, M. A. (1997). Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. *Circ Res*, 80(5), 607-616.
- Berne R. M., et Levy N. Matthew (2001) Cardiovascular physiology St. Louis, MO Toronto : Mosby.
- Berridge, M. J. (1987). Inositol trisphosphate as a second messenger in signal transduction. *Ann N Y Acad Sci*, 494, 39-51.
- Boron W. F., et Boulpaep E. L. (2009) Medical physiology : a cellular and molecular approach (2e éd.) Philadelphia, PA : Saunders/Elsevier.
- Braun-Dullaes, R. C., Mann, M. J., Ziegler, A., von der Leyen, H. E., et Dzau, V. J. (1999). A novel role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Clin Invest*, 104(6), 815-823.
- Brenner, B. M., Ballermann, B. J., Gunning, M. E., et Zeidel, M. L. (1990). Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiol Rev*, 70(3), 665-699.
- Buchkovich, K., Duffy, L. A., et Harlow, E. (1989). The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell*, 58(6), 1097-1105.
- Cahill, P. A., et Hassid, A. (1991). Clearance receptor-binding atrial natriuretic peptides inhibit mitogenesis and proliferation of rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 179(3), 1606-1613.
- Calderone, A., Thaik, C. M., Takahashi, N., Chang, D. L., et Colucci, W. S. (1998). Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J Clin Invest*, 101(4), 812-818.
- Cao, L., et Gardner, D. G. (1995). Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. *Hypertension*, 25(2), 227-234.

- Chang, M. S., Lowe, D. G., Lewis, M., Hellmiss, R., Chen, E., et Goeddel, D. V. (1989). Differential activation by atrial and brain natriuretic peptides of two different receptor guanylate cyclases. *Nature*, 341(6237), 68-72.
- Chen, H. H., et Burnett, J. C., Jr. (1998). C-type natriuretic peptide: the endothelial component of the natriuretic peptide system. *J Cardiovasc Pharmacol*, 32 Suppl 3, S22-28.
- Chen, P. L., Scully, P., Shew, J. Y., Wang, J. Y., et Lee, W. H. (1989). Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell*, 58(6), 1193-1198.
- Cheng, M., Sexl, V., Sherr, C. J., et Roussel, M. F. (1998). Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(3), 1091-1096.
- Chinkers, M., Garbers, D. L., Chang, M. S., Lowe, D. G., Chin, H. M., Goeddel, D. V., et al. (1989). A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature*, 338(6210), 78-83.
- Chiu, A. T., McCall, D. E., Price, W. A., Jr., Wong, P. C., Carini, D. J., Duncia, J. V., et al. (1991). In vitro pharmacology of DuP 753. *Am J Hypertens*, 4(4 Pt 2), 282S-287S.
- Ciuffo, G. M., Alvarez, S. E., et Fuentes, L. B. (1998). Angiotensin II receptors induce tyrosine dephosphorylation in rat fetal membranes. *Regul Pept*, 74(2-3), 129-135.
- Coffer, P. J., Jin, J., et Woodgett, J. R. (1998). Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J*, 335 (Pt 1), 1-13.
- Cooper, J. A., Sefton, B. M., et Hunter, T. (1984). Diverse mitogenic agents induce the phosphorylation of two related 42,000-dalton proteins on tyrosine in quiescent chick cells. *Mol Cell Biol*, 4(1), 30-37.
- D. Voet, J. G. V. (2005). *Biochimie*. Bruxelles
- Daum, G., Eisenmann-Tappe, I., Fries, H. W., Troppmair, J., et Rapp, U. R. (1994). The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci*, 19(11), 474-480.
- de Bold, A. J., Borenstein, H. B., Veress, A. T., et Sonnenberg, H. (1981). A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci*, 28(1), 89-94.
- Drewett, J. G., Trachte, G. J., et Marchand, G. R. (1989). Atrial natriuretic factor inhibits adrenergic and purinergic neurotransmission in the rabbit isolated vas deferens. *J Pharmacol Exp Ther*, 248(1), 135-142.

- Drewett, J. G., Ziegler, R. J., Marchand, G. R., et Trachte, G. J. (1989). Cyclic guanosine 3',5' monophosphate mediates the inhibitory effect of atrial natriuretic factor in adrenergic, neuronal pheochromocytoma cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 250(2), 428-432.
- Eguchi, S., Iwasaki, H., Ueno, H., Frank, G. D., Motley, E. D., Eguchi, K., et al. (1999). Intracellular signaling of angiotensin II-induced p70 S6 kinase phosphorylation at Ser(411) in vascular smooth muscle cells. Possible requirement of epidermal growth factor receptor, Ras, extracellular signal-regulated kinase, and Akt. *J Biol Chem*, 274(52), 36843-36851.
- El Mabrouk, M., Touyz, R. M., et Schiffrin, E. L. (2001). Differential ANG II-induced growth activation pathways in mesenteric artery smooth muscle cells from SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281(1), H30-39.
- Ezzati, M., Lopez, A. D., Rodgers, A., Vander Hoorn, S., et Murray, C. J. (2002). Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet*, 360(9343), 1347-1360.
- Filmus, J., Robles, A. I., Shi, W., Wong, M. J., Colombo, L. L., et Conti, C. J. (1994). Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras. *Oncogene*, 9(12), 3627-3633.
- Flynn, T. G., de Bold, M. L., et de Bold, A. J. (1983). The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem Biophys Res Commun*, 117(3), 859-865.
- Focaccio, A., Volpe, M., Ambrosio, G., Lembo, G., Pannain, S., Rubattu, S., et al. (1993). Angiotensin II directly stimulates release of atrial natriuretic factor in isolated rabbit hearts. *Circulation*, 87(1), 192-198.
- Force, T., et Bonventre, J. V. (1998). Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension*, 31(1 Pt 2), 152-161.
- Fukuda, N., Satoh, C., Hu, W. Y., Soma, M., Kubo, A., Kishioka, H., et al. (1999). Production of angiotensin II by homogeneous cultures of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(5), 1210-1217.
- Fuller, F., Porter, J. G., Arfsten, A. E., Miller, J., Schilling, J. W., Scarborough, R. M., et al. (1988). Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA clones. *J Biol Chem*, 263(19), 9395-9401.
- Genovese, C., Trani, D., Caputi, M., et Claudio, P. P. (2006). Cell cycle control and beyond: emerging roles for the retinoblastoma gene family. *Oncogene*, 25(38), 5201-5209.

- Gladden, A. B., et Diehl, J. A. (2005). Location, location, location: the role of cyclin D1 nuclear localization in cancer. *J Cell Biochem*, 96(5), 906-913.
- Glotzer, M., Murray, A. W., et Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, 349(6305), 132-138.
- Goa, K. L., et Wagstaff, A. J. (1996). Losartan potassium: a review of its pharmacology, clinical efficacy and tolerability in the management of hypertension. *Drugs*, 51(5), 820-845.
- Gomez Sandoval, Y. H., Levesque, L. O., et Anand-Srivastava, M. B. (2009). Contribution of epidermal growth factor receptor transactivation in angiotensin II-induced enhanced expression of Gi protein and proliferation in A10 vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol*, 87(12), 1037-1045.
- Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P., et Eisenman, R. N. (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16, 653-699.
- Hashim, S., Li, Y., et Anand-Srivastava, M. B. (2006). Small cytoplasmic domain peptides of natriuretic peptide receptor-C attenuate cell proliferation through G α protein/MAP kinase/PI3-kinase/AKT pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291(6), H3144-3153.
- Hayashi, K., et Naiki, T. (2009). Adaptation and remodeling of vascular wall; biomechanical response to hypertension. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2(1), 3-19.
- Heagerty, A. M., Aalkjaer, C., Bund, S. J., Korsgaard, N., et Mulvany, M. J. (1993). Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension*, 21(4), 391-397.
- Hirata, M., Chang, C. H., et Murad, F. (1989). Stimulatory effects of atrial natriuretic factor on phosphoinositide hydrolysis in cultured bovine aortic smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, 1010(3), 346-351.
- Hobbs, A., Foster, P., Prescott, C., Scotland, R., et Ahluwalia, A. (2004). Natriuretic peptide receptor-C regulates coronary blood flow and prevents myocardial ischemia/reperfusion injury: novel cardioprotective role for endothelium-derived C-type natriuretic peptide. *Circulation*, 110(10), 1231-1235.
- Horio, T., Nishikimi, T., Yoshihara, F., Matsuo, H., Takishita, S., et Kangawa, K. (2000). Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. *Hypertension*, 35(1 Pt 1), 19-24.

- Intengan, H. D., et Schiffrin, E. L. (2000). Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension*, 36(3), 312-318.
- Intengan, H. D., et Schiffrin, E. L. (2001). Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension*, 38(3 Pt 2), 581-587.
- Itoh, H., Pratt, R. E., Ohno, M., et Dzau, V. J. (1992). Atrial natriuretic polypeptide as a novel antigrowth factor of endothelial cells. *Hypertension*, 19(6 Pt 2), 758-761.
- Jing, L., Zhang, J. Z., Wang, Y. L., et Guo, F. Y. (2006). Over-expression of extracellular signal-regulated kinase in vascular smooth muscle cell of hypertensive rats. *Chin Med Sci J*, 21(1), 36-40.
- Joffres, M. R., Hamet, P., MacLean, D. R., L'Italien G, J., et Fodor, G. (2001). Distribution of blood pressure and hypertension in Canada and the United States. *Am J Hypertens*, 14(11 Pt 1), 1099-1105.
- Jones, S. M., et Kazlauskas, A. (2001). Growth-factor-dependent mitogenesis requires two distinct phases of signalling. *Nat Cell Biol*, 3(2), 165-172.
- Kahan, C., Seuwen, K., Meloche, S., et Pouyssegur, J. (1992). Coordinate, biphasic activation of p44 mitogen-activated protein kinase and S6 kinase by growth factors in hamster fibroblasts. Evidence for thrombin-induced signals different from phosphoinositide turnover and adenylylcyclase inhibition. *J Biol Chem*, 267(19), 13369-13375.
- Kanwal, S., Lowe, D. G., et Trachte, G. J. (1999). Intracellular fragments of the natriuretic peptide receptor-C (NPR-C) attenuate dopamine efflux. *Endocrinology*, 140(3), 1118-1124.
- Katada, T., Gilman, A. G., Watanabe, Y., Bauer, S., et Jakobs, K. H. (1985). Protein kinase C phosphorylates the inhibitory guanine-nucleotide-binding regulatory component and apparently suppresses its function in hormonal inhibition of adenylate cyclase. *Eur J Biochem*, 151(2), 431-437.
- Kato, J., Lanier-Smith, K. L., et Currie, M. G. (1991). Cyclic GMP down-regulates atrial natriuretic peptide receptors on cultured vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 266(22), 14681-14685.
- Khan, N. A., McAlister, F. A., Lewanczuk, R. Z., Touyz, R. M., Padwal, R., Rabkin, S. W., et al. (2005). The 2005 Canadian Hypertension Education Program recommendations for the management of hypertension: part II - therapy. *Can J Cardiol*, 21(8), 657-672.
- Krauss, G. (2008). *Biochemistry of signal transduction and regulation*. 4^e édition.

- Kubo, A., Fukuda, N., Teng, J., Satoh, C., Nakayama, M., Kishioka, H., et al. (2000). Angiotensin II regulates the cell cycle of vascular smooth muscle cells from SHR. *Am J Hypertens*, 13(10), 1117-1124.
- Kumar, A., Marques, M., et Carrera, A. C. (2006). Phosphoinositide 3-kinase activation in late G1 is required for c-Myc stabilization and S phase entry. *Mol Cell Biol*, 26(23), 9116-9125.
- Lappas, G., Daou, G. B., et Anand-Srivastava, M. B. (2005). Oxidative stress contributes to the enhanced expression of G α proteins and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 23(12), 2251-2261.
- Lassegue, B., Alexander, R. W., Clark, M., Akers, M., et Griendling, K. K. (1993). Phosphatidylcholine is a major source of phosphatidic acid and diacylglycerol in angiotensin II-stimulated vascular smooth-muscle cells. *Biochem J*, 292 (Pt 2), 509-517.
- Lee, S. J., Kim, W. J., et Moon, S. K. (2009). TNF- α regulates vascular smooth muscle cell responses in genetic hypertension. *Int Immunopharmacol*, 9(7-8), 837-843.
- Leevers, S. J., Vanhaesebroeck, B., et Waterfield, M. D. (1999). Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr Opin Cell Biol*, 11(2), 219-225.
- Leitman, D. C., Andresen, J. W., Kuno, T., Kamisaki, Y., Chang, J. K., et Murad, F. (1986). Identification of multiple binding sites for atrial natriuretic factor by affinity cross-linking in cultured endothelial cells. *J Biol Chem*, 261(25), 11650-11655.
- Levin, E. R., et Frank, H. J. (1991). Natriuretic peptides inhibit rat astroglial proliferation: mediation by C receptor. *Am J Physiol*, 261(2 Pt 2), R453-457.
- Levin, E. R., Gardner, D. G., et Samson, W. K. (1998). Natriuretic peptides. *N Engl J Med*, 339(5), 321-328.
- Li, Y., et Anand-Srivastava, M. B. (2002). Inactivation of enhanced expression of G(i) proteins by pertussis toxin attenuates the development of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*, 91(3), 247-254.
- Li Y, B. G., and Anand-Srivastava MB. (2005). Enhanced expression of Gi proteins in SHR contributes to the enhanced proliferation of vascular smooth muscle cells: implication of MAPK/PI3K signalling pathway *Can J Cardiol* 21, 155C.
- Li, Y., Hashim, S., et Anand-Srivastava, M. B. (2006). Intracellular peptides of natriuretic peptide receptor-C inhibit vascular hypertrophy via G α /MAP kinase signaling pathways. *Cardiovasc Res*, 72(3), 464-472.

- Liang, J., et Slingerland, J. M. (2003). Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle*, 2(4), 339-345.
- Libby, P., et Tanaka, H. (1994). The pathogenesis of coronary arteriosclerosis ("chronic rejection") in transplanted hearts. *Clin Transplant*, 8(3 Pt 2), 313-318.
- Lilly, L. S. (Éd.). (c2007). *Pathophysiology of heart disease : a collaborative project of medical students and faculty* (4th ed.^e éd.). Baltimore, MD Lippincott Williams & Wilkins.
- Liu, J. J., Chao, J. R., Jiang, M. C., Ng, S. Y., Yen, J. J., et Yang-Yen, H. F. (1995). Ras transformation results in an elevated level of cyclin D1 and acceleration of G1 progression in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol*, 15(7), 3654-3663.
- Liu LM, et Yoshimi T. (1995) The changes in natriuretic peptide receptors (NP-R) in the lung and kidney in DOCA-salt hypertensive rats. *Nippon Naibunpi Gakkai Zashi*, 71:587-596
- Liu, M. W., Roubin, G. S., et King, S. B., 3rd. (1989). Restenosis after coronary angioplasty. Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. *Circulation*, 79(6), 1374-1387.
- Lu, H. K., Fern, R. J., Luthin, D., Linden, J., Liu, L. P., Cohen, C. J., et al. (1996). Angiotensin II stimulates T-type Ca²⁺ channel currents via activation of a G protein, Gi. *Am J Physiol*, 271(4 Pt 1), C1340-1349.
- Maack, T., Suzuki, M., Almeida, F. A., Nussenzveig, D., Scarborough, R. M., McEnroe, G. A., et al. (1987). Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science*, 238(4827), 675-678.
- Mantymaa, P., Leppaluoto, J., et Ruskoaho, H. (1990). Endothelin stimulates basal and stretch-induced atrial natriuretic peptide secretion from the perfused rat heart. *Endocrinology*, 126(1), 587-595.
- Marcil, J., Thibault, C., et Anand-Srivastava, M. B. (1997). Enhanced expression of Gi-protein precedes the development of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Mol Cell Cardiol*, 29(3), 1009-1022.
- Marieb, E. N. (2008). *Biologie humaine : principes d'anatomie et de physiologie*. (2^e éd.). Saint Laurent, Paris: ERPI ; Pearson Education France.
- Matsukawa, N., Grzesik, W. J., Takahashi, N., Pandey, K. N., Pang, S., Yamauchi, M., et al. (1999). The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(13), 7403-7408.

- Matsushime, H., Quelle, D. E., Shurtleff, S. A., Shibuya, M., Sherr, C. J., et Kato, J. Y. (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 14(3), 2066-2076.
- Maturana, A. D., Casal, A. J., Demaurex, N., Vallotton, M. B., Capponi, A. M., et Rossier, M. F. (1999). Angiotensin II negatively modulates L-type calcium channels through a pertussis toxin-sensitive G protein in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem*, 274(28), 19943-19948.
- Meloche, S. (1995). Cell cycle reentry of mammalian fibroblasts is accompanied by the sustained activation of p44mapk and p42mapk isoforms in the G1 phase and their inactivation at the G1/S transition. *J Cell Physiol*, 163(3), 577-588.
- Meloche, S., Seuwen, K., Pages, G., et Pouyssegur, J. (1992). Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. *Mol Endocrinol*, 6(5), 845-854.
- Michel, J. B., De Roux, N., Plissonnier, D., Anidjar, S., Salzmann, J. L., et Levy, B. (1990). Pathophysiological role of the vascular smooth muscle cell. *J Cardiovasc Pharmacol*, 16 Suppl 1, S4-11.
- Mii, S., Khalil, R. A., Morgan, K. G., Ware, J. A., et Kent, K. C. (1996). Mitogen-activated protein kinase and proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 270(1 Pt 2), H142-150.
- Misono, K. S., Grammer, R. T., Fukumi, H., et Inagami, T. (1984). Rat atrial natriuretic factor: isolation, structure and biological activities of four major peptides. *Biochem Biophys Res Commun*, 123(2), 444-451.
- Molloy, C. J., Taylor, D. S., et Weber, H. (1993). Angiotensin II stimulation of rapid protein tyrosine phosphorylation and protein kinase activation in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 268(10), 7338-7345.
- Morishita, R., Gibbons, G. H., Pratt, R. E., Tomita, N., Kaneda, Y., Ogihara, T., et al. (1994). Autocrine and paracrine effects of atrial natriuretic peptide gene transfer on vascular smooth muscle and endothelial cellular growth. *J Clin Invest*, 94(2), 824-829.
- Mouawad, R., Li, Y., et Anand-Srivastava, M. B. (2004). Atrial natriuretic peptide-C receptor-induced attenuation of adenylyl cyclase signaling activates phosphatidylinositol turnover in A10 vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*, 65(4), 917-924.
- Murthy, K. S., et Makhlof, G. M. (1999). Identification of the G protein-activating domain of the natriuretic peptide clearance receptor (NPR-C). *J Biol Chem*, 274(25), 17587-17592.

- Nakamura, K. D., Martinez, R., et Weber, M. J. (1983). Tyrosine phosphorylation of specific proteins after mitogen stimulation of chicken embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 3(3), 380-390.
- Napier, M. A., Dewey, R. S., Albers-Schonberg, G., Bennett, C. D., Rodkey, J. A., Marsh, E. A., et al. (1984). Isolation and sequence determination of peptide components of atrial natriuretic factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 120(3), 981-988.
- Naruse, M., Yoshimoto, T., Tanabe, A., et Naruse, K. (1998). [Pathophysiological significance of the natriuretic peptide system: receptor subtype as another key factor]. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 112(3), 147-154.
- Nunez, D. J., Dickson, M. C., et Brown, M. J. (1992). Natriuretic peptide receptor mRNAs in the rat and human heart. *J Clin Invest*, 90(5), 1966-1971.
- Nurse, P. (1996). The central role of a CDK in controlling the fission yeast cell cycle. *Harvey Lect*, 92, 55-64.
- Nussenzveig, D. R., Lewicki, J. A., et Maack, T. (1990). Cellular mechanisms of the clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor. *J Biol Chem*, 265(34), 20952-20958.
- Okamoto, K., et Aoki, K. (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*, 27, 282-293.
- Oudit, G. Y., Sun, H., Kerfant, B. G., Crackower, M. A., Penninger, J. M., et Backx, P. H. (2004). The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol*, 37(2), 449-471.
- Pagano, M., et Anand-Srivastava, M. B. (2001). Cytoplasmic domain of natriuretic peptide receptor C constitutes Gi activator sequences that inhibit adenylyl cyclase activity. *J Biol Chem*, 276(25), 22064-22070.
- Palaparti, A., Ge, C., et Anand-Srivastava, M. B. (1999). Angiotensin II enhances the expression of G α in A10 cells (smooth muscle): relationship with adenylyl cyclase activity. *Arch Biochem Biophys*, 365(1), 113-122.
- Palaparti, A., Li, Y., et Anand-Srivastava, M. B. (2000). Inhibition of atrial natriuretic peptide (ANP) C receptor expression by antisense oligodeoxynucleotides in A10 vascular smooth-muscle cells is associated with attenuation of ANP-C-receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase. *Biochem J*, 346 Pt 2, 313-320.
- Paquet, J. L., Baudouin-Legros, M., Marche, P., et Meyer, P. (1989). Enhanced proliferating activity of cultured smooth muscle cells from SHR. *Am J Hypertens*, 2(2 Pt 1), 108-110.

- Pardee, A. B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(4), 1286-1290.
- Patel, J. H., Loboda, A. P., Showe, M. K., Showe, L. C., et McMahon, S. B. (2004). Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC. *Nat Rev Cancer*, 4(7), 562-568.
- Pedram, A., Razandi, M., Hu, R. M., et Levin, E. R. (1998). Astrocyte progression from G1 to S phase of the cell cycle depends upon multiple protein interaction. *J Biol Chem*, 273(22), 13966-13972.
- Peeper, D. S., Upton, T. M., Ladha, M. H., Neuman, E., Zalvide, J., Bernards, R., et al. (1997). Ras signalling linked to the cell-cycle machinery by the retinoblastoma protein. *Nature*, 386(6621), 177-181.
- Pocok G., et Richards C. D., (2004) Physiologie humaine: les fondements de la médecine. Paris : Masson
- Porter, L. A., et Donoghue, D. J. (2003). Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators. *Prog Cell Cycle Res*, 5, 335-347.
- Potter LR, Abbey-Hosch S, et Dickey DM. (2006). Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev*, 27(1):47-7
- Potter, L. R., Yoder, A. R., Flora, D. R., Antos, L. K., et Dickey, D. M. (2009). Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handb Exp Pharmacol*(191), 341-366.
- Powell, J. S., Muller, R. K., Rouge, M., Kuhn, H., Hefti, F., et Baumgartner, H. R. (1990). The proliferative response to vascular injury is suppressed by angiotensin-converting enzyme inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol*, 16 Suppl 4, S42-49.
- Prins, B. A., Weber, M. J., Hu, R. M., Pedram, A., Daniels, M., et Levin, E. R. (1996). Atrial natriuretic peptide inhibits mitogen-activated protein kinase through the clearance receptor. Potential role in the inhibition of astrocyte proliferation. *J Biol Chem*, 271(24), 14156-14162.
- Rapoport, R. M. (1986). Cyclic guanosine monophosphate inhibition of contraction may be mediated through inhibition of phosphatidylinositol hydrolysis in rat aorta. *Circ Res*, 58(3), 407-410.
- Resink, T. J., Scott-Burden, T., Baur, U., et Buhler, F. R. (1987). Increased proliferation fate and phosphoinositide turnover in cultured smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens Suppl*, 5(5), S145-148.

- Ross, R. (1995). Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol*, 57, 791-804.
- Ruppert, V., et Maisch, B. (2003). Genetics of human hypertension. *Herz*, 28(8), 655-662.
- Sabbatini, M. E., Vatta, M. S., Vescina, C., Gonzales, S., Fernandez, B., et Bianciotti, L. G. (2003). NPR-C receptors are involved in C-type natriuretic peptide response on bile secretion. *Regul Pept*, 116(1-3), 13-20.
- Saha, S., Li, Y., Lappas, G., et Anand-Srivastava, M. B. (2008). Activation of natriuretic peptide receptor-C attenuates the enhanced oxidative stress in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats: implication of G α protein. *J Mol Cell Cardiol*, 44(2), 336-344.
- Saito, Y., et Berk, B. C. (2001). Transactivation: a novel signaling pathway from angiotensin II to tyrosine kinase receptors. *J Mol Cell Cardiol*, 33(1), 3-7.
- Satoh, C., Fukuda, N., Hu, W. Y., Nakayama, M., Kishioka, H., et Kanmatsuse, K. (2001). Role of endogenous angiotensin II in the increased expression of growth factors in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 37(1), 108-118.
- Savoie, P., de Champlain, J., et Anand-Srivastava, M. B. (1995). C-type natriuretic peptide and brain natriuretic peptide inhibit adenylyl cyclase activity: interaction with ANF-R2/ANP-C receptors. *FEBS Lett*, 370(1-2), 6-10.
- Saward, L., et Zahradka, P. (1997). Angiotensin II activates phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 81(2), 249-257.
- Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K., et Nevins, J. R. (2000). Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev*, 14(19), 2501-2514.
- Seeger, R., et Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J*, 9(9), 726-735.
- Seki, T., Yokoshiki, H., Sunagawa, M., Nakamura, M., et Sperelakis, N. (1999). Angiotensin II stimulation of Ca²⁺-channel current in vascular smooth muscle cells is inhibited by lavendustin-A and LY-294002. *Pflugers Arch*, 437(3), 317-323.
- Seta, K., Nanamori, M., Modrall, J. G., Neubig, R. R., et Sadoshima, J. (2002). AT1 receptor mutant lacking heterotrimeric G protein coupling activates the Src-Ras-ERK pathway without nuclear translocation of ERKs. *J Biol Chem*, 277(11), 9268-9277.
- Sherr, C. J. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell*, 73(6), 1059-1065.

- Sherr, C. J., et Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, 13(12), 1501-1512.
- Silberbach, M., Gorenc, T., Hershberger, R. E., Stork, P. J., Steyger, P. S., et Roberts, C. T., Jr. (1999). Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for the anti-hypertrophic effect of atrial natriuretic factor in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem*, 274(35), 24858-24864.
- Smrcka, A. V., Hepler, J. R., Brown, K. O., et Sternweis, P. C. (1991). Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science*, 251(4995), 804-807.
- Spencer, C. A., et Groudine, M. (1991). Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res*, 56, 1-48.
- Sudoh, T., Kangawa, K., Minamino, N., et Matsuo, H. (1988). A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature*, 332(6159), 78-81.
- Sudoh, T., Minamino, N., Kangawa, K., et Matsuo, H. (1990). C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 168(2), 863-870.
- Sugden, P. H., et Clerk, A. (1997). Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal*, 9(5), 337-351.
- Suhasini, M., Li, H., Lohmann, S. M., Boss, G. R., et Pilz, R. B. (1998). Cyclic-GMP-dependent protein kinase inhibits the Ras/Mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol*, 18(12), 6983-6994.
- Sun, A., Bagella, L., Tutton, S., Romano, G., et Giordano, A. (2007). From G0 to S phase: a view of the roles played by the retinoblastoma (Rb) family members in the Rb-E2F pathway. *J Cell Biochem*, 102(6), 1400-1404.
- Takahashi, T., Taniguchi, T., Konishi, H., Kikkawa, U., Ishikawa, Y., et Yokoyama, M. (1999). Activation of Akt/protein kinase B after stimulation with angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 276(6 Pt 2), H1927-1934.
- Taniyama, Y., Ushio-Fukai, M., Hitomi, H., Rocic, P., Kingsley, M. J., Pfahnl, C., et al. (2004). Role of p38 MAPK and MAPKAPK-2 in angiotensin II-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287(2), C494-499.
- Tanner, F. C., Greutert, H., Barandier, C., Frischknecht, K., et Luscher, T. F. (2003). Different cell cycle regulation of vascular smooth muscle in genetic hypertension. *Hypertension*, 42(2), 184-188.

- Timmermans, P. B., Wong, P. C., Chiu, A. T., Herblin, W. F., Benfield, P., Carini, D. J., et al. (1993). Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev*, 45(2), 205-251.
- Tortora GJ, Derrickson B. (1996). Principles of Anatomy and Physiology. (12^e éd.), Hoboken, N.J. : John Wiley & Sons
- Touyz, R. M., He, G., Wu, X. H., Park, J. B., Mabrouk, M. E., et Schiffrin, E. L. (2001). Src is an important mediator of extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent growth signaling by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients. *Hypertension*, 38(1), 56-64.
- Touyz, R. M., et Schiffrin, E. L. (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*, 52(4), 639-672.
- Trachte, G. J., Kanwal, S., Elmquist, B. J., et Ziegler, R. J. (1995). C-type natriuretic peptide neuromodulates via "clearance" receptors. *Am J Physiol*, 268(4 Pt 1), C978-984.
- Tseng, Y. C., Lahiri, S., Sellitti, D. F., Burman, K. D., D'Avis, J. C., et Wartofsky, L. (1990). Characterization by affinity cross-linking of a receptor for atrial natriuretic peptide in cultured human thyroid cells associated with reductions in both adenosine 3',5'-monophosphate production and thyroglobulin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 70(2), 528-533.
- Tsuda, T., et Alexander, R. W. (1990). Angiotensin II stimulates phosphorylation of nuclear lamins via a protein kinase C-dependent mechanism in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 265(2), 1165-1170.
- Ullian, M. E., et Linas, S. L. (1990). Angiotensin II surface receptor coupling to inositol trisphosphate formation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 265(1), 195-200.
- van den Akker, F. (2001). Structural insights into the ligand binding domains of membrane bound guanylyl cyclases and natriuretic peptide receptors. *J Mol Biol*, 311(5), 923-937.
- Varticovski, L., Harrison-Findik, D., Keeler, M. L., et Susa, M. (1994). Role of PI 3-kinase in mitogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1226(1), 1-11.
- Vasan, R. S., Larson, M. G., Leip, E. P., Evans, J. C., O'Donnell, C. J., Kannel, W. B., et al. (2001). Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med*, 345(18), 1291-1297.
- Vecchione, C., Patrucco, E., Marino, G., Barberis, L., Poulet, R., Aretini, A., et al. (2005). Protection from angiotensin II-mediated vasculotoxic and

- hypertensive response in mice lacking PI3Kgamma. *J Exp Med*, 201(8), 1217-1228.
- Veress, A. T., Milojevic, S., Yip, C., Flynn, T. G., et Sonnenberg, H. (1988). In vitro secretion of atrial natriuretic factor: receptor-mediated release of prohormone. *Am J Physiol*, 254(5 Pt 2), R809-814.
- Villar, I. C., Panayiotou, C. M., Sheraz, A., Madhani, M., Scotland, R. S., Nobles, M., et al. (2007). Definitive role for natriuretic peptide receptor-C in mediating the vasorelaxant activity of C-type natriuretic peptide and endothelium-derived hyperpolarising factor. *Cardiovasc Res*, 74(3), 515-525.
- Voet D., et Voet J. G. (2004) Biochemistry. (3^e éd.) New York, John Wiley & Sons
- Walter F. Boron, Emile L. Boulpaep.(2009) *Medical physiology : a cellular and molecular approach*. (2^e éd.) Philadelphia, PA : Saunders/Elsevier
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., et Johnson, G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, 79(1), 143-180.
- Woodard, G. E., Zhao, J., Rosado, J. A., et Brown, J. (2004). Patterning of renal cGMP production by the natriuretic peptide receptor type A and blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Regul Pept*, 119(1-2), 45-51.
- Xu, G. Z., Tian, J., Zhong, Y. M., et Yang, X. L. (2010) Natriuretic peptide receptors are expressed in rat retinal ganglion cells. *Brain Res Bull*. 82(3-4):188-92
- Yamada, T., Akishita, M., Pollman, M. J., Gibbons, G. H., Dzau, V. J., et Horiuchi, M. (1998). Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: an in vitro gene transfer study. *Life Sci*, 63(19), PL289-295.
- Yamamoto, T., Ebisuya, M., Ashida, F., Okamoto, K., Yonehara, S., et Nishida, E. (2006). Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Curr Biol*, 16(12), 1171-1182.
- Yandle, T. G. (1994). Biochemistry of natriuretic peptides. *J Intern Med*, 235(6), 561-576.
- Yoshimoto, T., Naruse, M., Naruse, K., Arai, K., Imaki, T., Tanabe, A., et al. (1996). Vascular action of circulating and local natriuretic peptide systems is potentiated in obese/hyperglycemic and hypertensive rats. *Endocrinology*, 137(12), 5552-5557.