

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Détermination des domaines du facteur de transcription  
GATA4 impliqués dans l'hypertrophie et la survie des  
cardiomyocytes**

par

Emmanuel Roy

Département des sciences biomédicales, Université de Montréal  
Faculté de Médecine

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

Mars, 2008

© Emmanuel Roy, 2008



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Détermination des domaines du facteur de transcription GATA4 impliqués dans  
l'hypertrophie et la survie des cardiomyocytes**

présenté par :  
Emmanuel Roy

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

D<sup>r</sup> Jean-Philippe Gratton, président-rapporteur  
D<sup>re</sup> Mona Nemer, directrice de recherche  
D<sup>re</sup> Lise Coderre, membre du jury

## Résumé

L'hypertrophie cardiaque, laquelle se traduit par l'augmentation de la taille des cardiomyocytes, est initialement reliée à des mécanismes physiologiques compensatoires qui progressent cependant vers des complications tels le remodelage cardiovasculaire et l'insuffisance cardiaque. L'hypertrophie peut cependant être bénéfique pour la fonction cardiaque, mais les connaissances actuelles sur les voies de signalisation intracellulaires ne permettent pas de dissocier clairement les mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypertrophie cardiaque de nature pathologique ou physiologique. Le facteur de transcription GATA4 est un régulateur clé du développement cardiaque et il est également essentiel à la réponse adaptative du cœur face au stress, associée à l'hypertrophie et la survie des cardiomyocytes. Des travaux antérieurs de notre laboratoire nous ont permis d'identifier *in vitro* différentes régions fonctionnelles de la protéine GATA4 reliées à la régulation transcriptionnelle de gènes hypertrophiques comme l'ANP, le BNP et  $\alpha$ - $\beta$ -MHC. Dans la présente étude, nous avons utilisé la technique de transfert de gènes via des vecteurs d'expression adénoviraux pour établir l'implication de certains domaines fonctionnels de la protéine GATA4 dans l'hypertrophie et l'apoptose des cardiomyocytes. De plus, nous avons évalué les effets de la surexpression de PEX1, un cofacteur de GATA4, également effecteur de la réponse hypertrophique des cardiomyocytes. Il a été trouvé que le domaine de transactivation N-terminal de GATA4 est essentiel pour la réorganisation cytosquelettique. Aussi, les sites de phosphorylation et d'interaction aux MAPK S105 et F108, respectivement, semblent participer à la réponse hypertrophique, mais ils sont principalement requis pour la survie cellulaire. De plus, les résultats de cette étude suggèrent que PEX1 possède un rôle d'activateur transcriptionnel clé dans l'hypertrophie et la survie des cardiomyocytes, et que son activité est intimement liée à celle de GATA4. Ce travail aura donc identifié et caractérisé un nouveau régulateur de la fonction cardiaque. Par conséquent, les travaux effectués dans le cadre de ce mémoire ont contribué à améliorer la compréhension des mécanismes transcriptionnels impliqués dans la reprogrammation génétique de l'hypertrophie cardiaque et la survie des cardiomyocytes, ce qui pourrait éventuellement mener au développement d'approches préventives et/ou thérapeutiques pour contrer certaines maladies cardiovasculaires.

**Mots-clés** : adénovirus, apoptose, cardiomyocytes, GATA4, hypertrophie cardiaque, MAPK, PEX1, survie cellulaire.

## Abstract

Cardiac hypertrophy, which is characterized by increased cardiomyocytes size, is primarily related to different compensatory physiological mechanisms progressing into different cardiac diseases, such as cardiovascular remodeling and heart failure. Despite the fact that hypertrophy can be beneficial for heart function, actual knowledge concerning intracellular signaling pathways doesn't allow a clear dissociation of molecular mechanisms implicated either in physiological or pathological cardiac hypertrophic responses. The transcription factor GATA4 is a key regulator of cardiac development and has also been considered essential for cardiac adaptive responsiveness toward stress, throughout hypertrophy and cardiomyocytes survival. Reports from our laboratory helped us to map, *in vitro*, different functional regions of GATA4 related to transcriptional upregulation of hypertrophic genes expression such as ANP, BNP and  $\alpha$ - $\beta$ -MHC. The gene transfer technique mediated by adenoviral expression vectors has been used to determine whether functional domains of GATA4 protein are implicated in myocytes hypertrophy and apoptosis. Furthermore, we evaluated PEX1 overexpression effect on cardiomyocytes hypertrophy, a novel transcription factor also considered as a GATA4 cofactor. We principally found that GATA4 N-terminal transactivation domain is essential for cytoskeletal reorganization. According to our results, MAPK phosphorylation and interaction sites S105 and F108, respectively, seem to participate in hypertrophic response, but are mainly required for cell survival. Moreover, this study suggests that PEX1, whose activity is intimately related to GATA4, would be a key transcriptional activator of cardiomyocytes hypertrophy and survival. This work identifies and characterizes a novel regulator of cardiac function. Therefore, the advances of this report increase the actual knowledge related to transcriptional mechanisms implicated in genetic reprogramming of cardiac hypertrophy and cardiomyocytes survival, which could eventually lead to the development of preventive and/or therapeutic approaches to counteract cardiovascular diseases.

**Keywords** : adenovirus, apoptosis, cardiac hypertrophy, cardiomyocytes, cell survival, GATA4, MAPK, PEX1.

# Table des matières

<b>CHAPITRE I. INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1.1 RÉPONSE GÉNÉTIQUE DU CŒUR À LA SURCHARGE CARDIAQUE.....	3
1.2 PEPTIDES NATRIURÉTIQUES.....	6
1.2.1 Familles et récepteurs.....	7
1.2.2 Régulation transcriptionnelle de l'ANP/BNP dans la croissance cardiaque.....	8
1.3 LES VOIES DE SIGNALISATION DANS L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE.....	12
1.3.1 Rôle des récepteurs adrénergiques et autres hormones dans le cœur.....	13
1.3.2 SIGNALISATION COUPLÉE AUX RÉCEPTEURS DES PROTÉINES G.....	17
1.3.2.1 Protéines G et signalisation intracellulaire.....	17
1.3.2.2 Petites protéines G.....	21
1.4 PROTÉINES KINASES IMPLIQUÉES DANS L'HYPERTROPHIE.....	24
1.4.1 Les kinases phosphatidylinositol-3 (PI3K).....	24
1.4.2 Les protéines kinases AKT (ou protéines kinases B-PKB).....	26
1.4.3 Les protéines kinases C (PKC).....	28
1.4.4 Les protéines kinases mitogéniques (MAPK).....	31
1.4.5 Phosphatases.....	40
1.5 LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION CARDIAQUES IMPLIQUÉS DANS L'HYPERTROPHIE.....	46
1.5.1 La famille GATA: expression et fonction.....	47
1.5.2 Cofacteurs de GATA-4 dans l'hypertrophie cardiaque.....	55
1.6.1 APOPTOSE ET MALADIES CARDIAQUES.....	65
1.6.1.1 Gènes pro-apoptotiques et anti-apoptotiques.....	69
1.6.1.2 GATA4 : un facteur cardioprotecteur.....	72
1.7 DESCRIPTION DU PROJET.....	76
<b>CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODOLOGIE</b> .....	<b>78</b>
2.1 PRÉPARATION DES ADÉNOVIRUS.....	78
2.1.1 Construction des vecteurs.....	78
2.1.2 Production virale.....	79
2.1.3 Purification des adénovirus.....	80
2.2 CULTURES PRIMAIRES DE CARDIOMYOCYTE.....	81
2.2.1 Préparation des cardiomyocytes.....	81
2.2.2 Infections avec les adénovirus.....	83

2.2.3 Traitements à la doxorubicine.....	84
2.3 ANALYSES PROTÉIQUES .....	84
2.3.1 Préparation des extraits nucléaires et cytoplasmiques .....	84
2.3.2 Préparation des extraits cellulaires totaux .....	85
2.3.3 SDS-PAGE/Western Blot.....	86
2.4 ANALYSES D'ARN.....	88
2.4.1 Extraction de l'ARN total.....	88
2.4.2 Préparation des ADN complémentaires.....	89
2.5 PCR QUANTITATIF .....	89
2.6 ANALYSES CELLULAIRES .....	91
2.6.1 Immunofluorescences.....	91
2.6.2 TUNEL .....	92
2.6.3 Analyse de la régulation transcriptionnelle .....	93
<b>CHAPITRE III. RÉSULTATS.....</b>	<b>95</b>
3.1 RÔLE DU DOMAINE DE TRANSACTIVATION N-TERMINAL DE GATA4 DANS L'HYPERTROPHIE ET LA CARDIOPROTECTION .....	95
3.1.1 Construction et caractérisation des adénovirus GATA4.....	95
3.1.2 Effet des différents adénovirus sur la réorganisation sarcomérique des cardiomyocytes.....	101
3.1.3 Effet des différents mutants de GATA4 sur l'expression des marqueurs de l'hypertrophie.....	104
3.1.4 Effet des différents adénovirus sur la survie cellulaire et la cardioprotection.....	107
3.2 RÔLE DE LA PROTÉINE PEX1 DANS LA CROISSANCE ET LA SURVIE DES CARDIOMYOCYTES .....	115
3.2.1 Construction et caractérisation de l'adénovirus PEX1.....	115
3.2.2 Effet de la surexpression de PEX1 sur la réorganisation du cytosquelette et les marqueurs de l'hypertrophie.....	117
3.2.3 Co-régulation mutuelle de PEX1 et GATA4.....	120
<b>CHAPITRE IV. DISCUSSION.....</b>	<b>124</b>
4.1 RÉGULATION DU PROGRAMME GÉNÉTIQUE DE L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE.....	125
4.2 DOMAINES FONCTIONNELS DE GATA4 IMPLIQUÉS DANS L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE .....	127
4.3 RÔLE DE PEX1 DANS L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE.....	131
4.4 RÉGULATION DE LA SURVIE DES CARDIOMYOCYTES .....	134
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES FUTURES.....</b>	<b>140</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>144</b>

## Liste des sigles et abréviations

**actine-F**: actine filamenteuse  
**ADN**: acide désoxyribonucléique  
**ADNc**: acide désoxyribonucléique complémentaire  
**ADP**: *adenosine 5'-diphosphate*  
**ARNm**: acide ribonucléique messenger  
**ARNsi**: acide ribonucléique *small interfering*  
**ATF**: *activator transcription factor*  
 **$\alpha$ Ca**: actine cardiaque  
 **$\alpha$ -MHC**:  *$\alpha$ -myosine heavy chain*  
 **$\alpha$ -SkA**:  *$\alpha$ -skeletal actin*  
**AC**: adénylate cyclase  
**AMPC**: adénosine 3',5'-monophosphate cyclique  
**Ang II**: angiotensine II  
**ANP**: *atrial natriuretic peptide*  
**AP-1**: *activator protein-1*  
**APaf-1**: *apoptosis protease activating factor-1*  
**ASK1**: *apoptosis signal-regulating kinase-1*  
**AT<sub>1</sub>R**: *angiotensine II type-1 receptor*  
**ARF**: *ADP ribosylation factor*  
 **$\beta$ -MHC**:  *$\beta$ -myosine heavy chain*  
**BNP**: *brain natriuretic peptide*  
**BSA**: *bovine serum albumin*  
**CaMK**: *calmoduline kinase*  
**CAT**: *chloramphenicol acetyl transferase*  
**caspace**: *cysteine-dependante aspartate-directed protease*  
**CMD**: cardiomyopathie dilatée  
**CMV**: cytomégalovirus  
**CNP**: *C-type natriuretic peptide*  
**CRE**: *cyclization recombinase gene*  
**CsCl**: chlorure de césium  
**cyt C**: cytochrome C  
**DAG**: diacylglycérol  
**DOX**: doxorubicine  
**DTA**: domaine de transactivation  
**DLA**: domaine de liaison à l'ADN  
**DMEM**: *Dulbecco's Eagle's modified medium*  
**DZ**: doigt de zinc  
***E.coli***: *Escherichia coli*  
**EGF**: *epidermal growth factor*  
**ERAD**: *endoplasmic reticulum-associated degradation*  
**ERK**: *extracellular signal regulated kinase*



**ET-1:** endothéline-1  
**ETS:** *E twenty six*  
**FBS:** *fetal bovine serum*  
**GDP:** *guanosine 5'-diphosphate*  
**GSK-3 $\beta$ :** *glycogène-synthase-kinase 3  $\beta$*   
**GTP:** *guanosine 5'-triphosphate*  
**HA:** *hémagglutinine*  
**HDAC:** *histone déacétylase*  
**HEK:** *human embryonic kidney (cell)*  
**HGF:** *hepatocyte growth factor*  
**IGF-1:** *insulin growth factor-1*  
**IM:** *infarctus du myocarde*  
**IL:** *interleukine*  
**IP<sub>3</sub>:** *inositol triphosphate*  
**JNK:** *c-Jun-NH<sub>2</sub> terminal kinase*  
**KO:** *knock-out*  
**MADS:** *Mcm1; Arg80; Agamous; Deficiens; SRF*  
**MAPK:** *mitogen activated kinase*  
**MAPKK:** *MAPK-kinase*  
**MAPKKK:** *MAPKK-kinase*  
**MCIP1:** *myocyte-enriched calcineurin-interacting protein 1*  
**MEF2:** *myocyte enhancer factor-2*  
**MER:** *murine estrogen receptor*  
**MKP:** *MAPK phosphatases*  
**MLC:** *myosin light chain*  
**MOI:** *multicaplity of infection*  
**m-TOR:** *mammalian target of rapamycin*  
**NE:** *norépinéphrine*  
**NEP:** *neutral endopeptidase*  
**NFATc:** *nuclear factor of activated T-cell*  
**NF- $\kappa$ B:** *nuclear factor- $\kappa$ B*  
**NGF:** *nerve growth factor*  
**NPPA:** *natriuretic precursor peptide A*  
**NPPB:** *natriuretic precursor peptide B*  
**NPR:** *natriuretic peptide receptor*  
**pb:** *paire de bases*  
**PBS:** *Phosphate Buffered Saline*  
**PCR:** *polymerase chain reaction*  
**PDGF:** *platelet derived growth factor*  
**PDK:** *phosphatidylinositol-dependante kinase*  
**PE:** *phényléphrine*  
**PenStrep:** *pénicilline streptomycine*  
**PERE:** *phenylephrine response element*  
**PEX1:** *phenylephrin induced complex-1*

**pfu:** plaque forming unit  
**PH:** pleckstrine homologue  
**PI3K:** phosphatidylinositol-3 kinase  
**PIP<sub>2</sub>:** phosphatidylinositol (4, 5)-biphosphate  
**PIP<sub>3</sub>:** phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate  
**PKA:** protéine kinase A  
**PKB:** protéine kinase B  
**PKC:** protéine kinase C  
**PLC:** phospholipase C  
**PP2B:** protéine phosphatase-2B  
**qPCR:** quantitative polymerase chain reaction  
**Ral GDS:** GDP-dissociation stimulator  
**RCPG:** récepteurs couplés aux protéines G  
**RE:** réticulum endoplasmique  
**RTK:** récepteur de tyrosine kinase  
**SAPK:** stress-activated protein kinase  
**SDS-PAGE:** sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  
**SEM:** standard error mean  
**ser:** sérine  
**SF:** serum free  
**SFHF:** serum free; hormone free  
**SHR:** spontaneously hypertensive rat  
**SLN:** séquence de localisation nucléaire  
**SRF:** serum response factor  
**Tdt:** Terminal Deoxynucleotidyltransferase  
**T<sub>M</sub>:** melting temperature  
**TUNEL:** Terminal Deoxynucleotidyltransferase-Mediated dUTP End-Labeling  
**VEGF:** vascular endothelial growth factor  
**Zfp:** zinc finger protein

## Liste des tableaux

<b>TABLEAU I:</b>	SOMMAIRE DES COFACTEURS/COLLABORATEURS DE GATA4 DANS LE CŒUR ET DESCRIPTION DU RÔLE DE LA COLLABORATION, DES RÉGIONS INTERACTIVES DE GATA4 ET DE CERTAINS PROMOTEURS CIBLES .....	56
<b>TABLEAU II-</b>	COMPOSITION DES MILIEUX SANS SERUM (SF) ET SANS SERUM / SANS HORMONE (SFHF) UTILISES POUR LA CULTURE PRIMAIRE DES CARDIOMYOCYTES DE RATS NEONATAUX .....	82
<b>TABLEAU III:</b>	DESCRIPTION DES ANTICORPS UTILISES LORS DES ANALYSES DE WESTERN BLOT ET LES IMMUNOFLUORESCENCES.....	87
<b>TABLEAU IV:</b>	DESCRIPTION DES OLIGONUCLEOTIDES UTILISES LORS DES ANALYSES PAR QPCR.....	90

## Liste des figures

<b>FIGURE 1.</b> LES DIVERS TYPES D'HYPERTROPHIE CARDIAQUE .....	2
<b>FIGURE 2.</b> LOCI DES GÈNES DE L'ANP/BNP CHEZ L'HUMAIN ET ORGANISATION STRUCTURALE DE LEURS PROMOTEURS .....	11
<b>FIGURE 3.</b> RÉCEPTEUR COUPLÉ AUX PROTÉINES G.....	18
<b>FIGURE 4.</b> CARTOGRAPHIE DE LA PROTÉINE GATA4: IDENTIFICATION DES DOMAINES FONCTIONNELS D'INTERACTION AVEC LES PROTÉINES KINASES.....	55
<b>FIGURE 5.</b> VOIES SIGNALÉTIQUES IMPLIQUÉES DANS L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE.....	57
<b>FIGURE 6.</b> VOIES RELIÉES À L'APOPTOSE ET LA SURVIE CELLULAIRE DANS LES CARDIOMYOCYTES .....	67
<b>FIGURE 7.</b> PROTEINE GATA4 ET CONSTRUCTION DES ADENOVIRUS .....	96
<b>FIGURE 8.</b> SUREXPRESSION DES DIFFERENTS MUTANTS GATA4 .....	100
<b>FIGURE 9.</b> REORGANISATION DE L'ACTINE ET EXPRESSION DE L'ANP DANS LES CARDIOMYOCYTES INFECTES AVEC LE VIRUS GATA4 <i>WILD TYPE</i> .....	102
<b>FIGURE 12.</b> EFFET CARDIOPROTECTEUR DE GATA4.....	109
<b>FIGURE 13.</b> EFFET DES DIFFERENTES PROTEINES GATA4 SUR LA SURVIE CELLULAIRE .....	110
<b>FIGURE 14.</b> EFFET DES DIFFERENTES PROTEINES GATA4 SUR L'EXPRESSION DE LA PROTEINE ANTIAPOPTOTIQUE BCL-X .....	113
<b>FIGURE 15.</b> EFFET DE GATA4 WT ET SES MUTANTS SUR LE PROMOTEUR BCL-XL .....	114
<b>FIGURE 16.</b> ADENOVIRUS PEX1 ET SUREXPRESSION DE LA PROTEINE .....	116
<b>FIGURE 17.</b> EFFET DE PEX1 SUR LA REORGANISATION CELLULAIRE ET LES MARQUEURS D'HYPERTROPHIE. .	119
<b>FIGURE 18.</b> INTERACTIONS REGULATRICES ENTRE PEX1 ET GATA4 .....	121
<b>FIGURE 19.</b> EFFET DE LA SUREXPRESSION DE PEX1 SUR LA SURVIE CELLULAIRE.....	123

*À ma famille, mes amis, la musique et la vie...*

## Remerciements

Je voudrais avant tout, remercier ma directrice de recherche, D<sup>re</sup> Mona Nemer, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Merci pour la formation scientifique et professionnelle que tu m'as offert, pour ton grand support ainsi que ta compréhension humaine.

J'aimerais également remercier D<sup>re</sup> Hiba Komati pour son appui inconditionnel et son aide inestimable durant ces dernières années. Hiba, je suis heureux d'avoir développé cette sincère et précieuse complicité avec toi et je te suis très reconnaissant d'avoir participé à l'initiation, l'évolution, de même que la terminaison de ce projet. Aussi, il m'apparaît primordial de remercier mes collègues du laboratoire pour leur aide, leurs utiles conseils et leur contribution à la qualité de vie du laboratoire. Merci Nathalie Bouchard, Romain Georges, Anne Aries, Chantale Lefebvre, Abir Yamak, Lise Laroche, Derek Tardif, Martin Morin, Brigitte Laforêt, Mathieu Nadeau, Pierre Paradis, Wael Maharsy, Michel Roy, Dana Antakli, ainsi que tous les membres du laboratoire de D<sup>r</sup> Jacques Drouin. Un merci spécial pour les membres du laboratoire de D<sup>r</sup> Berthiaume pour leurs conseils statistiques judicieux.

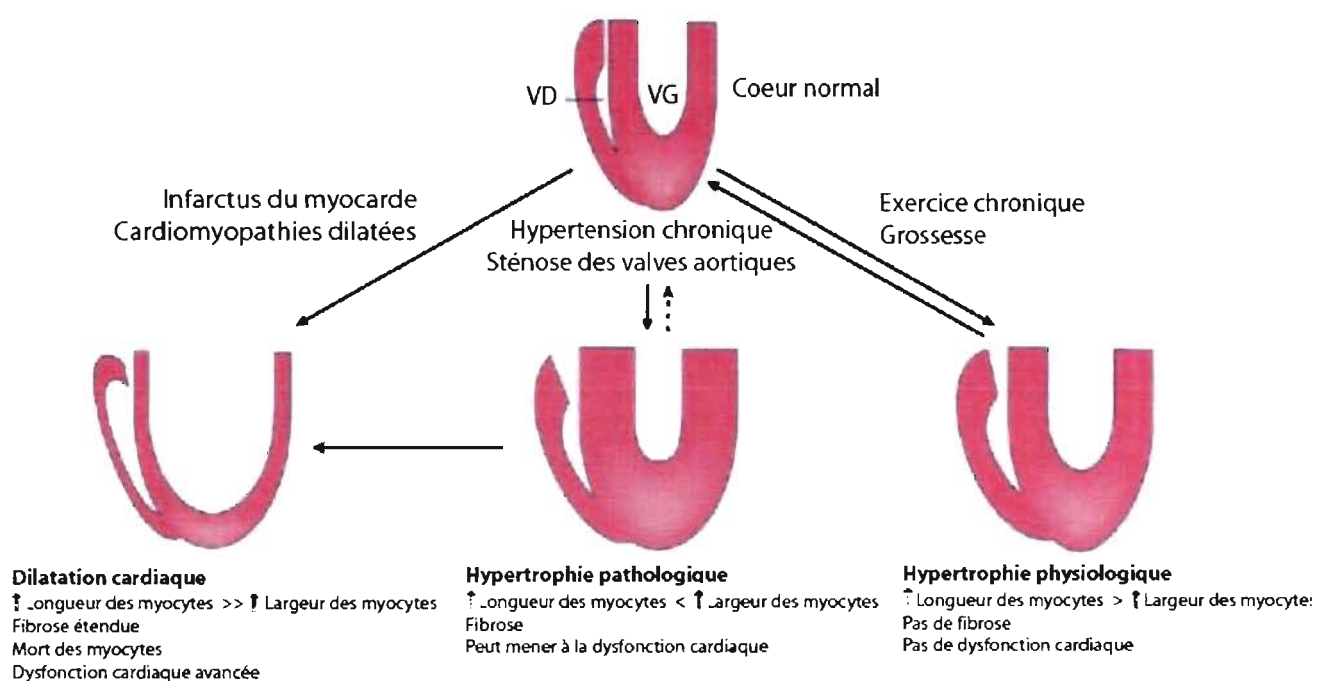
Finalement, un incommensurable merci à mes amis et ma famille qui ont toujours su me supporter moralement dans la réalisation de mes projets. Daniel, Beldora, Myriam, Véronique, Évelyne et Gabriel, je vous remercie tous sincèrement de n'avoir jamais cessé de croire en moi et d'être présents dans ma vie.

# CHAPITRE I. INTRODUCTION

Chez les mammifères, le myocarde subit une croissance hypertrophique lors de la maturation postnatale, caractérisée par une augmentation de la taille, mais non le nombre des cellules myocytaires (Lorell et Carabello 2000). Cette hypertrophie est la réponse normale des cardiomyocytes différenciés aux stimuli de croissance, qu'ils soient de nature physique/mécanique ou hormonale. Ce genre de croissance trophique est également observé en réponse à l'exercice ou la grossesse et ne représente pas un phénomène nuisible pour le coeur. En effet, un conditionnement aérobique extensif lors de l'exercice soutenu induit un état de croissance physiologique au niveau du ventricule gauche (McMullen et Jennings, 2007). Les hypertrophies développementale et physiologique sont caractérisées par une croissance du septum et de la paroi ventriculaire qui concorde avec l'augmentation des dimensions de la chambre, amenant comme résultat une hypertrophie de type excentrique (figure 1), bénéfique pour la fonction cardiovasculaire (Heineke et Molkenin, 2006).

D'autre part, des stimuli associés au stress ou à certaines maladies cardiovasculaires induisent initialement une hypertrophie adaptative, laquelle se traduit par l'augmentation de la taille des myocytes, qui est un moyen d'augmenter la capacité du cœur à pomper le sang et de diminuer la tension au niveau de la paroi ventriculaire (Gupta et al. 2007). On parle alors d'une hypertrophie pathologique (ou compensatoire) qui est associée au remodelage ventriculaire sous l'influence d'altérations de la matrice extracellulaire, affectant la fonction cardiaque et l'utilisation énergétique (Lorell et Carabello 2000). En effet, on assiste à l'accroissement de l'épaisseur des parois ventriculaires sans toutefois augmenter les

dimensions de la chambre, entraînant ainsi une hypertrophie de type concentrique (figure 1 ; Heineke et Molkentin 2006). Les effets immédiats de l'hypertrophie peuvent paraître bénéfiques à court terme, mais ils mènent ultimement à l'augmentation de l'apoptose des cardiomyocytes et à l'apparition de nécrose tissulaire, prédisposant ainsi les individus à la défaillance cardiaque, aux arythmies et à la mort soudaine (Clerk et al. 2007 ; Heineke et Molkentin, 2006).



### Figure 1. Les divers types d'hypertrophie cardiaque

Illustration des voies d'induction du remodelage ventriculaire montrant l'aspect des parois ventriculaires du cœur normal comparativement à l'hypertrophie physiologique et pathologique, ainsi qu'à la dilatation cardiaque.

VD, ventricule droit; VG, ventricule gauche  
(image modifiée de Heineke et Molkentin, 2006)



## **1.1 Réponse génétique du cœur à la surcharge cardiaque**

Les maladies cardiovasculaires demeurent la principale cause de mortalité dans les pays occidentaux et l'insuffisance cardiaque est souvent la cause directe du décès. Cette dernière se définit comme étant la défaillance du cœur à pomper adéquatement le sang en réponse à la demande systémique (Heineke et Molkentin, 2006). L'insuffisance cardiaque peut être induite par différentes maladies incluant : l'hypertension artérielle, l'infarctus du myocarde, l'ischémie associée aux maladies coronariennes, l'insuffisance et la sténose valvulaire, les myocardites, les malformations congénitales, les cardiomyopathies hypertrophiques familiales, les cardiomyopathies hypertrophiques dilatées et les cardiomyopathies diabétiques (Lips et al. 2003; Gupta et al, 2007). Après l'infarctus du myocarde (IM), on assiste au remodelage cardiovasculaire, duquel fait partie l'hypertrophie cardiaque pathologique. L'ampleur du remodelage est proportionnelle à la masse du myocarde ayant subi un infarctus, à la perméabilité de l'artère reliée à l'IM et aux conditions de chargement du ventricule (Pfeffer et al. 1991). La réponse suite à l'IM peut être divisée en remodelage précoce (premiers 3 jours) et tardif (> 3 jours). La phase précoce se produit principalement en périphérie et à l'intérieur des zones affectées par l'infarctus. Le remodelage tardif, lui, englobe les changements de la géométrie et de la taille du ventricule gauche entier (Tiyyagura et Pinney 2006).

Il a été mentionné précédemment que la cardiomyopathie dilatée (CMD) est répertoriée comme une source majeure de l'insuffisance cardiaque et elle est considérée

comme une des causes principales de la mort reliée aux maladies cardiaques (Lips et al. 2003 ; Karkkainen et Peuhkurinen, 2007). La CMD est un désordre myocardique caractérisé par la dilatation du ventricule gauche ou des deux ventricules et par une fonction systolique altérée (Richardson et al. 1995). Elle est reconnue pour être la cardiomyopathie la plus commune représentant environ 60% de toutes les cardiomyopathies (Karkkainen et Peuhkurinen, 2007). Jusqu'à ce jour, plusieurs gènes ont été associés à des mutations reliées aux CMD, entraînant subséquemment l'altération de la structure des protéines. Les mutations associées à cette maladie ont été détectées dans les gènes codant pour le sarcomère, le cytosquelette et les protéines nucléaires, aussi bien que pour les protéines impliquées dans la régulation du métabolisme du calcium. Malgré cela, ces mutations n'expliquent qu'une minorité de l'étiologie des cardiomyopathies dilatées (Muntoni et al. 1993 ; Bienengraeber et al. 2004). En effet, les mécanismes par lesquels certaines mutations entraînent l'insuffisance cardiaque clinique demeurent complexes et ne sont pas encore totalement résolus. Une meilleure compréhension de l'arrière-fond génétique des patients et des mécanismes causant la maladie pourrait aider à cibler des traitements qui permettraient d'améliorer la fonction cardiaque des patients affectés.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la réponse hypertrophique des myocytes cardiaques ont fait l'objet d'une multitude de recherches durant les dernières décennies. Le développement de l'hypertrophie peut être induit dans le cœur adulte, en réponse à différents stimuli mécaniques, hémodynamiques, neurohormonaux et pathologiques (Hunter et Chien 1999). Les voies signalétiques

impliquées dans l'hypertrophie cardiaque sont très complexes et mettent en action les cascades de transduction de signal des protéines kinases, qui activent ultimement les facteurs nucléaires permettant l'expression des gènes reliés à l'hypertrophie cardiaque. Une stimulation de l'hypertrophie physiologique démontre l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la structure cellulaire, la signalisation intracellulaire, la synthèse protéique et le métabolisme (Friddle et al. 2000 ; Kong et al. 2005). Les stimuli de nature pathologique, eux, sont plutôt associés à l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation, la cicatrisation, les protéines structurales, le métabolisme et la survie (Kong et al. 2005).

Les études dans les modèles animaux ont permis de révéler d'importants médiateurs de l'hypertrophie cardiaque comme les protéines kinases mitogéniques (MAPK), les kinases de la voie phosphatidylinositol-3(PI3K)/AKT ou la protéine kinase C (PKC) qui sont tous médiateurs des voies de signalisation cellulaires hypertrophiques (Heineke et Molkenin, 2006). La régulation de la transcription génétique découlant de ces voies, nécessite une machinerie transcriptionnelle complexe mettant en jeu différents facteurs de transcription tels que GATA4, SRF (*serum response factor*), MEF2, PEX1 ou NFATc (Molkenin et al. 1998 ; Charron et al. 1999 ; Morin et al. 2000 ; Morin et al. 2001 ; Debrus et al. 2005). Plusieurs des effecteurs signalétiques impliqués dans la régulation de l'hypertrophie cardiaque ont été identifiés dans les cardiomyocytes de rats néonataux, un modèle qui a été grandement utile pour analyser les mécanismes de croissance cardiaque et l'expression des gènes du cœur. L'hypertrophie des myocytes cardiaques est entre autres associée à la ré-

expression de gènes qui sont exprimés durant le développement embryonnaire, *e.g.* l'actine squelettique ( $\alpha$ -SkA), les chaînes lourdes de myosine- $\alpha$ / $\beta$  ( $\alpha$ / $\beta$ -MHC) et les peptides natriurétiques (Clerk et al. 2007). Ces derniers, principalement l'ANP et BNP, sont grandement sécrétés par le cœur, et leur découverte a permis de mieux caractériser les mécanismes responsables des étapes initiales de la reprogrammation génétique associée à l'hypertrophie cardiaque (Temsah et Nemer 2005).

## **1.2 Peptides natriurétiques**

Les peptides natriurétiques sont des hormones endogènes qui sont relâchées par le cœur en réponse, entre autres, à l'étirement et la surcharge du myocarde et sont reconnus pour leurs effets vasodilatateurs sur le système cardiovasculaire (Lee et Burnett, 2007). Ils permettent la natriurèse, un processus d'excrétion des liquides s'apparentant grandement à la diurèse, impliquant l'élimination massive des ions sodiques (McDonough et al. 2003). Les peptides natriurétiques possèdent la capacité d'induire ce phénomène par l'inhibition directe de l'absorption du sodium dans le conduit collectif rénal. L'effet natriurétique provient également de l'augmentation de la filtration glomérulaire au niveau des reins, ainsi que de l'inhibition de la production et la sécrétion d'aldostérone. Par ailleurs, les peptides natriurétiques peuvent contrecarrer le système rénine-angiotensine-aldostérone (Chen et Burnett, 2000 ; Woods, 2004) et l'on observe leur augmentation lors d'hypertension sévère, d'un arrêt cardiaque congestif ou d'une défaillance rénale chronique (Cho et al. 1999; Kjaer et Hesse, 2001).

### 1.2.1 Familles et récepteurs

Jusqu'à maintenant, trois peptides natriurétiques ont été caractérisés chez les mammifères : l'ANP, le BNP et le CNP (Levin et al. 1998). Les peptides natriurétiques partagent un motif structural commun comportant une boucle de 17 acides aminés, formée par un pont disulfure entre deux résidus cystéines (Yandle, 1994). Le peptide natriurétique auriculaire (ANP) dérive d'un précurseur nommé préproANP qui contient 149-152 acides aminés dépendamment de l'espèce. Chaque polypeptide préproANP est acheminé, suite à différents clivages, aux granules sécrétoires auriculaires, principal site d'entreposage du proANP<sub>1-126</sub>. L'hormone est finalement fractionnée en fragments aminoterminaux duquel est relâché l'ANP<sub>1-28</sub>, le peptide carboxy-terminal biologiquement actif (Thibault et al. 1985). Les peptides BNP (*brain natriuretic peptide*) et CNP (*C-type natriuretic peptide*) ont été initialement isolés du cerveau de porc (Sudoh et al. 1988; Sudoh et al. 1990), mais il a été reporté que leur production se fait principalement au niveau des cellules cardiaques et endothéliales, respectivement (Minamino, al. 1988; Suga et al. 1992). Les ARNm de BNP et CNP sont également traduits en préproBNP et préproCNP, subissant aussi une série de clivages, qui mènent à la forme biologiquement active (Lee et Burnett, 2007).

Les effets biologiques des peptides natriurétiques sont médiés par des récepteurs membranaires. Trois sous-types de récepteurs ont été décrits : NPR<sub>A</sub>, NPR<sub>B</sub> et NPR<sub>C</sub> (Maack, 1992; Levin et al. 1998). Les récepteurs de type A et B sont couplés à la guanylyl-

cyclase et sont responsables de l'action biologique des peptides natriurétiques. L'ANP et le BNP possèdent une plus grande affinité pour le récepteur de type A, tandis que le CNP, pour le type B (Jamison et al. 1992). Le récepteur de type C, lui, peut lier les trois peptides natriurétiques et n'est pas couplé à la guanylyl-cyclase. Sa principale fonction serait de retirer les peptides natriurétiques de la circulation, travaillant conjointement avec les endopeptidases neutres (NEP) pour leur dégradation (Lee et Burnett, 2007).

### ***1.2.2 Régulation transcriptionnelle de l'ANP/BNP dans la croissance cardiaque***

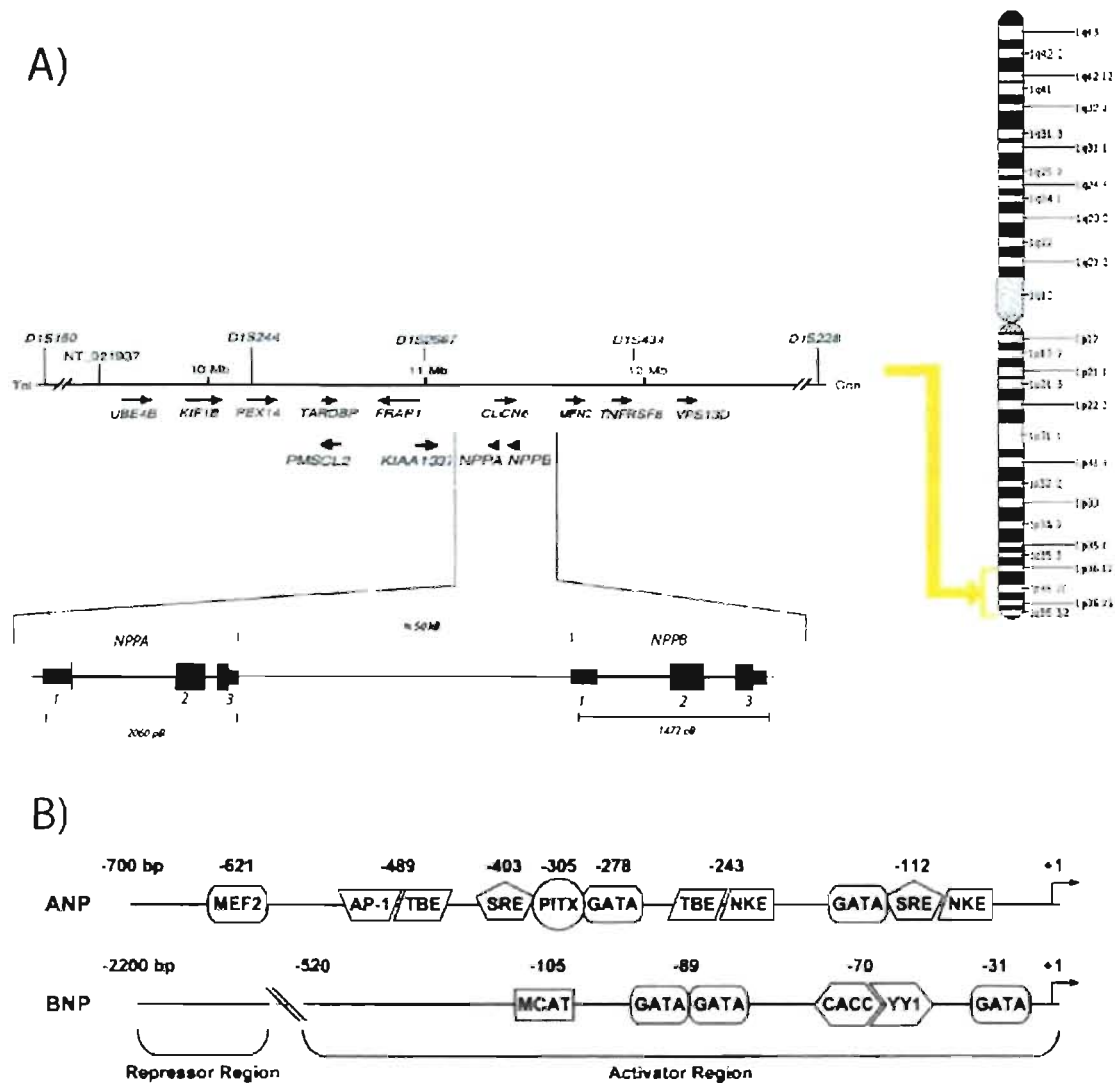
Dans le cœur adulte, l'ANP est principalement synthétisé dans les myocytes des oreillettes, mais on le retrouve aussi en petite quantité dans les myocytes ventriculaires, *i.e.* de 0,5 à 3 % de la quantité dans les oreillettes (Nemer et al. 1984). Chez les mammifères, l'expression de l'ANP dans les oreillettes augmente tout au long du développement embryonnaire et reste élevée durant le développement postnatal. Les myocytes ventriculaires, au contraire, contiennent des quantités substantielles d'ANP qui diminuent rapidement, immédiatement après la naissance. Le BNP, quant à lui, est exprimé au même niveau dans les oreillettes et les ventricules (Dagnino et al. 1991). À la suite d'une hypertrophie déclenchée par un stress mécanique ou neurohormonal, l'expression ventriculaire de l'ANP et le BNP augmente considérablement. Cette réponse compensatoire fait partie du mécanisme de contre-régulation par lequel les peptides exercent leur effet vasodilatateur. À la longue, les mécanismes de compensation induisent une hypertrophie de type pathologique marquée par l'augmentation de la synthèse des protéines et de la taille

des cardiomyocytes ainsi que par l'activation de plusieurs gènes précoces immédiats et fœtaux (Rosenkranz et al. 2002). L'expression de l'ANP et du BNP est donc un marqueur spécifique de la réponse hypertrophique (Knowlton et al. 1991). De plus, l'augmentation des facteurs natriurétiques pourrait avoir un effet bénéfique entre autres en inhibant la croissance des fibroblastes et l'hypertrophie des cardiomyocytes grâce à leurs effets antagonistes du système rénine-angiotensine-aldostérone (Cao et Gardner, 1995).

Il a été démontré que les peptides natriurétiques précurseurs de l'ANP et du BNP, NPPA et NPPB respectivement, sont situés sur le même chromosome chez la souris (chr4) et chez l'humain (chr1) (Huang et al. 1996 ; Tamura et al. 1996). En effet, on les retrouve tous deux sur la partie distale de l'appendice court du chromosome 1 (1p36) chez l'humain, à environ 50 Kpb l'un de l'autre (figure 2A ; Arden et al. 1995). La proximité des gènes des deux peptides natriurétiques cardiaques doit permettre, par des éléments régulateurs communs putatifs, d'activer la transcription des deux gènes. L'expression des gènes de l'ANP et du BNP est modulée par différents facteurs spatiaux, développementaux et hormonaux, principalement situés au niveau transcriptionnel. Les promoteurs de ces peptides ont été grandement utilisés comme modèles pour l'étude de la transcription spécifique au cœur. En effet, des analyses structurales et fonctionnelles de ces promoteurs ont révélé la présence d'éléments hautement conservés, agissant en *cis*, contenant des motifs permettant la liaison du facteur de transcription GATA4, un régulateur clé de l'activité transcriptionnelle liée au développement et à la croissance cardiaque (figure 2B ; Temsah et Nemer, 1995).

On retrouve deux sites GATA à -120 pb et -280 pb sur le promoteur de l'ANP et un site de faible affinité à -101 pb. Celui du BNP contient trois éléments de liaison GATA, dont un est situé à -30 pb et deux autres sites adjacents à -90 pb (Temsah et Nemer, 1995). Il a été trouvé que GATA4 possède un effet stimulateur sur les deux gènes, et, une diminution du niveau de la protéine GATA4 entraîne la réduction de la transcription de l'ANP et du BNP dans les cellules cardiaques, indiquant que les deux gènes sont des cibles directes de GATA4 (Charron et al. 1999). Bien qu'en général, l'ANP et le BNP répondent, tant au niveau transcriptionnel, traductionnel que sécrétoire, à une variété d'agonistes d'une manière très similaire, on observe que la régulation de ces peptides n'est pas toujours coordonnée. Lors d'un infarctus du myocarde aigu, une induction rapide du gène de BNP est notable lors des phases précoces, tandis que des changements mineurs sont détectables pour l'ANP (Handford et al. 1994). Toutefois, les peptides natriurétiques sont d'importants marqueurs de la réponse pathologique du cœur et leurs gènes font partie de l'éventail des gènes cibles activés par les effecteurs nucléaires reliés aux cascades intracellulaires de l'hypertrophie cardiaque.





**Figure 2. Loci des gènes de l'ANP/BNP chez l'humain et organisation structurale de leurs promoteurs**

**A.** Schématisation de la région chromosomique 1p36.2 contenant le locus de NPPA et de NPPB, illustrant leur organisation génomique. **B** Organisation structurale des promoteurs des gènes des peptides natriurétiques cardiaques ANP et BNP. Identifiés ci-haut, les éléments confirmés, agissant en *cis*, pour lesquels les facteurs apparentés, agissant en *trans*, ont été identifiés.

(Image modifiée de Temsah et Nemer, 2005)

### **1.3 Les voies de signalisation dans l'hypertrophie cardiaque**

L'hypertrophie cardiaque pathologique peut être induite par une variété de maladies comme l'hypertension ou autres désordres vasculaires, l'infarctus du myocarde ainsi que par des désordres valvulaires et endocriniens (Rosenkranz et al. 2002). Elle est initialement une réponse bénéfique qui normalise le stress des parois du cœur et permet le maintien de la fonction cardiaque, mais son prolongement mène généralement à l'insuffisance cardiaque et à la mort (Heineke et Molkentin, 2006). Il est donc important de comprendre les mécanismes précis des médiateurs de l'hypertrophie cardiaque. Le phénotype hypertrophique des cardiomyocytes est amorcé par des facteurs endocrines, autocrines et paracrines qui stimulent les récepteurs membranaires. Leur activation met en place des voies de signalisation cytoplasmiques qui régulent l'activité de facteurs de transcriptions contrôlant l'expression des gènes (Molkentin et Dorn II, 2001). Bien que plusieurs voies de transduction de signal impliquées dans l'hypertrophie aient été caractérisées, la complexité de leur interaction n'est pas encore assez bien élucidée pour permettre le développement d'approches préventives ou thérapeutiques précises (Zou et al. 2002). Plus particulièrement, les rôles des différentes cascades dans l'initiation de la réponse hypertrophique, du maintien de la réponse ou de la transition vers la défaillance cardiaque ne sont pas encore bien définis. De plus, il n'est pas clair encore, lesquelles des voies sont activées de manière primaire ou compensatoire, ainsi que leur impact sur les différents processus associés à l'hypertrophie.

### 1.3.1 Rôle des récepteurs adrénérgiques et autres hormones dans le cœur

Le système neurohormonal joue un rôle important et exerce une influence majeure sur l'homéostasie cardiovasculaire, incluant la fonction cardiaque et le contrôle de la pression artérielle (Piano et al. 1998). La réponse à l'activation du système nerveux sympathique met en action plusieurs effecteurs telles les catécholamines, la norépinéphrine (NE), ainsi que l'épinéphrine et est régulée par différents sous-types de récepteurs adrénérgiques, appartenant aux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Esler et al. 1997; Salazar et al. 2007). Les récepteurs adrénérgiques  $\alpha_{1/2}$  et  $\beta_{1/2/3}$  possèdent différents effets physiologiques qui engendrent des voies de signalisation distinctes au niveau cellulaire (Haddock et Malbon, 1993 ; Drazner et al. 1997). Dans les myocytes cardiaques, on retrouve majoritairement les récepteurs  $\alpha_1$  (A, B et D) et  $\beta$  (1, 2 et 3) (Stewart et al. 1994 ; Sucharov, 2007). Les récepteurs  $\beta$ , eux, sont principalement responsables de la pulsation et de la contractilité du cœur via l'activation de l'adénylate cyclase (AC), des protéines kinases A (PKA) et des MAPK (Keys et Koch, 2004). Toutefois, la stimulation  $\alpha_1$ -adrénérgique peut également stimuler la contractilité du myocarde, mais elle est plus souvent associée à la synthèse protéique et à la croissance cellulaire via les voies Ras (ERK, *extracellular signal regulated kinase*) et PI3K (Ardati et Nemer, 1993 ; Keys et Koch, 2004). Autant dans les modèles *in vivo* qu'*in vitro*, une stimulation par différents agonistes  $\alpha_1$  et  $\beta$  mène à l'hypertrophie cardiaque, activant la transcription de gènes comme l'ANP et le BNP (Hanford et al. 1994; Zimmer et al. 1997; Rapacciuolo et al. 2001).

Les altérations dans la signalisation adrénérique sont responsables de plusieurs maladies cardiaques. Celles qui prennent place dans le système relié aux récepteurs  $\beta$ -adrénériques lors de la défaillance cardiaque sont les mieux caractérisées (Sucahrov, 2007). La surexpression spécifique au cœur, sous l'influence du promoteur  $\alpha$ -MHC, des récepteurs  $\beta_2$ -adrénériques dans les modèles *in vivo* améliore la fonction cardiaque en l'absence d'agoniste, tel que l'isoprotérénol, comparativement aux souris du type sauvage. Ceci se manifeste par une meilleure contractilité et pulsation cardiaque dès la naissance, engendrant ainsi un minimum de pathologies lors de la croissance (Milano et al. 1994a). Par contre, la surexpression des récepteurs  $\beta_1$ -adrénériques, sous l'influence du promoteur  $\alpha$ -MHC dans des souris transgéniques, montre un phénotype de cardiomyopathie dilatée et d'insuffisance cardiaque avec un remodelage ventriculaire significatif et un état de fibrose avancée, même chez les jeunes souris (Engelhardt et al. 1999). Des souris *knock-out* (KO) des récepteurs  $\beta_1$ - et/ou  $\beta_2$ -adrénérique montrent une atténuation significative des fonctions physiologiques basales comme la pression sanguine, la pulsation cardiaque et le taux métabolique (Rohrer et al. 1999).

Au niveau des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénériques, plusieurs études avec des souris transgéniques ont également été effectuées. La surexpression d'une forme constitutivement active du récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénérique au niveau du cœur chez la souris entraîne une augmentation de 62% de la taille moyenne des myocytes ventriculaires. De plus, on retrouve chez ces souris une augmentation de l'expression de l'ANP ventriculaire, de la signalisation associée à la  $G\alpha_q$ /phospholipase C (PLC), ainsi que des niveaux basaux du

diacylglycérol et de l'inositol phosphate (Milano et al. 1994b ; Harisson et al. 1998). Chez la souris, la délétion des récepteurs  $\alpha_{1A}$ - et  $\alpha_{1D}$ -adrénergiques entraîne principalement une diminution de la pression sanguine au repos (Rokosh et Simpson, 2002 ; Tanoue et al. 2002). Pour celles qui n'expriment pas le récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénergique, aucune variation de la pression sanguine au repos n'a été observée. Toutefois, la réponse de la pression sanguine et de la contraction aortique face à la phényléphrine (PE), un agoniste  $\alpha_1$ -adrénergique, est significativement diminuée par rapport aux souris du type sauvage (Cavalli et al. 1997).

Outre la stimulation adrénérique, il existe d'autres peptides importants pour la fonction cardiaque qui possèdent leurs propres récepteurs. L'endothéline-1 (ET-1) participe, entre autres, à la régulation de l'homéostasie cardiovasculaire en tant que facteur humoral local. Principalement sécrété par l'endothélium vasculaire, l'ET-1 possède un rôle physiologique dans la fonction contractile en exerçant un effet inotropique positif sur le cœur (Brunner et al. 2006). De plus, l'ET-1 est relié à la croissance en induisant l'hypertrophie des cardiomyocytes via l'activation de la PLC, la protéine kinase C et les protéines ERK-1 et -2 (Sugden, 2003). Plusieurs études décrivent les actions biologiques de l'ET-1 sous une perspective principalement physiopathologique. Néanmoins, la formation de l'ET-1 est activée transitoirement lorsque le cœur s'adapte à l'augmentation de la postcharge pathologique, apparaissant ainsi comme une réponse adaptative utile pour la fonction cardiaque (Brunner et al. 2006).

Le système rénine-angiotensine-aldostérone et son peptide effecteur primaire, l'angiotensine II (Ang II), sont également associés aux mécanismes compensatoires répondant à l'augmentation de la charge hémodynamique (Lijnen et Petrov, 1999). En effet, l'Ang II, principalement synthétisée dans le myocarde, stimule la réponse hypertrophique des myocytes ainsi que la prolifération des fibroblastes et plusieurs études associent son action à l'insuffisance cardiaque, de même que l'infarctus du myocarde (Dostal, 2000). Les actions de l'Ang II incluent la vasoconstriction, le remodelage cardiaque, la fibrose, la génération de l'endothéline et l'activation sympathique (Unger et Li, 2004). Des médicaments ont été élaborés pour bloquer la formation de l'Ang II par l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'Ang II et d'autres pour empêcher la liaison de l'Ang II aux récepteurs Ang II de type-1 (AT<sub>1</sub>R) (Zhu et al. 2003). Dans les modèles *in vivo* et *in vitro*, on observe entre autres une augmentation de l'activité des protéines kinases ERK et p38 dans les cardiomyocytes stimulés par l'Ang II (Zhu et al. 2003), faisant de ce peptide un agoniste d'intérêt pour l'étude des voies intracellulaires signalétiques reliées à l'hypertrophie cardiaque.

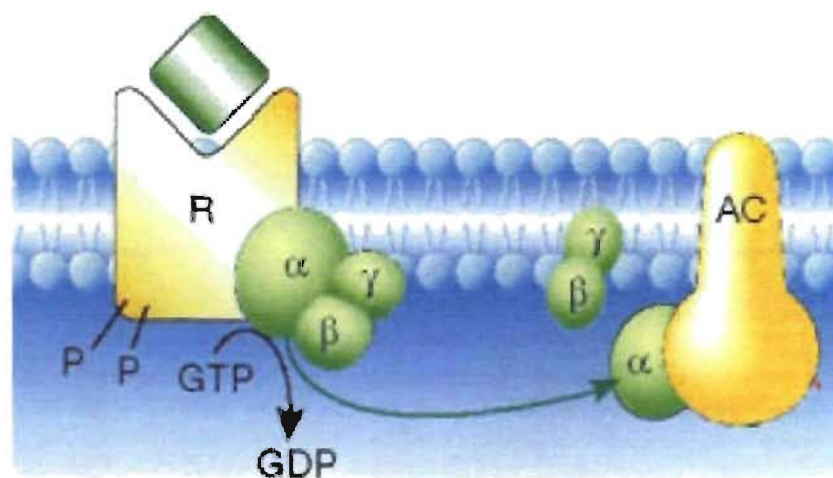
### 1.3.2 Signalisation couplée aux récepteurs des protéines G

À la base, les cascades signalétiques intracellulaires sont médiées par des récepteurs membranaires qui permettent l'activation de différentes voies métaboliques. En réponse à la liaison d'un agoniste à un certain type de récepteur transmembranaire, associé à des protéines G hétérodimériques, on assiste à la transmission de signaux activateurs ou inhibiteurs des voies intracellulaires. Ce type de récepteur fait partie de la plus grande famille de récepteurs membranaires cellulaires, soit les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Gether, 2000). Les protéines G possèdent la capacité de lier le *guanosine 5'-triphosphate* (GTP), une coenzyme de transfert de groupement phosphate, essentielle pour l'activation des voies de signalisation et plusieurs mécanismes cellulaires (Palczewski, 1997). Les récepteurs couplés aux protéines G sont constitués d'une longue chaîne d'acides aminés avec un domaine N-terminal extracellulaire, sept domaines transmembranaires et un domaine C-terminal intracellulaire (Gether, 2000).

#### 1.3.2.1 Protéines G et signalisation intracellulaire

Au niveau du myocarde, on reconnaît quatre sous-classes de protéines G qui jouent un rôle déterminant :  $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha_{12/13}}$ ,  $G_{\alpha i}$  et  $G_{\alpha q}$ . La fixation d'un agoniste à son récepteur active ainsi les événements intracellulaires par la dissociation de ces protéines G trimériques ( $\alpha\beta\gamma$ ) en sous-unités  $G_{\alpha}$  et  $G_{\beta\gamma}$  grâce au transfert de GTP sur la sous-unité  $G_{\alpha}$  (figure 3).

Dissociées, ces sous-unités modulent plusieurs effecteurs en aval comme l'AC ( $G_{\alpha s}$  et  $G_{\alpha i}$ ) et certaines isoformes de la phospholipase C ( $G_{\alpha q}$ ) (Neves et al. 2002). La sous-unité  $G_{\beta\gamma}$  possède aussi une fonction importante dans la communication du signal dans certaines voies telle la capacité d'activation des phosphatidylinositol-3 kinases (PI3K), des MAPK via la petite protéine G Ras et Rho, ainsi que d'autres seconds messagers impliqués dans la fonction cardiaque (Jones et al. 2004). Les protéines G possèdent un rôle direct dans l'induction de la réponse hypertrophique des cardiomyocytes ventriculaires.



**Figure 3. Récepteur couplé aux protéines G.**

Le récepteur transmembranaire (R) est couplé aux trois sous-unités de la protéine G ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ). Lors du transfert d'un groupement phosphate sur la sous-unité  $\alpha$ , par la conversion du GTP en GDP, on assiste à la dissociation du complexe du récepteur et des sous-unités. Dans ce schéma, la sous-unité  $\alpha$  (s ou i) interagit ensuite avec l'adénylate cyclase (AC) et la sous-unité  $\beta\gamma$  agit au niveau de la membrane pour l'activation d'autres kinases (e.g. voie PI3K).  
(image modifiée de Firestein, 2001)



La voie des protéines  $G\alpha_s$  est sans contredit la plus étudiée de toutes les protéines G et ce, depuis environ 40 ans. Les  $G\alpha_s$ , exprimées de manière ubiquitaire, permettent la transmission du signal en réponse à l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. La sous-unité  $G\alpha_s$  se lie au GTP et stimule l'AC (figure 3), entraînant une augmentation de l'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPC) et l'activation de PKA. Il a été trouvé que le second messager AMPC entraînerait entre autres, l'activation de la petite protéine G Rap qui active à son tour le module de signalisation des MAPK, une famille de protéines kinases d'une importance majeure pour la croissance cellulaire et l'hypertrophie cardiaque (Salazar et al. 2007).

On retrouve aussi les  $G\alpha_{12/13}$  s'apparentant grandement aux  $G\alpha_s$ , mais qui sont encore très peu caractérisées (Neves et al. 2002). Elles activeraient la petite protéine G Rho, responsable de plusieurs réponses cellulaires. Entre autres, elles auraient un rôle dans la réorganisation cytosquelettique, la croissance cellulaire et l'apoptose (Kurose, 2003). Des études suggèrent également la contribution de  $G\alpha_{12/13}$  dans l'hypertrophie cardiaque induite par la voie  $\alpha_1$ -adrénergique, en relation avec les *c-Jun-NH<sub>2</sub> terminal kinase* (JNK), une MAPK effectrice de la réponse hypertrophique (Arai et al. 2003).

Les  $G\alpha_i$ , elles, sont couplées aux récepteurs cholinergiques ainsi qu'aux  $\alpha_2$ -adrénergiques et agissent de façon contraire aux  $G\alpha_s$ . En effet, l'activation de  $G\alpha_i$  inhibe l'activité de AC myocardique, entraînant une réduction de la production de l'AMPC. Ceci mène à l'inhibition de la PKA, ce qui diminue le transport calcique membranaire et

empêche la phosphorylation de plusieurs facteurs de transcription servant d'effecteurs nucléaires (Wehrens et Marks, 2004). Aussi, la régulation muscarinique cholinergique de l'activité stimulatrice du cœur se produit par le couplage des récepteurs  $M_2$ -muscariniques avec  $G\alpha_i$ , relâchant l'unité  $G\beta\gamma$  qui active les canaux potassiques (Neves et al. 2002).

Les  $G\alpha_q$  sont étroitement liées aux récepteurs  $AT_1R$ , ET-1 et  $\alpha$ -adrénergiques (Neer, 1995). Elles sont médiatrices de l'activation des isoformes  $\beta$  de la PLC qui permettent l'hydrolyse du phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate ( $PIP_2$ ), responsable de la formation de deux seconds messagers importants dans les cascades de signalisation (Neves et al. 2002). D'une part, on obtient l'inositol triphosphate ( $IP_3$ ) qui déclenche le relâchement du calcium intracellulaire au niveau du réticulum endoplasmique et d'autre part, le diacylglycérol (DAG). Ce dernier, conjointement avec le calcium relâché, permet l'activation de la PKC qui phosphoryle plusieurs effecteurs, entre autres impliqués dans l'hypertrophie cardiaque et la contractilité myocardique (Neves et al. 2002; Wang, 2006). La surexpression de  $G\alpha_q$  sous l'influence du promoteur  $\alpha$ -MHC, chez la souris, induit effectivement une hypertrophie cardiaque compensatrice évoluant vers l'insuffisance ventriculaire gauche (D'Angelo et al. 1997). Dans un même ordre d'idée, des souris transgéniques exprimant un récepteur  $\alpha$ -adrénergique couplé à une forme constitutivement active de  $G\alpha_q$  développent une hypertrophie spontanée avec l'expression de ses marqueurs moléculaires (Mende et al. 1998).

### 1.3.2.2 *Petites protéines G*

Les petites protéines G contribuent aussi au lien entre les récepteurs de surface et les cascades de kinases qui régulent une variété de processus cellulaires. Des études ont répertorié cinq différentes sous-familles : Ras, Rho, *ADP ribosylation factor* (ARF), Rab et Ran (Bhattacharya et al. 2004). Semblablement aux protéines G décrites précédemment, les petites protéines G sont actives lorsqu'elles lient le GTP et retournent à leur état inactif en présence de *guanosine 5'-diphosphate* (GDP). Jusqu'à maintenant, il a été trouvé que les sous-familles Ras et Rho seraient impliquées dans la signalisation des myocytes cardiaques menant à l'hypertrophie (Sugden et Clerk, 2000 ; Charron et al. 2001 ; Vahebi et Solaro 2005).

#### 1.3.2.2.1 *Les petites protéines G Ras*

Dans les cardiomyocytes, l'activation des protéines Ras peut être induite par plusieurs agonistes hypertrophiques comme la PE, l'ET-1 et les esters de phorbol (Sugden et Clerk 2000). Ceci permet l'activation de Raf-1, PI3K et Ral. *GDP-dissociation stimulator* (Ral GDS). Il a été montré que Ras active principalement l'expression de ERK, mais il a été rapporté qu'elle activerait aussi les MAPK JNK et p38 indirectement à travers Rac/Cdc42 dans les cardiomyocytes (Sugden et Clerk 2000 ; Proud, 2004). La transfection d'une forme constitutivement active de Ras dans des myocytes cardiaques induit un phénotype hypertrophique, incluant l'expression des gènes *c-fos*,  $\alpha$ -SkA et ANP, ainsi que

l'augmentation de l'organisation sarcomérique (Thorburn et al. 1993 ; Fuller et al. 1998). Des études *in vivo* ont aussi démontré qu'une activation cardiospécifique de la forme active de Ras chez la souris mène au développement de l'hypertrophie (Hunter et al. 1995).

#### 1.3.2.2.2 Les petites protéines G Rho

Les membres de la famille des petites protéines G Rho sont Rac, RhoA et Cdc42 (Brown et al. 2006). Ces trois membres ont une incidence considérable dans la réponse hypertrophique, induisant des changements morphologiques du cœur et de gènes exprimés (Clerk et Sugden, 2000 ; Nagai et al. 2003). Rac1 stimule la cascade ERK, soit en favorisant la phosphorylation de c-Raf, soit en facilitant l'activation de MEK1/2 par l'augmentation de l'association MEK1/2 avec c-Raf. Rac1 serait également impliqué dans l'activation de la voie JNK, mais pour la MAPK p38, aucun effet n'a été observé (Clerk et al. 2001). La protéine RhoA possède un rôle important pour le cœur puisque son inhibition bloque le développement cardiaque (Charron et al. 2001). De plus, l'importance de RhoA dans l'hypertrophie des myocytes est supportée par plusieurs études démontrant les effets de la forme active ou de son dominant négatif sur la régulation de l'expression des gènes hypertrophiques (Sah et al. 1996 ; Hoshijima et al. 1998 ; Aikawa et al. 1999 ; Charron et al. 2001). Par ailleurs, l'expression *in vivo* d'une forme constitutivement active de RhoA n'est pas suffisante pour induire l'hypertrophie, mais elle permet d'observer l'apparition d'un élargissement auriculaire associé à la diminution de la fréquence cardiaque, ainsi qu'à la dysfonction nodale sino et auriculo-ventriculaire (Sah et al. 1999). Toutefois, les effets de

RhoA sur les aspects morphologiques de l'hypertrophie sont longtemps restés incertains et contradictoires (Thorburn et al. 1997 ; Hoshijima et al. 1998), mais il a été trouvé que la surexpression adénovirale de RhoA induit une réorganisation sarcomérique dans les cardiomyocytes (Charron et al. 2001).

## **1.4 Protéines kinases impliquées dans l'hypertrophie**

L'activation de récepteurs couplés aux protéines G initie les cascades de signalisation intracellulaire responsable de la réponse génétique de nombreux processus physiologiques. La stimulation de ces molécules signalétiques active également une variété de kinases et de phosphatases responsables de la phosphorylation de plusieurs molécules effectrices, incluant les facteurs transcriptionnels médiateurs des changements de l'expression génique (Vahebi et Solaro, 2005). Les protéines kinases jouent un rôle critique dans les nombreuses voies signalétiques menant au développement de l'hypertrophie cardiaque, qu'elle soit de nature pathologique ou physiologique. Il est ainsi très important, mais non moins complexe, de définir et de distinguer les voies impliquées dans les différents types d'hypertrophie cardiaque, afin de bien cibler les effecteurs clés pour le développement de nouvelles approches pharmaceutiques ou de thérapie génique (Dorn II et Force, 2006).

### **1.4.1 Les phosphoinositide 3-kinases (PI3K)**

Les PI3K forment une famille de kinases lipidiques associées à une variété de fonctions physiologiques, comme la prolifération, la croissance et la survie cellulaire ainsi que la réorganisation cytosquelettique et le trafic membranaire (Martin, 1998). Les PI3K sont divisées en trois classes (I, II et III) selon leur structure et leur spécificité de substrats

(Vanhaesebroeck et al. 2001). La classe I est la plus étudiée des trois et serait la seule classe exprimée dans les cellules cardiaques. Les PI3K de classe I sont des protéines hétérodimériques consistant en une sous-unité régulatrice et une autre catalytique (p110), regroupant les sous-classes I<sub>A</sub> et I<sub>B</sub> (Naga Prasad et al. 2003). Les PI3K de classe I<sub>A</sub> (sous-unités catalytiques p110 - $\alpha$ , - $\beta$  et - $\delta$ ) sont associées à la sous-unité régulatrice p85 et permettent le signal par les récepteurs tyrosine kinases (RTKs) qui sont reliés aux facteurs de croissance (Vanhaesebroeck et al. 2001). Les PI3K de classe I<sub>B</sub> (sous-unité catalytique p110 $\gamma$ ), elles, sont associées à la sous-unité adaptatrice p101 et sont activées par les sous-unités  $\beta\gamma$  des protéines G (Stoyanov et al. 1995). Les PI3K phosphorylent le phosphatidylinositol en position 3, permettant la conversion du phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) en phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP<sub>3</sub>), principal produit physiologique de la réaction catalytique (Proud, 2004). Le PIP<sub>3</sub> est responsable entre autres de l'activation en aval de deux autres protéines kinases primordiales dans l'hypertrophie cardiaque, AKT (ou PKB) et les kinases phosphatidylinositol-dépendantes (PDK), qui sont activées par phosphorylation en réponse aux agents qui stimulent PI3K (Scheid et Woodgett, 2001). La croissance cellulaire et l'apoptose sont deux processus importants qui sont régulés par les PI3K et ses effecteurs immédiats en aval. L'expression constitutive d'une forme active de la sous-unité p110 $\alpha$  de la PI3K dans les tissus cardiaques entraîne l'augmentation de la taille du cœur chez la souris, tandis que l'expression du dominant négatif p110 $\alpha$  réduit significativement la taille du cœur (Shioi et al. 2000). D'autre part, des études proposent que p110 $\gamma$ PI3K jouerait un rôle de pivot dans la transition de l'hypertrophie vers la défaillance cardiaque (Esposito et al. 2002). La sous-unité catalytique

p110 $\gamma$  aurait aussi un rôle critique quant à la régulation de la contractilité cardiaque en régulant négativement l'activité de l'AC et la phosphorylation de la phospholipase B (Crackower et al. 2002).

#### **1.4.2 Les protéines kinases AKT (ou protéines kinases B-PKB)**

La famille des sérine-thréonine kinases AKT (PKB) régule la croissance, la prolifération, la survie et le métabolisme cellulaire (Muslin et DeBosch, 2006). Il existe trois différentes formes de la protéine AKT (1, 2 et 3 ou PKB- $\alpha$ , - $\beta$  et - $\gamma$ ) qui partagent toutes une structure commune consistant en un domaine N-terminal régulateur homologue à la pleckstrine (PH) et un domaine C-terminal requis pour l'induction et la maintenance de son activité kinase (Franke et al. 2003). Suite à l'induction de PI3K, AKT est recruté à la membrane plasmique grâce au domaine PH, puis est activé par phosphorylation par PDK (Scheid et Woodgett, 2001). La protéine AKT joue un rôle important dans l'homéostasie des cardiomyocytes et est activée en amont, via les PI3K $\alpha$ , par divers agonistes tels que le facteur de croissance IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*), l'insuline, diverses hormones de croissance et par stimulation  $\beta$ -adrénergique (Latronico et al. 2004 ; Dorn II et Force, 2005). Plusieurs données suggèrent que la signalisation induite par PI3K/AKT/PDK engendrerait une réponse hypertrophique physiologique (McMullen et al. 2003) jouant aussi un rôle critique pour la régulation de la croissance normale du cœur (Mora et al. 2003). De manière intéressante, la voie hypertrophique AKT-dépendante est distincte de celle activée par les MAPK (Latronico et al. 2004) et l'expression d'AKT conférerait une protection contre la dysfonction cardiaque et la mort cellulaire induite par l'ischémie (Matsui et al. 2001; Matsui



et al. 2002; Shioi et al. 2002). Parmi les effecteurs en aval d'AKT, on retrouve la glycogène-synthase-kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) et la kinase p70<sup>S6K</sup>, une kinase impliquée dans l'initiation de la traduction des ARNm, via la phosphorylation des sous-unités ribosomales. L'activation d'AKT inhibe l'activité répressive de GSK-3 $\beta$  sur différentes protéines impliquées dans l'activation transcriptionnelle de l'hypertrophie cardiaque tels que GATA4 et NFATc (Hardt et Sadoshima, 2002 ; Dorn II et Force, 2005). Des études sur des cardiomyocytes adultes subissant une stimulation  $\beta$ -adrénergique ont démontré que la kinase p70<sup>S6K</sup> une protéine effectrice de l'hypertrophie AKT-dépendante, principalement au niveau de la synthèse protéique via la protéine mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (Dorn II et Force, 2005). Toutefois, on associe également les protéines kinases S6K à une voie indépendante à celle de PI3K/AKT, ce qui complique davantage la compréhension du mécanisme de recrutement de S6K dans l'hypertrophie induite par AKT (Tu et al. 2002; Shiojima et al. 2002).

L'activation d'AKT par PI3K est aussi importante pour la survie cellulaire en agissant contre les mécanismes qui induisent l'apoptose. Le rôle anti-apoptotique d'AKT a été caractérisé dans plusieurs paradigmes de mort cellulaire comme le stress oxydatif et osmotique, l'irradiation et les traitements de chimiothérapie, ainsi que le choc ischémique (Franke et al.1997; Downward, 1998). Au niveau du cœur, AKT joue un rôle dans la défaillance cardiaque et certaines autres maladies cardiovasculaires qui engendrent l'augmentation de la perte chronique des cellules (Matsui et al. 1999; Reed et Paternostro, 1999). Des facteurs de survie tels que NGF (*nerve growth factor*) ou IL3 (interleukine-3) se

lient à leurs récepteurs extracellulaires et activent la protéine PI3K, PDK ainsi qu'AKT. Cette dernière phosphorylerait la protéine pro-apoptotique Bad, ce qui empêcherait l'inactivation de la protéine anti-apoptotique Bcl-X<sub>L</sub>, et probablement d'autres membres de la famille Bcl-2 (Gajewski et Thompson, 1996). Somme toute, AKT possède un rôle primordial dans les cardiomyocytes quant au développement de l'hypertrophie physiologique et aux mécanismes de cardioprotection, représentant un effecteur cible d'importance pour la compréhension de la réponse adaptative du coeur et le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

#### **1.4.3 Les protéines kinases C (PKC)**

La famille des PKC comporte douze différentes isoformes médiatrices de différentes réponses cellulaires comme la perméabilité, la contraction, la migration, l'hypertrophie, la prolifération, l'apoptose et la sécrétion (Dempsey et al. 2000). Il s'agit de sérine/thréonine kinases participant à la transduction de signal, grâce aux régions régulatrices en N-terminal et catalytique en C-terminal (Mellor et Parker, 1998). Les différentes isoformes de PKC sont classifiées selon leur structure, leur spécificité de substrat et leur sensibilité au calcium, ce qui permet de les diviser en trois sous-familles : PKC conventionnelles (cPKC  $\alpha$ ,  $\beta_{1/2}$  et  $\gamma$ ), PKC nouvelles (nPKC  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  et  $\theta$ ) et PKC atypiques (aPKC  $\zeta$  et  $\lambda/\iota$ ) (Malhorta et al. 2001; Sabri et Steinberg 2003). Une quatrième sous-famille a également été caractérisée, étant composée de deux isoformes étroitement liées, soit  $\nu$  et  $\mu$  (Hayashi et al. 1999). Dans les myocytes cardiaques des mammifères, on retrouve plusieurs membres des différentes

sous-familles agissent dans plusieurs voies de signalisation, soit PKC  $\alpha$ ,  $\beta_{1/2}$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  et  $\lambda/\iota$ . L'activité d'une quelconque isoforme est dépendante de son niveau d'expression, de sa localisation dans la cellule et de son état de phosphorylation (Malhorta et al. 2001). Les cPKC et nPKC sont activées, entre autres, par le DAG, suite à l'activation des récepteurs couplés aux protéines G $\alpha$ q par les agonistes comme la PE et l'ET-1.

L'hétérogénéité d'expression des différentes isoformes de PKC rend délicate la démonstration du rôle exact de chacune dans la réponse du myocarde aux stimuli hypertrophiques. Toutefois, il est connu que dans les cardiomyocytes, les cPKC ( $\alpha$ ,  $\beta_{1/2}$ ) sont dépendantes du relâchement du calcium via la PLC et l'IP<sub>3</sub> et seraient principalement impliquées dans la défaillance cardiaque et la dysfonction  $\beta$ -adrénergique (Dorn II et Force, 2005). Il a été démontré, par des études de gain et de perte de fonction *in vivo* et *in vitro*, que l'activation de PKC $\alpha$  diminue la réponse  $\beta$ -adrénergique, ainsi que la contractilité cardiaque et inversement, que l'inactivation de PKC $\alpha$  améliore la fonction contractile (Hambleton et al 2006). Ainsi, dans le contexte d'une hypertrophie médiée par G $\alpha$ q et une activation simultanée de PKC $\alpha$ , on observe l'apparition d'une cardiomyopathie restrictive menant à la mort prématurée causée par la défaillance cardiaque (Hahn et al. 2003). Dans un même ordre d'idées, des études similaires indiquent que l'expression de PKC $\beta$  est associée à l'hypertrophie, la défaillance et la mort (Wakasaki et al. 1997 ; Bowman et al. 1997), suggérant que les isoformes cPKC  $\alpha$  et  $\beta$  ont des effets similaires qui seraient de nature plutôt pathologique sur le cœur.

D'un autre côté, les isoformes nPKC ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ), elles, sont indépendantes du calcium et seraient plutôt impliquées dans l'hypertrophie physiologique (Dorn II et Force, 2005). En effet, PKC $\epsilon$  semble posséder des fonctions trophiques puisque son activation entraîne l'élargissement hyperplasique du cœur, tandis que son inhibition cause la formation d'une cardiomyopathie dilatée hypoplasique (Mochly-Rosen et al. 2000). En contraste, la translocation modulée *in vivo* de PKC $\delta$  ne possède qu'un léger impact sur la croissance et la fonction myocardique, mais son rôle s'avère critique pour le maintien de la structure cytosquelettique dans les cardiomyocytes (Hahn et al. 2002). Ces deux isoformes semblent donc agir de manière bénéfique pour la croissance du cœur, tandis que les effets négatifs des isoformes  $\alpha$  et  $\beta$ , sont plutôt reliés à la contractilité et la fonction cardiaque. De manière globale, les PKC sont essentielles pour la transmission du signal extracellulaire en activant d'autres protéines kinases des voies de l'hypertrophie cardiaque, en particulier PDK et PI3K, mais aussi une autre grande famille de protéines kinase : les MAPK (Dorn II et Force, 2005; Wang, 2006).

#### 1.4.4 *Les protéines kinases mitogéniques (MAPK)*

Les MAPK (*mitogen activated protein kinases*) sont des sérine/thréonine kinases de 38 à 54 kDa, d'une importance majeure dans un grand éventail de réponses cellulaires incluant la croissance, la différenciation, l'inflammation et l'apoptose (Ravingerova et al. 2003). Au niveau du cœur, elles possèdent un rôle d'envergure dans différents aspects de la régulation cardiaque, à partir du développement embryonnaire jusqu'au remodelage pathologique (Wang, 2007). Les cascades de signalisation de la superfamille des MAPK sont généralement divisées en trois voies parallèles : les kinases ERK, JNK et p38 (Wang, 2007). Les stimuli extracellulaires, comme les facteurs de croissance, les cytokines, le stress physique et chimique, initialisent la transduction de signal par la phosphorylation et l'activation séquentielle des composantes spécifiques des cascades MAPK (Robinson et Cobb, 1997). Toutes les voies des MAPK incluent trois niveaux de signalisation. Les MAPK sont phosphorylées et activées par les MAPK-kinases (MAPKK), qui à leur tour sont phosphorylées et activées par les MAPKK-kinases (MAPKKK) (Luo et al. 1996 ; King et al. 1998; Ravingerova et al. 2003). Ces dernières sont activées par l'interaction avec les petites protéines G et/ou d'autres protéines kinases, reliant le module MAPK aux récepteurs cellulaires et aux stimuli externes (Cobb, 1999). La plupart des substrats biologiques des MAPK possèdent des sites de liaison très spécifiques aux MAPK qui permettent de fortes interactions très sélectives. Entre autres, les MAPK possèdent des sites complémentaires de liaison (sites de *docking*) qui leur permettent d'interagir avec les domaines de liaisons sur leurs substrats protéiques (Tanoue et al. 2000).

#### 1.4.4.1 Les protéines kinases régulées par signalisation extracellulaire (ERK)

La famille ERK des MAPK regroupe ERK1 et ERK2 (ou p42/p44 MAPK) qui sont activées lors de la croissance mitogénique, donc généralement associées à la croissance cellulaire et la survie. Il s'agit de la première voie de signalisation des MAPK reconnue pour participer à l'hypertrophie cardiaque (Bogoyevitch et al, 1993), regroupant des effecteurs hypertrophiques majeurs au niveau du coeur (Wang et Proud, 2002). ERK peut être activé par différents facteurs de croissance, soit l'EGF (*epidermal growth factor*), le PDGF (*platelet derived growth factor*), le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et l'insuline, ainsi que par divers peptides vasoactifs tels que les agonistes  $\alpha$ -adrénergiques, l'ET-1, l'Ang II (Force et Bonventre, 1998 ; Kyriakis et al, 1994). La voie Raf-MEK-ERK induit l'hypertrophie des cardiomyocytes adultes, entre autres lors de la stimulation des récepteurs  $\alpha$ 1-adrénergiques (Xiao et al, 2001). Aussi, plusieurs études démontrent également que la voie ERK est située en aval de PKC (Goldberg et al. 1997 ; Sugden et Clerk, 1998). La phosphorylation de ERK est essentielle, non seulement pour leur activation, mais aussi pour leur translocation au noyau (Ravingerova et al. 2003). Une fois activés, les ERK phosphorylent à leur tour un grand nombre de protéines régulatrices, cytosoliques et nucléaires, incluant des facteurs de transcription, des protéines du cytosquelette, des protéines kinases, des facteurs de traduction et des protéines de l'apoptose (Muslin, 2005). En particulier, ERK permet la phosphorylation des facteurs de transcription Elk-1 et GATA4 qui sont impliqués dans une variété de réponses cardiaques reliées à la croissance (Babu et al. 2000; Purcell et al. 2004).

Dans des cardiomyocytes, la surexpression adénovirale de MEK, une MAPKK de la voie ERK, entraîne l'augmentation de la taille cellulaire et l'augmentation de la synthèse d'ANP et de BNP de manière comparable à l'agent hypertrophique ET-1 (Badrian et Bogoyevitch 2007). De plus, l'activation de la voie ERK entraîne la modification de l'expression d'un grand nombre de gènes de protéines structurales (*e.g.* tropomyosine,  $\alpha$ -actinine et autres protéines reliées à l'actine et au cytosquelette) dans les myocytes, modifications qui accompagnent généralement le processus de remodelage observé lors de l'hypertrophie et la défaillance cardiaques (Heiling et al. 2000 ; Badrian et Bogoyevitch 2007). La voie ERK activerait également le remodelage métabolique qui accompagne l'hypertrophie cardiaque, affectant entre autres les processus de glycolyse et de  $\beta$ -oxydation dans le cœur (Ritchie et Delbridge, 2006 ; Badrian et Bogoyevitch 2007).

De manière intéressante, un modèle de souris transgénique surexprimant MEK1 démontre un phénotype d'hypertrophie concentrique associé à l'augmentation de la fonction cardiaque du ventricule gauche sans cardiomyopathie, létalité ou histopathologie apparentes à l'âge adulte (Bueno et al. 2000). Aussi, le *KO* spécifique au cœur de Raf1, une petite protéine G en amont de la voie ERK, entraîne le développement d'une dysfonction ventriculaire et la dilatation du cœur avec l'augmentation des cellules apoptotiques (Yamaguchi et al. 2004). Il a été démontré que l'activation MEK1-ERK protège les myocytes cardiaques de l'apoptose en culture. En effet, l'action anti-apoptotique de l'IGF-1, de la cardiotrophine 1 ou de la phényléphrine requiert pour chacun, l'activation ERK1/2

(Parrizas et al. 1997 ; Sheng et al. 1997 ; De Windt et al. 2000a). La signalisation ERK1/2 est aussi reconnue pour atténuer l'induction de l'apoptose par la daunomycine ou par stress oxydatif dans les cardiomyocytes *in vitro* (Aikawa et al. 1997 ; Adderley et Fitzgerald, 1999 ; Zhu et al. 1999). La voie ERK est également importante pour la phosphorylation des protéines pro-apoptotiques caspase 9 et Bim, réduisant ainsi la capacité de ces protéines à déclencher la mort cellulaire (Allan et al. 2003; Harada et al. 2004). Ces observations suggèrent fortement que l'activation de la voie ERK1/2 est impliquée dans l'hypertrophie physiologique, bénéfique pour le myocarde défaillant ou dilaté (Bueno et al. 2000). Toutefois, les autres membres de la superfamille des MAPK, JNK et p38, semblent présenter un scénario différent, puisque l'activation de ces voies dans le cœur suggère qu'elles sont associées aux cardiomyopathies.

#### 1.4.4.2 Les protéines kinases p38

La sous-famille des MAPK p38 regroupe des protéines kinases osmorégulatrices qui sont principalement activées après l'exposition des cellules à différentes formes de stress cellulaire. Certains membres des kinases p38, ainsi que d'autres de la sous-famille JNK, font partie d'une nomenclature plus récente, les affiliant au sous-ensemble des protéines kinases activées par le stress, *i.e.* les SAPK (*stress-activated protein kinases*). Les MAPKK phosphorylant spécifiquement les MAPK p38 sont MKK3 et MKK6, qui sont activées par une variété de stimuli, via l'activation des RCPG lors du stress chimique, physique et osmotique, ainsi que celui induit par les radiations (Han et al. 1994 ; Ravingerova et al.



2003). Il existe quatre isoformes de p38 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ), mais on retrouve principalement la forme  $\alpha$  dans les tissus cardiaques, ainsi que les formes  $\beta$  et  $\gamma$  à de plus faibles niveaux (Engel et al. 2005). Ainsi, au niveau du cœur, les voies de p38 sont principalement activées sous des conditions de nature pathologique tel qu'observé lors de l'ischémie ou en présence d'une forte pression de surcharge cardiaque (Steenbergen, 2002 ; Petrich et Wang, 2004).

Plusieurs travaux ont démontré que les voies p38 sont activées dans les cardiomyocytes par différents ligands de RCPG comme l'ET-1, PE et Ang II ainsi que par l'étirement des myocytes (Sugden et Clerk, 1998 ; Liang et al. 2000). Les isoformes de p38 phosphorylent un grand nombre de facteurs de transcription cardiaques incluant MEF2 (*myocyte enhancer factor-2*), GATA4, ATF-2/6 (*activator transcription factor-2/6*), NF- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*), SRF et Elk-1 (Raingeaud et al. 1996 ; Han et al. 1997 ; Thucrauf et al. 1998 ; Liang et Gardner 1999 ; Yang et al. 1999; Morin et al. 2000; Charron et al. 2001 ; Morin et al. 2001 ; Ravingerova et al. 2003). La surexpression adénovirale de MKK3 et MKK6 indique que les voies des MAPK p38 induisent la croissance hypertrophique dans les cardiomyocytes, et favorise l'expression de gènes comme l'ANP, le BNP, l' $\alpha$ -SkA (Wang et al. 1998 ; Zechner et al. 1998 ; Liang et al. 2000). Aussi, des expériences utilisant des mutants dominants négatifs des isoformes de p38, suggèrent que p38 $\alpha$  posséderait un rôle pro-apoptotique via la protéine p53, induisant aussi une réponse cytopathique dans les myocytes, tandis que p38 $\beta$  serait plutôt relié à l'hypertrophie des myocytes en culture (Wang et al. 1998, Petrich et Wang, 2004). Toutefois, un scénario d'autant plus complexe est suggéré par des observations récentes à partir de modèles cellulaires et transgéniques,

redéfinissant non seulement le rôle des MAPK p38 (et JNK) dans l'hypertrophie et la mort cellulaire, mais pointant aussi vers de nouvelles fonctions dans différents aspects de la pathologie cardiaque, incluant la fonction contractile, le remodelage de la matrice extracellulaire, la communication intercellulaire et la régulation métabolique (Petrich et Wang 2004). Dans les études transgéniques chez la souris, l'activation de p38 mène à l'induction significative du profil d'expression des gènes fœtaux, la perte de contractilité, ainsi qu'au remodelage fibrotique, contribuant ainsi au développement de cardiomyopathies de type restrictif (Liao et al. 2001). La voie p38 active négativement la contractilité *in vitro* et l'inhibition de son activité a un effet inotropique positif sur les cardiomyocytes, sans affecter l'homéostasie du calcium intracellulaire (Liao et al. 2002). Toutes ces observations ont permis de mieux comprendre l'implication de la signalisation des MAPK p38 dans la dysfonction cardiaque sous certaines conditions physiopathologiques, comme lors de dommages causés par l'ischémie/reperfusion ou la défaillance cardiaque chronique.

Dans des souris transgéniques, le *KO* pour l'isoforme p38 $\alpha$  est létal au niveau embryonnaire, marquant ainsi l'importance de cette kinase lors du développement (Petrich et Wang 2004). Toutefois, le *KO* spécifique au cœur de p38 $\alpha$  montre une augmentation de la mitose des cardiomyocytes néonataux et son activation *in vivo* réduit la prolifération des cardiomyocytes fœtaux (Engel et al. 2005). Aussi, l'inhibition de p38 *in vitro* dans les cardiomyocytes adultes, accompagnée d'une stimulation par des facteurs de croissance, permet l'induction de la cytokinèse, proposant l'hypothèse surprenante que la régénération cardiaque serait possible (Engel et al. 2005). Bien que les études concernant les MAPK p38

soient nombreuses, il reste complexe d'évaluer le rôle pathologique de ces protéines au niveau cardiaque, puisque leurs voies de signalisation partagent plusieurs aspects avec les JNK, un autre membre des SAPK grandement impliqué au niveau du cœur.

#### 1.4.4.3 Les protéines kinases c-Jun-N-terminal (JNK)

La sous-famille des protéines JNK fait partie, comme mentionné précédemment, des SAPK et sont principalement activées par des stimuli induits par le stress. Les cytokines inflammatoires, différents stress cellulaires comme les radiations UV, le choc thermique ou osmotique et l'inhibition de la synthèse protéique (*e.g.* par l'anisomycine) sont de forts activateurs des voies JNK (Hibi et al. 1993 ; Bogoyevich et al. 1995 ; Kyriakis et al. 1994). Les JNK sont à priori reconnues pour phosphoryler *c-Jun*, un facteur de transcription qui participe à la formation du complexe AP-1 (*activator protein-1*) qui est très important dans la progression du cycle cellulaire. La régulation différentielle de *c-Jun* par les deux principales isoformes de JNK (1 et 2) est responsable de la modulation positive (JNK1) et négative (JNK2) du cycle prolifératif de plusieurs types cellulaires (Sabapathy et Wagner, 2004). Aussi, le facteur nucléaire *c-Jun*, ainsi que d'autres protéines telle que *c-fos*, sont entre autres considérées comme des marqueurs précoces de l'hypertrophie cardiaque (Akazawa et Komuro, 2003).

Dans le cœur, l'activité des JNK résulte principalement de l'activation des RCPG (ET-1, PE) et de l'étirement des myocytes (Ito et al. 1999). Plusieurs études démontrent en

effet l'implication de JNK dans l'hypertrophie cardiaque *in vivo* et *in vitro*. L'infection de cardiomyocytes avec un adénovirus surexprimant le mutant dominant négatif de MKK4, une MAPKK qui active JNK, bloque la synthèse protéique induite par l'ET-1, la réorganisation du sarcomère et l'augmentation des niveaux d'ARNm de l'ANP (Choukroun et al. 1998). De plus, l'étude des promoteurs des gènes  $\beta$ -MHC, ANP et  $\alpha$ -SkA révèle l'importance de MEKK1, une MAPKKK en amont de JNK, pour la transcription de ces marqueurs de l'hypertrophie dans les cardiomyocytes ventriculaires néonataux (Bogoyevitch et al. 1996 ; Ramirez et al. 1997 ; Thorburn et al, 1997). Plus récemment, il a été démontré que le croisement d'une souris MEKK1<sup>-/-</sup>, pour laquelle la signalisation JNK est défaillante, avec un modèle transgénique G $\alpha$ q d'hypertrophie cardiaque, atténuait significativement l'hypertrophie et la dysfonction contractile (Adams et al. 1998 ; Minamino et al. 2002). Cependant, toujours avec les souris MEKK1<sup>-/-</sup>, aucun effet n'a été observé sur l'hypertrophie et la dysfonction cardiaque lors de l'induction d'une pression de surcharge cardiaque par constriction aortique (Sadoshima et al. 2002). Les différentes études, pouvant paraître plutôt contradictoires, suggèrent ainsi que JNK joue des rôles disparates relativement à l'hypertrophie cardiaque, et ce, probablement selon la nature du stimulus hypertrophique.

Les voies de signalisation reliées à JNK sont reconnues comme étant médiatrices de la régulation apoptotique de plusieurs types cellulaires (Petrich et Wang, 2004). Par contre, le rôle *in vivo* de JNK dans l'apoptose cardiomyocytaire est loin d'être proprement établi. L'imposition d'une pression de surcharge cardiaque à des animaux transgéniques *KO* pour

le gène MEKK1 a révélé l'augmentation de l'apoptose des cardiomyocytes comparativement aux contrôles du type sauvage, suggérant ainsi un rôle protecteur pour JNK dans la signalisation en réponse au stress hémodynamique (Sadoshima et al 2002). Cependant, d'autres observations indiquent que la délétion du gène ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase-1*) chez la souris, une MAPKKK en amont de JNK (et p38), provoque l'atténuation de l'apoptose lors d'une stimulation Ang II, suggérant un rôle pro-apoptotique pour JNK (Petrich et al. 2002 ; Izumiya et al. 2003). Ainsi, l'activité de JNK s'avère être une composante importante dans la signalisation du processus apoptotique sous des conditions pathologiques particulières. Un autre modèle transgénique de souris exprimant spécifiquement dans le coeur MKK7D, une MAPKK qui phosphoryle JNK, ne démontre aucun signe d'induction apoptotique ou d'hypertrophie ventriculaire (Petrich et al. 2002 ; Petrich et al. 2003). Par contre, cette surexpression a entraîné, chez les animaux, une létalité précoce associée à la formation d'une cardiomyopathie sévère, accompagnée d'une augmentation marquée de l'expression de gènes fœtaux (Petrich et al. 2003). À la lumière des études effectuées sur les voies JNK, le rôle de cette kinase dans le cœur reste pourtant bien sombre et son caractère ambivalent repose sur la complexité des mécanismes de phosphorylation des voies signalétiques de l'ensemble des MAPK.

Il a été reporté que les effecteurs des voies ERK, JNK et p38 peuvent interagir entre eux à l'intérieur de leurs différentes cascades respectives, ce qui complexifie davantage les interactions lors des diverses réponses cellulaires (Derijard et al. 1995 ; Kyriakis et Avruch, 2001). On constate que les MAPK possèdent un rôle biologique majeur dans l'hypertrophie

du cœur et sa transition vers la défaillance cardiaque, ainsi que dans l'apoptose. Les études suggèrent que les MAPK seraient à la fois impliquées dans l'hypertrophie cardiaque associée au développement et dans l'initiation de l'hypertrophie chez l'adulte en réponse aux stimuli physiopathologiques (Bueno et al. 2001). La modulation des MAPK représente donc une cible thérapeutique potentielle pour l'intervention pharmacologique et l'activation des voies participant aux cascades cardioprotectives endogènes.

#### **1.4.5 Phosphatases**

Les protéines phosphatases sont des enzymes qui retirent un groupement phosphate de leurs substrats, phénomène également appelé déphosphorylation. Cette action est directement opposée à la phosphorylation engendrée par les protéines kinases et le rôle biologique des phosphatases est très important dans la régulation des cascades signalétiques (Voet et Voet, 1998). Au niveau de la réponse hypertrophique, deux familles de phosphatases sont impliquées dans les cascades de signalisation, soit la calcineurine et les *MAPK phosphatases* (MKP).

#### 1.4.5.1 La calcineurine dans le système calcium/calmoduline

La calcineurine, aussi appelée protéine phosphatase-2B (PP2B), est une sérine/thréonine phosphoprotéine phosphatase calcium/calmoduline dépendante hétérodimérique. Elle est constituée de deux sous-unités : la calcineurine A qui contient le site catalytique et la calcineurine B, composée du domaine régulateur liant le calcium (Bueno et al. 2002). Chez les mammifères, il existe trois différents gènes codant pour la calcineurine A ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) desquels  $A\alpha$  et  $A\beta$  sont retrouvés dans les cellules cardiaques sous de multiples formes alternativement épissées (Bueno et al. 2002). La calcineurine B est encodée également par deux gènes qui génèrent des isoformes alternativement épissées (Ueki et al. 1992). Le calcium est un régulateur multifonctionnel qui agit comme second messenger dans la signalisation cellulaire. La concentration cellulaire de calcium est fortement régulée pour le maintien de diverses fonctions physiologiques comme la contractilité musculaire et la sécrétion hormonale (Dolmetsch et al. 1997 ; Bers et Guo, 2005). La signalisation calcique intracellulaire est primordiale pour différentes réponses transcriptionnelles et son action est entre autres modulée par la calmoduline, un coactivateur essentiel pour la régulation de différents effecteurs (Maier et Bers, 2002). Par conséquent, la calcineurine est dépendante du calcium et de la calmoduline pour son activation, et est importante dans la régulation de l'expression de gènes d'une variété de systèmes cellulaires.

L'expression prolongée d'une forme constitutivement active de la calcineurine dans le cœur de souris transgéniques est suffisante pour induire une hypertrophie cardiaque

sévère, qui évolue vers la dilatation ventriculaire et rapidement vers l'insuffisance cardiaque et la mort (Molkentin et al. 1998). En plus d'entraîner l'augmentation de la taille de l'organe, on assiste à l'activation de l'expression des gènes hypertrophiques  $\beta$ -MHC,  $\alpha$ -SkA et BNP (Molkentin et al 1998). D'autre part, deux agents immunosuppresseurs, la cyclosporine A et le FK506, sont reconnus pour inhiber l'activité de la calcineurine et permettent la prévention de l'hypertrophie et de la fibrose dans plusieurs modèles, ce qui suggère un rôle crucial pour la calcineurine dans le remodelage cardiaque (Tokudome et al. 2005). Le modèle de souris transgéniques *KO* pour le gène calcineurine A- $\beta$  suggère que la calcineurine est un effecteur de l'hypertrophie pathologique. Effectivement, ces souris possèdent de plus petits cœurs que la normale et montrent une réponse hypertrophique altérée face à l'Ang II ou l'isoprotérénol, aussi bien qu'à la constriction aortique (Bueno et al. 2002b). Il est connu que la calcineurine interagit physiquement avec les facteurs de transcription de la famille NFATc (*nuclear factor activated-T-cell*), permettant ainsi leur translocation nucléaire et leur activation transcriptionnelle (Rao et al. 1997). Cette activation est suffisante pour l'induction de l'hypertrophie et des souris transgéniques *KO* pour NFATc-3 ont une réponse hypertrophique diminuée lors d'une hypertrophie calcineurine -dépendante (Wilkins et al. 2002).

La calcineurine est aussi reconnue pour entraîner l'apoptose par la déphosphorylation de la protéine pro-apoptotique *Bad*. Dans le cœur, la voie calcium-calcineurine semble jouer un rôle critique dans la progression de la défaillance cardiaque par la régulation de l'apoptose. L'expression *in vivo* d'une forme mutée de la calcineurine,



agissant comme dominant négatif, prévient la redistribution de *Bad* et de NFATc induites par le calcium et réduit l'apoptose induite par l'isoprotérénol, un agoniste  $\beta$ -adrénergique (Saito et al. 2000). Effectivement, le nombre des cellules cardiaques TUNEL-positives des souris transgéniques, de même que celui des souris traitées par FK506, était inférieur à celui des souris du type sauvage, suggérant que la stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques induit l'apoptose des cardiomyocytes *in vivo*, via la calcineurine (Saito et al. 2000). Cependant, il a été rapporté que la calcineurine pouvait activer des voies opposées qui induisent ou suppriment l'apoptose dans le même type cellulaire (Lotem et al. 1999). Ainsi, ces études nécessitent d'être approfondies pour une meilleure compréhension des mécanismes régulateurs de l'apoptose via les voies calcium-calcineurine dépendantes.

La signalisation reliée à la calcineurine est également associée à l'activation d'autres voies signalétiques comme certaines isoformes de PKC ou les MAPK (DeWindt et al 2000 ; Zou et al. 2001), ce qui complexifie davantage les interactions. Par exemple, des souris transgéniques surexprimant la calcineurine dans le cœur montrent une activation marquée des isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  de PKC (DeWindt et al. 2000), et la cyclosporine A prévient l'activation de PKC dans les rats après constriction aortique (Vega et al. 2003). Aussi, des études suggèrent que la calcineurine entraînerait la diminution de l'activité de la MAPK p38 et une inhibition de p38 *in vivo* augmenterait la signalisation calcineurine/NFATc (Braz et al. 2003). La diminution de p38, reliée à l'activation de la calcineurine, corrèle avec l'augmentation du niveau de la protéine phosphatase MKP1, une enzyme importante dans la régulation des voies de signalisation des MAPK.

#### 1.4.5.2 Les MAPK-phosphatases (MKP)

Les protéines MKP, activées par les facteurs mitogènes et les MAPK, jouent un rôle de régulateur des voies de signalisation cellulaire associée à l'hypertrophie cardiaque (Bueno et al. 2001). Jusqu'à maintenant, onze membres ont été identifiés, qui diffèrent les uns des autres selon leur spécificité de substrats, leur distribution physiologique, leur localisation sous-cellulaire et leur profil d'expression inductible (Haneda et al 1999; Masuda et al. 2001). En réponse à l'activation des MAPK, les MKP sont induites transcriptionnellement, menant à la déphosphorylation et l'inactivation spécifiques des MAPK (Haneda et al. 1999). Entre autres, MKP-1 est un membre important exprimé au niveau du cœur et apparaît comme étant un régulateur clé de l'inactivation nucléaire de p38, JNK1/2 et ERK1/2 (Palm-Leis et al. 2004) et la surexpression adénovirale de MKP-1 dans des cultures de cardiomyocytes bloque l'activation de ces MAPK (Bueno et al. 2001). Des transfections transitoires de MKP-1 dans des cardiomyocytes ont démontré son potentiel répressif sur plusieurs promoteurs de gènes induits par l'hypertrophie cardiaque (Fuller et al. 1997). MKP-1 limite donc la réponse hypertrophique cardiaque *in vitro* et *in vivo*, via la déphosphorylation et l'inactivation des MAPK (Bueno et al. 2001). Effectivement, des souris transgéniques surexprimant faiblement MKP-1 de manière constitutive sont caractérisées par la réduction de l'hypertrophie cardiaque et implique préférentiellement la signalisation p38 et JNK1/2 (Bueno et al 2001). D'autre part, les souris surexprimant fortement MKP-1, qui inactivent les voies p38, JNK1/2 et ERK1/2, sont caractérisées par la

réduction de l'hypertrophie associée au développement, résultant en une dilatation ventriculaire sévère et un taux de létalité néonatale élevé (Bueno et al. 2001). Ces données soulignent que l'inactivation des trois branches de la signalisation des MAPK compromet la maturation du cœur, et que les MKP sont d'importants médiateurs des cascades qui régissent notamment l'activité transcriptionnelle relative à l'hypertrophie cardiaque.

## **1.5 Les facteurs de transcription cardiaques impliqués dans l'hypertrophie**

La stimulation extracellulaire hypertrophique converge sur un nombre limité de circuits intracellulaires de transduction de signal, qui sont médiateurs de la réponse de la croissance cardiaque. Ces voies signalétiques coordonnent directement la croissance hypertrophique par le changement du programme transcriptionnel des gènes et par l'activation de la machinerie traductionnelle (Akazawa et Komuro, 2003 ; Heineke et Molkenin, 2006). L'expression des gènes cardiaques est contrôlée à la fois par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels. Plusieurs protéines nucléaires servent de facteurs de transcription qui reconnaissent et lient des séquences d'ADN spécifiques dans les promoteurs régulant la transcription génique. Certains facteurs de transcription qui régulent l'expression des gènes cardiaques ont été identifiés, et une grande partie des gènes induits durant la cardiogenèse sont aussi exprimés lors de la croissance hypertrophique des cardiomyocytes (Srivastava 2001). Jusqu'à maintenant, un nombre de facteurs de transcription ont été identifiés comme des régulateurs de géniques activés en réponse à une augmentation de la charge hémodynamique.

Entre autres, l'analyse des mécanismes contrôlant l'expression des gènes des peptides natriurétiques (ANP et BNP) a permis l'identification de plusieurs sites clés sur leur promoteur respectif, parmi lesquels on retrouve des éléments de liaison pour des

facteurs de transcription comme NFATc, SRF et GATA4 (Charron et al. 2001; Morin et al. 2001; Nemer et Nemer, 2002).

### **1.5.1 La famille GATA : expression et fonction**

Chez les mammifères, six différents facteurs GATA (1 à 6) ont été identifiés jusqu'à maintenant. GATA1, -2 et -3 sont principalement exprimés dans les cellules hématopoïétiques (Weiss et Orkin 1995) tandis que GATA4, -5 et -6 sont exprimés dans le cœur et le système digestif majoritairement (Laverriere et al. 1994; Burch 2005). Les membres de la famille GATA contiennent un domaine de liaison à l'ADN hautement conservé avec deux doigts de zinc adjacents (Cys-X2-Cys-X17-Cys-X2-Cys) et l'on observe une très grande homologie quant à leur séquence d'acides aminés, principalement au niveau de ce domaine (Charron et Nemer 1999). Il interagit spécifiquement avec l'élément d'ADN *cis* contenant la séquence consensus (A/T)GATA(A/G) sur les promoteurs cibles (Pikkarainen et al. 2004).

#### 1.5.1.1 Activité transcriptionnelle au niveau cardiaque

Les facteurs de transcription GATA4, -5 et -6 sont exprimés dans différentes cellules du cœur. L'expression de GATA5 est restreinte principalement à l'endocarde et elle diminue fortement entre les stades embryonnaire et postnatal (Nemer et al. 1999). GATA5 jouerait ainsi un rôle spécifique dans le développement endocardique. D'autre part, GATA4

et -6 sont majoritairement exprimés dans le myocarde lors du développement embryonnaire et postnatal. GATA4 peut être détecté dans le mésoderme pré-cardiaque aussi tôt qu'à 7 jours embryonnaires chez la souris et son expression précède celle des marqueurs cardiaques précoces comme les protéines contractiles et les peptides natriurétiques (Charron et al. 1999). Ceci souligne que son rôle est crucial durant le développement embryonnaire et la cardiogenèse. Notamment, notre laboratoire a mis en évidence l'implication de GATA4 dans la différenciation cardiaque de cellules souches (P19) et son rôle de facteur inductif et/ou de survie pour les cellules pré-cardiaques (Grepin et al. 1995 ; Grepin et al. 1997). L'inactivation du gène GATA4 dans des souris transgéniques a confirmé son rôle essentiel dans le développement normal du cœur, puisque les souris ne développent pas de tube cardiaque linéaire et meurent *in utero* après 9 jours (Molkentin et al. 1997). Des études de gain de fonction chez *Xenopus* ont révélé que la surexpression de GATA6 bloque la différenciation des cardioblastes et stimule la prolifération de ces précurseurs cardiaques (Gove et al. 1997). Le *KO* du gène GATA6 chez la souris est également létal à 7,5 jours *postcoitum* (Morrisey et al. 1998). D'autres travaux *in vivo* effectués chez *Xenopus* ont démontré l'association entre l'expression des facteurs GATA4, -5 et -6 et la spécification des progéniteurs cardiaques (Jiang et al. 1996). L'expression ectopique de ces facteurs GATA entraîne l'activation de la transcription de différents gènes du développement embryonnaire cardiaque, *e.g.* l'actine cardiaque ( $\alpha$ -Ca) et  $\alpha$ -MHC (Jiang et al. 1996).

Conséquemment, les motifs de liaison des facteurs GATA ont été identifiés dans les promoteurs de nombreux gènes exprimés dans le cœur incluant  $\alpha$ -MHC (Molkentin et al.

1994),  $\beta$ -MHC (Hasegawa et al. 1997), ANP (Grepin et al. 1994), BNP (Thuerauf et al. 1994), troponine C/I cardiaque (Ip et al. 1994; Murphy et al. 1997; Bhavsar et al. 2000) et l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Nicholas et Philipson 1999). *In vitro*, GATA4 et 6 régulent les gènes ANP et BNP avec le même pouvoir (Temsah et Nemer 2005), tandis que GATA4 est plus puissant lors de la modulation de  $\alpha/\beta$ -MHC (Charron et al. 1999). Les études récentes ont permis d'établir que l'interaction combinatoire des facteurs de transcription cardiaques gouverne les processus complexes de la cardiogenèse et de l'expression des gènes spécifiques au cœur (Bruneau, 2002). Effectivement, plusieurs travaux ont mis en évidence l'importance de GATA4 et de ses cofacteurs, lesquels seront abordés dans une section subséquente, ainsi que le rôle de leur collaboration lors de la régulation transcriptionnelle au cours du développement normal et pathologique du cœur.

#### 1.5.1.2 GATA-4 dans l'hypertrophie cardiaque

GATA4 participe à la régulation de l'expression des gènes cardiaques en réponse à divers stimuli hypertrophiques, incluant la surcharge de pression sanguine, l'isoprotérénol, la PE, l'ET-1, l'Ang II et le phorbol myristate-acétate (Hasegawa et al. 1997; Morimoto et al. 2000; Liang et al. 2001; Clement et al. 2002; Hautala et al. 2002). La surexpression adénovirale de GATA4 dans des cultures primaires de cardiomyocytes entraîne la réorganisation sarcomérique, l'augmentation de la taille de la surface cellulaire et résulte en l'augmentation significative de l'accumulation des protéines totales (Charron et al. 2001; Liang et al. 2001). Des résultats de notre laboratoire montrent aussi que l'utilisation d'un

adénovirus surexprimant un antisens GATA4 dans les cardiomyocytes entraîne la réduction de l'expression de plusieurs gènes cardiaques, notamment l'ANP, le BNP, l' $\alpha$ -SkA, l' $\alpha$ -MHC, la  $\beta$ -MHC, la troponine cardiaque I, etc. (Charron et al. 1999) et abroge la réorganisation cytosquelettique induite par la PE (Charron et al. 2001). De manière intéressante, l'hypertrophie induite par la surexpression de GATA4 observée dans les cardiomyocytes ressemble fortement à l'hypertrophie induite par la stimulation  $\alpha$ -adrénergique de la PE. Des études *in vitro* démontrent que la stimulation de cardiomyocytes par la PE phosphoryle et active GATA4 en plus de renforcer sa liaison avec l'ADN, mais le mécanisme exact par lequel cette activité de liaison est renforcée par la stimulation hypertrophique demeure incertain (Liang et al. 2001).

La surexpression d'une valeur de 2,5 fois de la protéine GATA4 dans le cœur adulte de souris transgéniques entraîne l'augmentation de la masse cardiaque et l'activation de gènes hypertrophiques tels que l'ANP, le BNP et l' $\alpha$ -SkA, soulignant ainsi le rôle fonctionnel de GATA4 dans le développement du phénotype hypertrophique (Liang et al. 2001). Toutefois, les études de gain de fonction limitent la compréhension des mécanismes physiologiques impliquant GATA4 dans l'hypertrophie et une approche de perte de fonction s'est avérée nécessaire, bien que difficile à élaborer, puisque le *KO* de GATA4 chez la souris entraîne la mort prématurée des embryons (Molkentin et al. 1997) et que l'inactivation restrictive de GATA4 (délétion du 2<sup>e</sup> exon) dans le cœur de souris est également létale (Zeisberg et al. 2005). Alors, des études se sont penchées sur les conséquences de la réduction de l'expression de GATA4 ( $\approx 50\%$ ) dans le cœur de souris



hétérozygotes  $GATA4^{WT/\Delta ex2}$  (Bisping et al. 2006) ou la délétion spécifique de  $GATA4$  (délétion des exons 3, 4 et 5) au niveau du coeur dans des souris *KO* myocardiques (Oka et al. 2006). Dans les souris transgéniques  $GATA4^{WT/\Delta ex2}$  soumises à une surcharge de pression sanguine, on n'obtient pas de différence par rapport à l'hypertrophie comparativement au souris de type sauvage. Toutefois, on y observe un phénotype hypertrophique excentrique *vs* concentrique pour les souris contrôles, mais la magnitude de l'hypertrophie ne dépendrait pas du niveau de  $GATA4$ , relativement à la gamme physiologique de l'expression de  $GATA4$  examinée dans ces travaux. L'adoption d'une morphologie allongée des cardiomyocytes dans les modèles d'hypertrophie excentrique précède généralement le développement de la dysfonction cardiaque (figure 1 ; Onodera et al. 1998). Ainsi, cette réponse compensatoire serait due à la diminution du nombre de myocytes observée dans les coeurs de ces souris transgéniques et conséquemment, à l'élévation du stress des parois cardiaques. Le modèle de *KO* de  $GATA4$  spécifique au coeur d'Oka et al. (2006), lui, est associé à une dysfonction cardiaque progressive de base et l'augmentation de l'apoptose des tissus cardiaques. En réponse à la surcharge de pression, l'apoptose est d'autant plus augmentée dans ce modèle comparativement aux souris du type sauvage (Oka et al. 2006). Les résultats des deux études suggèrent donc que  $GATA4$  serait requis pour la survie des myocytes cardiaques et que ce facteur de transcription serait un régulateur dose-dépendant de l'apoptose dans le coeur, particulièrement face à un stress myocardique. De plus, chacune des études montre que la caspase 12 est augmentée lorsque la protéine  $GATA4$  est diminuée ou absente. La caspase 12 est une protéine impliquée dans l'activation de l'apoptose médiée par le réticulum sarcoplasmique et elle serait, selon ces

résultats, une cible importante située en aval de GATA4 (Oka et al. 2006 ; Bisping et al. 2006). Toutefois, les marqueurs ANP et  $\alpha$ -MHC sont diminués dans le modèle d'Oka et al. (2006), tandis qu'aucune différence significative n'est observée quant à l'expression de ces gènes dans les souris GATA4<sup>WT/ $\Delta$ ex2</sup> (Bisping et al. 2006). De manière consistante, les souris du *KO* myocardique de GATA4 démontrent une réduction significative de l'hypertrophie cardiaque après IM, suggestive d'un type excentrique (Oka et al. 2006), tandis que l'hypertrophie dans les cœurs des souris GATA4<sup>WT/ $\Delta$ ex2</sup> n'est pas diminuée, sous les mêmes conditions (Bisping et al. 2006). D'autre part, la réduction de l'expression de GATA4 serait responsable de l'hypoplasie des cardiomyocytes observée dans les deux modèles, soulignant ainsi l'importance de GATA4 dans le développement du cœur. En effet, au stade fœtal, GATA4 promeut la prolifération des cardiomyocytes et leur différenciation à partir des cardioblastes (Crepin et al. 1997; Zeisberg et al. 2005).

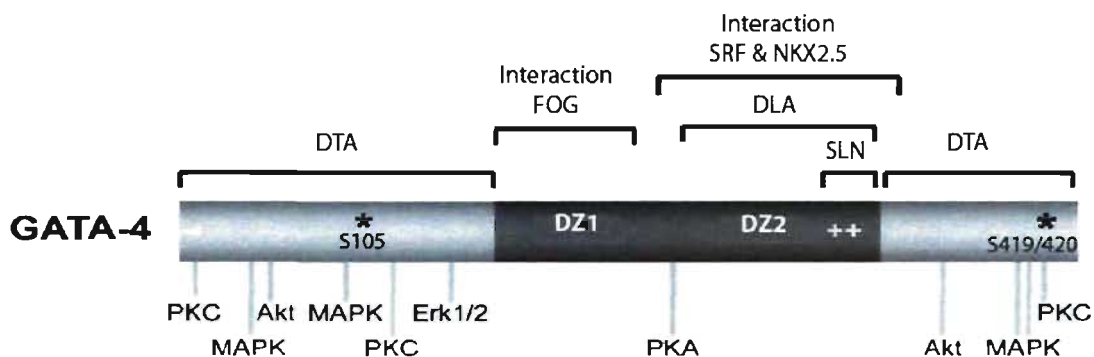
L'accumulation de ces données démontre que le facteur de transcription GATA4 est requis pour la fonction myocardique normale et pour la protection du cœur face à l'insuffisance cardiaque induite par le stress. Ainsi, les voies qui modulent l'expression ou l'activité de GATA4 semblent jouer un rôle protecteur pour le cœur lors de la pathogenèse associée à la défaillance cardiaque. Bien que les mécanismes d'activation de la protéine GATA4 demeurent très complexes, la phosphorylation de ce facteur de transcription représente un outil de compréhension important quant à son rôle dans l'hypertrophie et la survie des cardiomyocytes.

### 1.5.1.3 Phosphorylation de GATA4

La phosphorylation de GATA4 par les voies de signalisation des kinases activées entre autres par les agonistes hypertrophiques, favorise sa propre liaison avec l'ADN et son rôle de transactivateur des gènes de l'hypertrophie. La protéine GATA4 possède plusieurs sites de phosphorylation putatifs, régulés par différentes protéines kinases, mais très peu ont été confirmés jusqu'à ce jour (figure 4). Des travaux ont démontré en bloquant la cascade ERK avec un inhibiteur spécifique à cette voie (PD098059), que la phosphorylation de GATA4 était altérée (Morimoto et al. 2000). Par après, il a été trouvé que ERK1/2 phosphoryle GATA4 spécifiquement sur la sérine en position 105 (S105), régulant ainsi l'activité transcriptionnelle de GATA4. L'identification d'un substrat de ERK est basée sur la présence d'un résidu cible, sérine ou thréonine, adjacent à un résidu proline, typiquement selon le motif PXSP, où X est n'importe quel acide aminé. Le site S105 fait partie de ce motif sur la protéine GATA4, dans la région du domaine d'activation transcriptionnel N-terminal (acides aminés 1 à 204). Les MAPK identifient également leurs substrats selon la présence d'un site de liaison (*docking*) qui est adjacent au motif PXSP sur la protéine cible (Jacobs et al. 1999). Ce type de site est nécessaire pour l'amarrage des MAPK à la protéine et régule l'efficacité, ainsi que la spécificité des réactions enzymatiques (Tannoue et Nishida, 2002). Bien que l'action de ERK sur le site S105 semble prédominante par rapport à p38 et JNK, ces voies phosphoryleraient également ce site, mais à de plus faibles niveaux (Liang et al. 2001). Par exemple, notre laboratoire a trouvé que la réorganisation sarcomérique induite par RhoA avec la PE et l'ET-1 impliquerait la voie de signalisation

p38 MAPK menant à la phosphorylation de GATA4 en position S105 dans les cardiomyocytes néonataux (Charron et al. 2001).

Notre laboratoire a dernièrement mis en évidence que l'activité transcriptionnelle de GATA4 sur le promoteur de l'ANP est médiée par la phosphorylation par PKC lors de la stimulation à l'Ang II (Wang et al. 2005). En effet, la phosphorylation de GATA4 par PKC serait effectuée sur les résidus S419/S420 (figure 4) et ce mécanisme n'impliquerait pas l'action des MAPK (Wang et al. 2005). La phosphorylation de GATA4 peut également s'avérer inhibitrice de son activité transcriptionnelle. Effectivement, la protéine kinase GSK-3 $\beta$  phosphoryle GATA4 au niveau de son domaine de transactivation N-terminal et régule négativement son activité (Morisco, Seta et al. 2001). Toutefois, l'effet inhibiteur de GSK3 $\beta$  sur l'hypertrophie cardiaque pourrait aussi provenir de la régulation de facteurs de transcription impliqués dans la croissance cardiaque et l'hypertrophie, tels que *c-myc*, NFATC et  $\beta$ -caténine (Haq et al. 2000; Dorn et Force 2005). Ainsi, GATA4 représente un effecteur terminal important dans plusieurs voies de signalisation et son activité transcriptionnelle est régulée à la fois par les mécanismes de phosphorylation, mais également en fonction de la collaboration avec d'autres facteurs de transcription, qui participent aussi au programme génétique de l'hypertrophie cardiaque.



**Figure 4. Cartographie de la protéine GATA4: identification des domaines fonctionnels d'interaction avec les protéines kinases**

Représentation schématique de la protéine GATA4 montrant ses domaines fonctionnels, ainsi que la localisation des sites putatifs de phosphorylation et d'interaction avec certains cofacteurs. Les sites connus de phosphorylation sont illustrés sur le schéma (\*) : le site MAPK ser 105 et les sites PKC ser 419/420.

*DLA, domaine de liaison à l'ADN, DTA, domaine de transactivation; DZ, doigt de zinc, SLN, séquence de localisation nucléaire*  
(image modifiée de Temsah et Nemer, 2005)

### 1.5.2 Cofacteurs de GATA-4 dans l'hypertrophie cardiaque

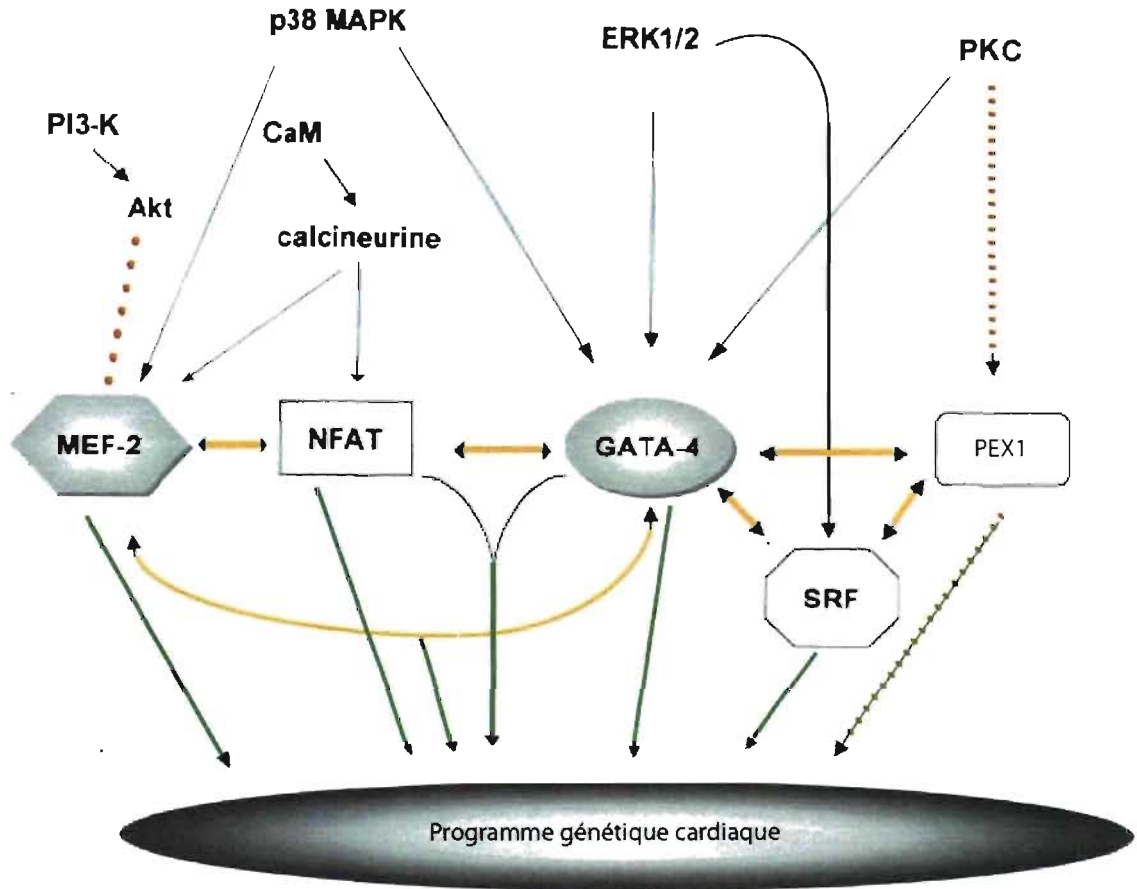
En plus de la phosphorylation, GATA-4 est aussi régulé par les interactions avec d'autres facteurs transcriptionnels tel que mentionné ci-haut. Plusieurs facteurs de transcription et cofacteurs nucléaires interagissent avec GATA4 pour activer ou réprimer l'expression des gènes lors du développement embryonnaire ou dans le cœur adulte (tableau I et figure 5). Plusieurs de ces cofacteurs sont eux même impliqués dans l'hypertrophie cardiaque, notamment SRF, NFATC, MEF2, et PEX1.

**Tableau I:** Sommaire des cofacteurs/collaborateurs de GATA4 dans le cœur et description du rôle de la collaboration, des régions interactives de GATA4 et de certains promoteurs cibles

Cofacteurs	Rôle de collaboration	Région interactive de GATA4	Promoteurs cibles
<b>GATA6</b>	Développement embryonnaire Prolifération et différenciation Hypertrophie	Doigts de zinc N- et C-terminal et région adjacente	+ ANP + BNP
<b>MEF2</b>	Développement embryonnaire Croissance post-natale du myocarde Hypertrophie	Doigt de zinc C-terminal et région adjacente	+ ANP + BNP + $\alpha$ -MHC $\leftrightarrow$ $\beta$ -MHC + ca $\alpha$ -actin
<b>NFATc4</b>	Développement embryonnaire Hypertrophie Survie ?	Doigt de zinc C-terminal	+ BNP
<b>SRF</b>	Développement embryonnaire Hypertrophie	Doigt de zinc C-terminal et région adjacente	+ ANP + ca $\alpha$ -actin + sk $\alpha$ -actin + sm 2 $\alpha$ -actin + c- <i>fos</i> + $\alpha$ -MHC + CPT-1 $\beta$ $\leftrightarrow$ BNP
<b>PEX1</b>	Hypertrophie Développement embryonnaire ?	Région C-terminale	+ ANP + ca $\alpha$ -actin + sk $\alpha$ -actin + $\beta$ -MHC
<b>c-<i>fos</i></b>	Hypertrophie ?	Région N-terminale	+ ANP + BNP
dHAND FOG-2 Nkx2.5 p300 RXR $\alpha$ Klf13	Collaboration principalement au niveau du développement embryonnaire		

**ANP**, peptide natriurétique auriculaire; **BNP**, peptide natriurétique de type B; **Ca**, cardiaque; **CPT**, carnitine palmitoyltransférase; **MHC**, chaîne lourde de myosine; **MEF**, myocyte enhancer factor; **NFATc**, facteur nucléaire des cellules-T-activées 4; **PEX1**, phenylephrin induced complex-1; **RXR**, récepteur X rétinoïde; **Sk**, squelettique; **Sm**, muscles lisses; **SRF**, facteur de réponse au sérum;

Akazawa et Komuro, 2003; McBride et al. 2003; Pikkarainen, Tokola et al. 2004; Debrus, Rahbani et al. 2005; Lavalée, Andelfinger et al. 2006



### Figure 5. Voies signalétiques impliquées dans l'hypertrophie cardiaque

Représentation schématisée des voies de signalisation cellulaires (—) illustrant l'activation des facteurs de transcription par modifications post traductionnelles (noir) et leurs interactions combinatoires (orange) pour la transcription des gènes cardiaques liés au programme génétique du remodelage ventriculaire (vert). Les voies non confirmées/hypothétiques sont illustrées en pointillés (…).

*CaM*, calmoduline; *ERK*, kinases du signal extracellulaire; *MEF*, myocyte enhancer factor; *NFATC*, facteur nucléaire des cellules-T-activées; *PEX1*, phenylephrin induced complex-1; *PI3K*, phosphatidylinositol-3 kinases; *PKC*, protéine kinase C; *SRF*, facteur de réponse au sérum

(image modifiée de Akazawa et Komuro, 2003)

### 1.5.2.1 Facteur de réponse au sérum (SRF)

Le facteur nucléaire SRF est un des membres fondateurs de la famille des facteurs de transcription MADS (*Mcm1* et *Arg80* chez la levure, *Agamous* et *Deficiens* chez les plantes et *SRF* chez les animaux) qui sont d'une grande importance au niveau développemental (Messenguy et Dubois 2003). SRF régule une variété de gènes associés à la croissance et/ou à la différenciation cellulaire, particulièrement au niveau des muscles squelettiques, lisses et cardiaques. SRF est aussi une cible nucléaire de la signalisation des MAPK et des petites protéines G tel que RhoA, notamment lors de la régulation de l'expression des gènes cytosquelettiques et de l'appareil contractile (Miano et al. 2007). La surexpression de SRF le cœur de souris transgéniques entraîne une cardiomyopathie hypertrophique accompagnée d'une insuffisance cardiaque (Zhang et al. 2001), indiquant un rôle potentiel pour SRF dans l'hypertrophie cardiaque pathologique.

L'association de SRF avec GATA4 ainsi que d'autres facteurs de transcription permet la réinduction d'un grand nombre de gènes embryonnaires impliqués dans l'hypertrophie cardiaque tels l'ANP, le BNP, l' $\alpha$ -SkA, l' $\alpha$ -MHC et la  $\beta$ -MHC (Morin et al. 2001 ; Nelson et al. 2005). Particulièrement, notre laboratoire a mis en évidence que les facteurs GATA4 et SRF forment un complexe transcriptionnel essentiel pour la réponse du promoteur de l'ANP face à une stimulation à l'ET-1. Effectivement, l'utilisation de dominants négatifs pour GATA4 et/ou SRF abroge la réponse à l'ET-1 et des données indiquent que la synergie GATA4-SRF serait d'autant plus forte face à l'activation de



certaines MAPK (Morin et al. 2001). De manière intéressante, SRF possède différentes isoformes provenant de l'épissage alternatif de son pré-ARNm, contribuant ainsi à la régulation de son activité. En effet, certaines isoformes de SRF joueraient un rôle important dans la modulation l'expression des gènes SRF-dépendants et contribueraient en partie à l'altération de l'expression des gènes conséquemment à la pathogenèse induite lors de la défaillance cardiaque (Belagulie et al. 1999 ; Davis et al. 2002).

Il est également connu que SRF est un cofacteur du facteur de transcription Elk-1, une protéine à domaine ETS (*E twenty six*) (Karim et al. 1990). Elk-1 est activé par les MAPK et collabore avec SRF et p300, un coactivateur ayant un rôle important dans la régulation des gènes reliés à la réponse au stress (Li et al. 2003). Conjointement, ces facteurs de transcription permettent l'expression des gènes précoces de la réponse hypertrophique comme *c-fos* (membre *activator protein-1*, AP-1) et d'autres gènes impliqués dans l'hypertrophie cardiaque (Aoyagi et Izumo 1993 ; Gupta et al. 1998)

#### 1.5.2.2 Facteur nucléaire de cellules-T activées (NFATc)

Les myocytes cardiaques contiennent quatre membres des protéines NFATc : NFATc1, NFATc2, NFATc3 et NFATc4. Tel que décrit précédemment, ces facteurs de transcription sont des protéines cytoplasmiques qui sont transportées vers le noyau en réponse à la stimulation engendrée par la mobilisation du calcium et l'action de la calcineurine (Rao et al. 1997). La forme active de la calcineurine interagit physiquement

avec les protéines NFATc, déphosphorylant ainsi plusieurs résidus sérine des domaines régulateurs de la partie N-terminal de la protéine. Ceci permettrait d'exposer la séquence de localisation nucléaire (SLN), résultant à la translocation des NFATc vers le noyau (Beals et al. 1997; Aramburu et al. 1998; Aramburu et al. 1999). Dans le noyau, les NFATc sont sous l'influence de différentes voies de signalisation, impliquant entre autres les MAPK, qui favorisent leur phosphorylation et leur exportation vers le cytoplasme (Wilkins et Molkenin, 2004).

L'implication de la signalisation de NFATc dans la régulation de l'hypertrophie des cardiomyocytes a été mise en évidence dans un modèle murin surexprimant NFATc4 au niveau du cœur, ce qui engendre une hypertrophie cardiaque sévère (Molkenin et al. 1998). De plus, les souris *KO* pour NFATc3 montrent, à long terme, une réduction significative de l'hypertrophie cardiaque dépendante de la calcineurine, bien que le *KO* de NFATc4 ne diminue pas la magnitude de l'hypertrophie dans les mêmes conditions (Wilkins et al. 2002). La délétion du gène NFATc3 dans les souris transgéniques a aussi permis d'établir que NFATc3 est nécessaire à la réponse hypertrophique induite par la surcharge de pression sanguine ou par l'Ang II, similairement aux souris *KO* pour la calcineurine A $\beta$ . Ceci souligne d'autant plus le rôle activateur de NFATc3 dans les voies de la calcineurine reliées à l'hypertrophie cardiaque (Bueno et al. 2002b ; Wilkins et al. 2002). Les protéines NFATc, de concert avec différents cofacteurs, sont d'importants effecteurs pour la régulation de BNP,  $\beta$ -MHC, MCIP1 (*myocyte-enriched calcineurin-interacting protein 1*) et ET-1 (Wilkins et al. 2002). Afin de stabiliser sa liaison avec l'ADN, NFATc

interagit avec d'autres facteurs de transcription comme GATA4, MEF2 et AP-1, assurant le contrôle de l'expression des gènes lors de la réponse hypertrophique (Tu et al. 2007 ; Bleaser et al. 2000).

#### 1.5.2.3 Facteur d'amélioration myocytaire 2 (MEF2)

La famille de facteurs de transcription MEF2, notamment le membre MEF2-C, est impliquée à la fois dans la régulation des gènes du développement cardiaque, mais aussi dans la régulation transcriptionnelle des cœurs postnataux (Dodou et al. 2004). Chez la souris, le *KO* de MEF2-C altère particulièrement la myogenèse et la formation du ventricule droit durant l'embryogenèse, affectant aussi l'expression de plusieurs gènes cardiaques important lors du développement. Les séquences de liaison à l'ADN de MEF2 ont été identifiées dans les promoteurs de plusieurs gènes cardiaques comme  $\alpha$ -MHC, MLC1/3 et *2v* (*myosin light chain*), Sk- $\alpha$ , troponine cardiaque T/C et I, etc. (Akazawa et Komuro, 2003). MEF2 est impliqué dans la régulation des gènes inductibles lors de la réponse hypertrophique des cardiomyocytes et serait activé par les voies de signalisation de p38 MAPK et ERK (Yang et al, 1998 ; Kolodziejczyk et al 1999). Les facteurs MEF2 sont d'importants effecteurs cibles en aval des voies de signalisation du calcium. En effet, des études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que MEF2 est phosphorylé et activé par les kinases calmoduline (CaMK) lors de l'hypertrophie cardiaque (Blaeser et al. 2000 ; Passier et al. 2000). Cette interaction ferait partie d'une voie parallèle à la voie calcineurine/NFATc

(Passier et al. 2000) et serait médiée particulièrement par les répresseurs transcriptionnels, les histones déacétylases (HDAC) (Miska et al. 1999).

Durant la différenciation des muscles squelettiques, il a été trouvé que MEF2 est activé via la voie PI3K-AKT induite par le facteur de croissance IGF-1 (Tamir et Bengal, 2000 ; Xu et Wu, 2000). Puisque les souris transgéniques qui surexpriment une forme constitutivement active de PI3K ou d'AKT exposent un phénotype d'hypertrophie cardiaque physiologique (Shioi et al. 2000 ; Shioi et al. 2002), hypothétiquement, il serait possible de croire que MEF2 soit impliqué dans ces mêmes voies hypertrophiques (Akazawa et Komuro, 2003). En plus de lier l'ADN via leurs sites spécifiques, les facteurs MEF2 peuvent être recrutés aux promoteurs cibles en collaboration avec les facteurs GATA. Effectivement, MEF2 et GATA4 activent de manière synergique la transcription de plusieurs gènes cardiaques exprimés durant l'hypertrophie tels l'ANP, le BNP, l' $\alpha$ -MHC et l'actine cardiaque ( $\alpha$ Ca) suggérant ainsi un rôle coopératif de ces deux facteurs de transcription dans la régulation du programme génique associé à l'hypertrophie cardiaque (Morin et al. 2000; Akazawa et Komuro, 2003).

#### 1.5.2.4 Le complexe protéique PERE (PEX1/Zfp260): nouveau collaborateur de GATA4

Notre laboratoire a précédemment identifié un élément de réponse PERE (*Phenylephrine response element*) sur le promoteur de l'ANP, nécessaire pour son activation transcriptionnelle suite à une stimulation  $\alpha_1$ -adrénergique (Ardati et Nemer,

1993). Une protéine nucléaire pouvant lier le site PERE, appelée PEX1 (*phenylephrin induced complex-1*) a été isolée par clonage moléculaire (Debrus et al. 2005). La protéine PEX1, composée de treize doigts de zinc, est un nouveau facteur de transcription de la famille *Krüppel* et serait l'homologue de *Zfp260* (*zinc finger protein*) chez l'humain (Debrus et al. 2005). L'expression de PEX1 est très abondante dans le cœur, tant lors du développement embryonnaire que postnatal, et corrèle avec la prolifération et/ou la réponse hypertrophique des cellules cardiaques. Nos résultats démontrent que la stimulation  $\alpha_1$ -adrénergique de cardiomyocytes ventriculaires avec la PE augmente les niveaux de l'ARNm de PEX1, correspondant également avec l'augmentation de l'expression de l'ANP (Debrus et al. 2005). Aussi, des expériences effectuées avec des rats spontanément hypertendus (SHR), dans lesquels l'hyperactivité des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques est bien documentée (Reja et al. 2002), démontrent que l'expression de PEX1 est associée à la haute pression (Debrus et al. 2005). Ainsi, ces expériences *in vitro* et *in vivo* prouvent que l'expression de PEX1 dans le cœur est régulée par les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques et suggèrent qu'elle est associée à une réponse plutôt de nature pathologique.

Plusieurs indices permettent de supposer que le facteur de transcription PEX1 serait impliqué dans le développement de l'hypertrophie cardiaque. Premièrement, l'expression de PEX1 est significativement augmentée dans les cœurs hypertrophiés de souris transgéniques exprimant une forme constitutivement active de  $AT_1R$  (Debrus et al. 2005). De plus, l'utilisation d'un adénovirus antisens-PEX1 nous a permis de contrecarrer la réorganisation cytosquelettique des cardiomyocytes stimulés par les agonistes hypertrophiques PE et ET-1

(Debrus et al. 2005 ; Komati et al. en cours), semblablement aux résultats obtenus grâce à l'utilisation de l'adénovirus antisens-GATA4 (Charron et al. 2001). Nous avons aussi démontré que PEX1 collabore avec les facteurs de transcription GATA4 et SRF, activant de manière synergique le promoteur de l'ANP lors de la réponse à la PE et l'ET-1 (Debrus et al. 2005 ; Komati et al. en cours). Le complexe transcriptionnel PEX1/SRF/GATA4 serait également responsable de l'activation d'autres gènes impliqués dans la réponse hypertrophique soit  $\beta$ -MHC,  $\alpha$ Ca et  $\alpha$ -SkA (Debrus et al. 2005).

Malgré les nombreuses études sur les facteurs transcriptionnels cardiaques et sur leurs interactions combinatoires dans la modulation du programme génétique de l'hypertrophie, la compréhension des mécanismes moléculaires qui y sont reliés reste encore incomplète. Ces régulateurs des gènes cardiaques représentent une cible thérapeutique potentielle pour plusieurs maladies du cœur, mais la complexité des interactions nucléaires découlant des cascades signalétiques intracellulaires est un obstacle d'envergure pour la recherche. La réponse adaptative du cœur face à différents stimuli pathologiques est associée, en plus de l'hypertrophie compensatoire, à la mort des cardiomyocytes, entraînant des dommages irréversibles qui affecte la fonction cardiaque et l'homéostasie du système cardiovasculaire.

### 1.6.1 Apoptose et maladies cardiaques

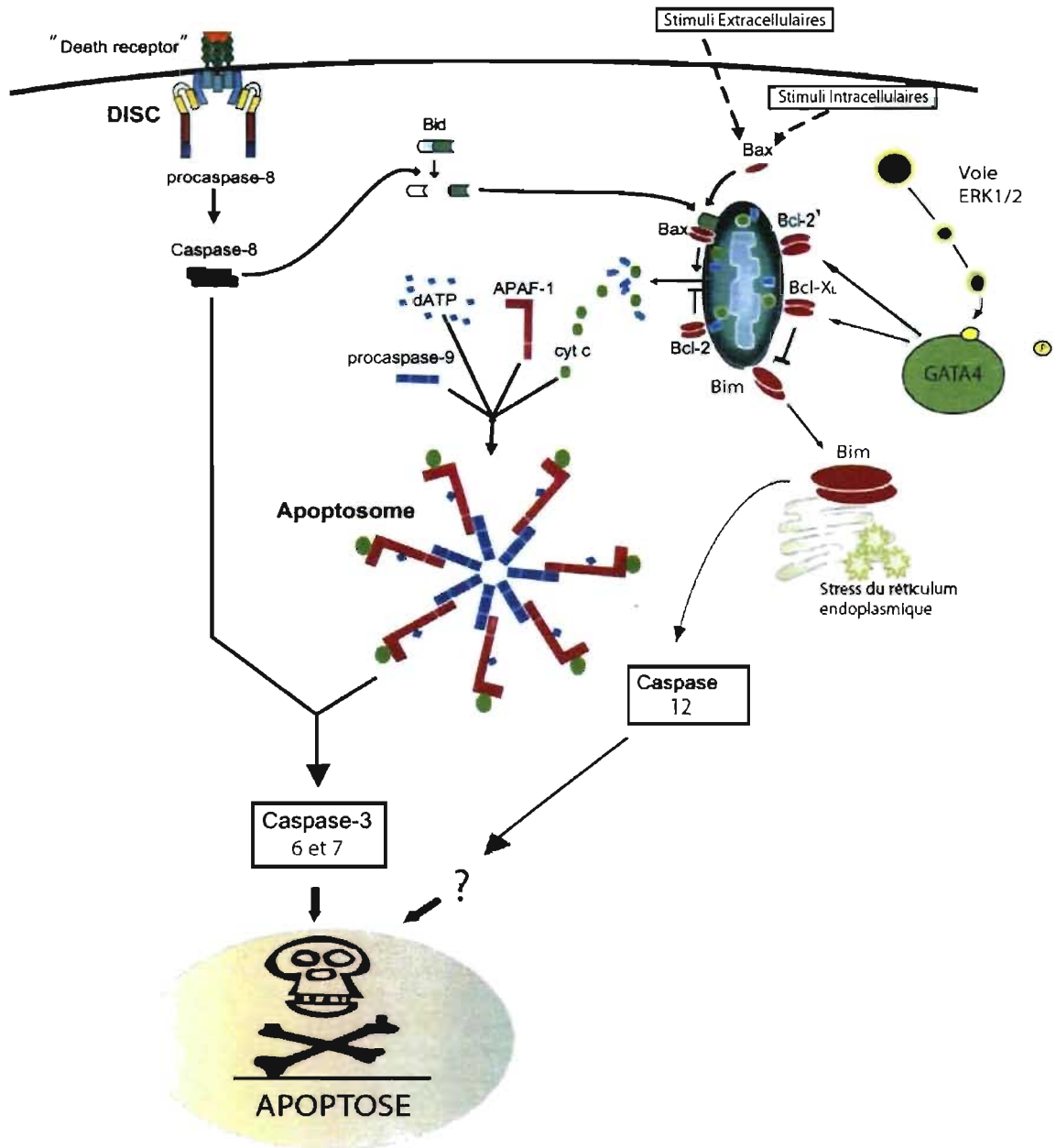
*A priori*, les cardiomyocytes adultes ne prolifèrent pas, donc leur perte, essentiellement par apoptose (ou mort cellulaire programmée), résulte en l'affaiblissement progressif du cœur et ultimement à l'insuffisance cardiaque (Kang et Izumo, 2000). Plusieurs études suggèrent que les cascades signalétiques contrôlant la croissance des myocytes dans le cœur adulte seraient également impliquées dans la régulation de leur survie (Van Empel et De Windt, 2004). Plusieurs stimuli induisent l'apoptose des cardiomyocytes dont l'ischémie, les cytokines proinflammatoires et les traitements antitumoraux (Clerk et al. 2003 ; Crow et al. 2004). Jusqu'à maintenant, les mécanismes qui régulent la survie/l'apoptose des cardiomyocytes différenciés restent très peu compris. Il est connu que l'apoptose est induite ou inhibée par différents stimuli extra et intracellulaire qui activent un ensemble de protéases connues sous le nom de caspases (*cysteine-dependante aspartate-directed protease*).

À ce jour, quatorze membres de la famille des caspases ont été identifiés chez les mammifères (Clerk et al. 2003). Elles peuvent être divisées, selon leur spécificité de substrat, en différentes sous-familles fonctionnelles (Nicholson 1999). Le groupe I inclut les caspases-1, -4, -5, -11 et -13 qui réguleraient la maturation des cytokines et l'inflammation. Les caspases apoptotiques (groupe II et III), elles, sont impliquées dans les cascades protéolytiques de manière hiérarchique. Les activateurs du groupe III (caspases -2, -8, -9, -10, -12) agissent en amont des caspases effectrices du groupe II (caspases -3, -6, -7), qui

sont responsables du clivage de la phase finale de dégradation lors de la mort cellulaire apoptotique (Fauvel et al. 2001 ; Clerk et al. 2003). L'activation de ces protéines, et des cascades apoptotiques est déclenchée soit par des récepteurs de surface (*death receptors*) ou par le stress cellulaire (figure 6 ; Aries et al. 2004).

La signalisation reliée aux protéines  $G\alpha_q$  induit un *continuum* de réponses, partant de l'hypertrophie menant à l'insuffisance cardiaque décompensée, selon l'augmentation de la force du stimulus ou son maintien sur un intervalle de temps prolongé. Des études ont démontré qu'une faible augmentation de l'expression de  $G\alpha_q$  induit l'apparition d'une hypertrophie stable, mais qu'une stimulation intense du niveau d'expression de  $G\alpha_q$ , induit une cardiomyopathie dilatée avec décompensation fonctionnelle et l'apoptose des cardiomyocytes (D'Angelo et al. 1997 ; Mende et al. 1999). Ce phénomène permet de constater que l'hypertrophie pathologique et l'apoptose représentent différentes phases du même processus initié par un signal biochimique activé par  $G\alpha_q$ . De nouvelles lignes de recherches suggèrent que certaines isoformes de PKC, particulièrement PKC $\delta$  et  $-\epsilon$ , seraient bien positionnées pour agir en tant que commutateurs moléculaires aux points nodaux des cascades signalétiques menant à l'hypertrophie et à l'apoptose des cardiomyocytes (Sabri et Steinberg, 2003). Bien qu'il a été mentionné précédemment que l'apport de PKC $\delta$  serait bénéfique dans l'hypertrophie cardiaque, certaines études démontrent que l'inhibition de cette isoforme bloque l'apoptose *in vitro* et *in vivo* (Shizukuda et al. 2002 ; Murriel et al. 2003). De plus, la surexpression adénovirale d'une forme constitutivement active de PKC $\delta$





**Figure 6. Voies reliées à l'apoptose et la survie cellulaire dans les cardiomyocytes**

Schématisation des mécanismes d'action de certaines protéines impliquées dans l'apoptose des cardiomyocytes. Les voies reliées au stress du réticulum endoplasmique (RE) sont encore nébuleuses, mais les connaissances actuelles suggèrent que GATA4 serait régulateur de la cardioprotection via l'activation de Bcl-X<sub>L</sub>, empêchant ainsi la translocation de Bim au RE et inactivant subséquentement la voie caspase-12.

(image modifiée de Crow et al. 2004; Morishima et al. 2004)

induit l'apoptose dans les myocytes cardiaques, tandis que PKC $\epsilon$  n'entraîne pas cette réponse (Heidkamp et al. 2001). Plusieurs indices suggèrent effectivement que l'isoforme PKC $\epsilon$  posséderait un rôle anti-apoptotique (Gray et al. 1997), protégeant les myocytes de la mort cellulaire via différentes voies impliquant l'activation des voies cardioprotectrices ERK et/ou AKT, ainsi que la modulation des protéines de la famille Bcl-2 (Baines et Molkentin, 2004). Toutefois, les mécanismes exacts qui englobent l'interaction des PKC dans les processus apoptotiques des cardiomyocytes sont complexes et nécessitent toujours une meilleure élucidation.

Le réticulum endoplasmique (RE) possède un rôle fondamental pour la synthèse des protéines et leurs modifications post-traductionnelles (Kaufman, 1999). Les fonctions du RE sont affectées par différents stimuli extra- et intracellulaires, appelés *stress du RE*, incluant l'inhibition de la glycosylation et la réduction des ponts disulfures au niveau des protéines, l'épuisement du calcium de la lumière du RE, ainsi que l'expression de protéines mutées dans le RE. Sous des conditions de stress du RE, les protéines en voie de maturation peuvent s'accumuler dans la lumière du RE, ce qui induit généralement des activités cellulaires conflictuelles; la survie et l'apoptose (Kadowaki et al. 2004). Cette accumulation de protéines dans le RE active un mécanisme d'autoprotection cellulaire appelé *réponse au stress du RE*, afin de permettre aux cellules de survivre à cette condition. Cette réponse consiste en trois mécanismes distincts : l'atténuation traductionnelle des protéines pour éviter l'accumulation (Harding et al. 1999), l'activation de gènes de protéines chaperonnes du RE (Gething et Sambrook, 1992) et la dégradation associée au RE (ERAD) pour réduire

le stress et restaurer l'intégrité du RE (Mori, 2000). Lorsque ces réponses adaptatives ne sont pas suffisantes pour éliminer le stress du RE, les cellules déclenchent l'apoptose. Plusieurs molécules sont reliées à l'activation de l'apoptose associé au stress du RE, incluant entre autres les caspases-12, Bak/Bax et les cascades des MAPK (Nakagawa et al. 2000 ; Scorrano et al. 2003 ; Wei et al. 2001 ; Nishitoh et al. 2002).

#### **1.6.1.1 Gènes *pro-apoptotiques* et *anti-apoptotiques***

Il existe de nombreuses protéines régulatrices de l'apoptose et l'identification du rôle de ces molécules dans la survie cellulaire est importante pour la compréhension des mécanismes apoptotiques (Van Empel et De Windt, 2004). Un des gènes impliqué dans la survie cellulaire les plus étudiés est Bcl-2, le membre fondateur d'une famille grandissante de gènes participant au contrôle de l'apoptose. La famille Bcl-2 contient des membres à la fois pro-apoptotiques (*e.g.* Bax, Bak, Bid, Bim, Bnip3, Bnip3L (Nix), Bcl-6, Bad, Bik et Bok) et anti-apoptotiques (*e.g.* Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W, Bfl-1 et Mcl-1) qui favorisent l'apoptose ou la survie cellulaire respectivement (Baines et Molkentin, 2005). Les membres de la famille Bcl-2 possèdent l'étonnante capacité de dimériser entre eux. Par exemple, les pro-apoptotique Bad et Bax peuvent dimériser avec Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub>, et leur surexpression contre l'effet anti-apoptotique des deux protéines. Les mécanismes exacts impliqués dans l'activation des protéines de la famille Bcl-2 sont encore bien sombres, mais dans les situations rapportées jusqu'à ce jour, la phosphorylation semble être inhibitrice ou activatrice des fonctions pro- ou anti-apoptotique, dépendamment de la protéine (Baines et

Molkentin, 2005). Par exemple, la phosphorylation de Bcl-2 semble inhiber sa fonction anti-apoptotique, tandis que la phosphorylation de Bad empêcherait sa liaison avec Bcl- $X_L$ , bloquant ainsi sa fonction pro-apoptotique (Petros et al. 2004). Les protéines pro- et anti-apoptotiques interagissent ainsi à la surface mitochondriale pour réguler la sortie du cytochrome C (cyt C) par un mécanisme qui est encore sous débat (figure 6). Si les pro-apoptotiques l'emportent, un alignement de molécules est évacué du compartiment mitochondrial. Le cyt C relâché s'associe avec APaf-1 (*apoptosis protease activating factor-1*) et les procaspases-9 (et possiblement d'autres protéines) pour la formation de l'apoptosome et l'activation éventuelle des caspase-3, -6 et -7 (figure 6 ; Van Empel et De Windt, 2004). Des études ont démontré que Bax et Bak agissent dans le RE comme une passerelle essentielle de l'apoptose induite par le stress du RE via le maintien de l'homéostasie calcique du RE (Scorrano et al. 2003). Plusieurs recherches sont encore requises pour l'identification des kinases et des phosphatases qui régulent l'activité des protéines pro- et anti-apoptotiques, les voies de signalisation qui modulent ces enzymes et le rôle des événements signalétiques dans le contrôle de la survie cellulaire en réponse à différents ligands extracellulaires.

Dans le cœur, les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl- $X_L$  sont grandement étudiées pour la compréhension des mécanismes de cardioprotection et possèdent un grand potentiel thérapeutique pour les maladies cardiaques. La modulation de l'activité de ces protéines est grandement régulée par leur phosphorylation, mais également par leur régulation transcriptionnelle. Comme il a été mentionné dans une section précédente, la

majorité des études sur les cardiomyocytes stipule que la signalisation associée aux MAPK p38 serait étiquetée pro-apoptotique. Par exemple, un modèle transgénique, exprimant un dominant négatif de p38 $\alpha$ , augmente fortement l'expression de Bcl-2 (Kaiser et al. 2004) ce qui suggère que l'inhibition de la voie p38 est associée à l'augmentation des niveaux de Bcl-2. Ainsi, en plus de favoriser l'inactivation de Bcl-2 par phosphorylation, la voie p38 participerait à la régulation de son expression. À ce jour, très peu de données sont disponibles sur les facteurs de transcription qui régulent l'activité de Bcl-2 dans le cœur, toutefois, GATA4 est reconnu comme un activateur de l'expression de Bcl-2 de manière similaire à Bcl-X<sub>L</sub> (Aries et al. 2004 ; Kobayashi et al. 2006).

Dans le contexte d'ischémie/reperfusion, plusieurs agonistes agissent comme cardioprotecteurs, *e.g.* les facteurs de croissance IGF-1 et HGF (*hepatocyte growth factor*), l'ET-1 ainsi que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'Ang II, possiblement via l'induction de Bcl-X<sub>L</sub> (Huang et al. 2003). Il existe deux formes de la protéine Bcl-X, la forme longue active (L) et courte inactive (S). De manière intéressante, des travaux démontrent que les niveaux de la protéine anti-apoptotique Bcl-X<sub>L</sub> augmentent particulièrement au cours de la détérioration du ventricule gauche, lors de la transition d'une surcharge de pression sanguine vers la défaillance cardiaque. Plusieurs indices portent à croire que Bcl-X<sub>L</sub> fait partie de la réponse du programme de survie cellulaire, lequel est enclenché secondairement lors de la dilatation cardiaque (Zhang et al. 2005). Pendant le processus du remodelage cardiaque accompagné de la dilatation graduelle du ventricule gauche et la dysfonction myocardique subséquente, plusieurs gènes sont régulés à la hausse,

incluant le facteur de croissance IGF-1 (Haq et al. 2001). Il a été démontré que l'IGF-1 possède des effets cytoprotecteurs par la régulation préférentielle de l'expression de Bcl-X<sub>L</sub> et l'atténuation de l'expression de Bax, ainsi qu'en promouvant la croissance cardiaque et en améliorant la contractilité ventriculaire (Yamamura et al. 2001). Comme mentionné précédemment, il est connu que le facteur de croissance IGF-1 est un activateur des voies PI3K/AKT dans les cardiomyocytes et il serait possible que, dans certains contextes, ces voies soient modulatrices des protéines de la famille Bcl-2 (Dom II et Force, 2005 ; Raphael et al. 2006). Des études récentes ont démontré que l'activation des voies de phosphorylation ERK dans les myocytes cardiaques pouvait également procurer une protection contre l'apoptose, via l'implication transcriptionnelle directe de GATA4 et l'activation subséquente de l'expression de Bcl-X<sub>L</sub>.

#### **1.6.1.2 *GATA4* : un facteur cardioprotecteur**

Dans les cardiomyocytes adultes, la progression du cycle cellulaire est efficacement bloquée, ce qui souligne la valeur précieuse de ces cellules pour la fonction cardiaque et l'importance d'une compréhension aiguisée des mécanismes cardioprotecteurs endogènes dans la survie cardiomyocytaire. Nos travaux précédents ont permis de déterminer que GATA4 représente un facteur de transcription essentiel pour la différenciation et la survie des précurseurs des cardiomyocytes (Grepin et al. 1997). Effectivement, en absence de GATA4, les cellules sont bloquées au stade des cardioblastes et le programme apoptotique est activé probablement pour éliminer les cellules en arrêt développemental. Plus

récemment, d'autres études de notre laboratoire ont permis d'identifier le rôle cardioprotecteur de GATA4. L'étude du promoteur de Bcl-X<sub>L</sub> a permis de répertorier deux sites consensus GATA, conservés chez la souris et l'humain (voir section 3.1.4, figure 15A). Ainsi, le rôle de GATA4 dans la survie cardiomyocytaire impliquerait la régulation directe du module apoptotique via l'activation transcriptionnelle en amont de Bcl-X<sub>L</sub> (Aries et al. 2004). Nous avons trouvé que la surexpression de GATA4 dans les cardiomyocytes contrecarre l'induction de l'apoptose lors de traitement avec la doxorubicine (Arie et al. 2004), une anthracycline utilisée en chimiothérapie, qui est reconnue pour induire des cardiomyopathies par l'altération de la survie des myocytes et de la réponse adaptative du cœur (Singal et Iliskovic, 1998). En effet, les stimuli apoptotiques comme les anthracyclines ou l'oxyde nitrique entraîne la réduction de l'expression de GATA4 et subséquemment de Bcl-X<sub>L</sub>, supprimant ainsi le signal anti-apoptotique.

L'utilisation d'une approche similaire a permis d'identifier que l'expression de la protéine Bcl-2 est également régulée par GATA4. Similairement à nos travaux, l'équipe de Kobayashi et al. (2006) a montré que la doxorubicine entraîne la réduction de l'expression de GATA4 et de Bcl-X<sub>L</sub>, mais aussi de Bcl-2 dans les cardiomyocytes. De manière consistante, la surexpression adénovirale de GATA4 prévient la réduction de l'expression de Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub>. De plus, le *knock-down* de GATA4 médié par des ARNsi dans des cardiomyocytes diminue significativement les niveaux des ARNm et de la protéine Bcl-2. La surexpression de GATA4 dans le cœur de souris transgéniques, ainsi que dans les cardiomyocytes *in vitro*, entraîne aussi l'augmentation significative du niveau d'expression

basal de Bcl-2 (Kobayashi et al. 2006). Somme toute, le rôle bénéfique de GATA4 dans la cardioprotection est irréfutable. Cependant, son action précise dans les mécanismes de la régulation du programme génétique associé à l'apoptose est encore peu connu, nécessitant donc un approfondissement des recherches à ce sujet.

Afin de mieux cerner le rôle de GATA4 dans la survie *in vivo*, une équipe de recherche a effectué le croisement de souris GATA4-*loxP* (GATA4<sup>FL/FL</sup>) avec des souris sous l'influence d'un promoteur  $\beta$ -MHC/CRE (*cyclization recombinase gene*) produisant une lignée de souris transgéniques viables jusqu'à l'âge adulte, malgré une perte de 95% de la protéine GATA4 (Oka et al. 2006). Ces souris *KO* partiel de GATA4 spécifiquement au cœur montrent une dilatation ventriculaire de base et une réduction progressive de la performance cardiaque fonctionnelle selon l'âge, qui impliquerait la mort cellulaire. En effet, des analyses TUNEL ont été effectuées sur les cœurs des embryons et des adultes des souris transgéniques, montrant un niveau basal de cellules apoptotique plus élevé que dans les groupes contrôles. De plus, l'induction d'une surcharge de pression par constriction aortique transverse entraîne une augmentation d'autant plus grande des cellules TUNEL positive dans les souris *KO*. Aussi, l'expression de l'effecteur anti-apoptotique PKC $\epsilon$  s'est avérée réduite dans les souris *KO*, accompagnée de l'activation des protéines pro-apoptotiques caspase-12 et Bcl-6 (Oka et al. 2006). La perte progressive des cardiomyocytes par apoptose est accompagnée de la modification de l'expression génique. Toutes deux observées dans le coeur des souris *KO* partiel de GATA4, ces altérations



contribuent à la décompensation cardiaque progressive obtenue dans ce modèle, ce qui attribue à GATA4 un rôle nécessaire dans la viabilité des myocytes cardiaques.

L'ensemble de ces résultats représente une avancée importante quant à l'accumulation des connaissances sur la survie des cardiomyocytes, qui sont, jusqu'à ce jour, trop peu nombreuses pour une compréhension précise et éclairée des mécanismes cardioprotecteurs. À travers cette grande complexité, plusieurs groupes de recherche tentent d'établir la liaison entre les mécanismes moléculaires qui régulent l'apoptose et le remodelage pathologique, qui sont associés à la défaillance cardiaque. Cependant, il est d'une importance cruciale d'établir une fine dichotomie entre l'hypertrophie pathologique et physiologique du cœur. De manière consistante avec cette revue de littérature, les mécanismes impliqués dans la modulation de la transcription génique contrôlée par GATA4 pourraient éventuellement fournir une stratégie effective contre la défaillance cardiaque et certaines maladies de nature cardiovasculaires.

## 1.7 Description du projet

L'approfondissement des connaissances des mécanismes moléculaires impliqués dans l'expression génétique du cœur normal et pathologique est essentiel pour la prévention, le diagnostic et le traitement des maladies cardiaques. Le facteur de transcription GATA4 est un régulateur clé du développement cardiaque où il est également essentiel à la réponse adaptative du cœur au stress qui implique l'hypertrophie des cardiomyocytes de même que leur survie. GATA4 représente à la fois une cible et un médiateur nucléaire de plusieurs voies de signalisation impliquées dans la fonction cardiaque. La présente étude consiste à déterminer les domaines spécifiques de GATA4 requis d'une part pour la réorganisation cytosquelettique et l'hypertrophie des cardiomyocytes et d'autre part, ceux impliqués dans les voies de survie cellulaire. Différents mutants de la protéine GATA4 ont été clonés dans des vecteurs adénoviraux pour permettre le transfert génique dans des cultures primaires de cardiomyocytes. Les constructions virales sont constituées de mutations ponctuelles et d'une délétion impliquant divers sites de phosphorylation de la protéine GATA4. Le site de phosphorylation sérine 105 (S105), qui fait partie d'un motif PXSP de phosphorylation par les MAPK, et la phénylalanine 108 (F108), qui représente, elle, un site potentiel de liaison des MAPK, ont été ciblés. Ainsi, l'effet des mutations S105 et F108, de même que la délétion du domaine de transactivation N-terminal, sur la capacité de GATA4 d'induire l'hypertrophie et/ou de protéger les cellules contre l'apoptose, a été examiné. La détermination des domaines de GATA4 impliqués dans la croissance versus la survie des cardiomyocytes représente une étape importante de l'analyse des mécanismes moléculaires

reliés à la régulation du destin des cellules cardiaques. De plus, une analyse complémentaire concernant le rôle de PEX1 en tant que cofacteur de GATA4 a été effectuée dans cette même étude. En accord avec les résultats obtenus précédemment par notre laboratoire, nous avons pu évaluer les effets de la surexpression de PEX1 sur la réponse hypertrophique des cardiomyocytes. Une comparaison de la surexpression de PEX1 et de GATA4 dans les myocytes cardiaques a permis d'établir un modèle hypothétique quant à leur rôle respectif dans l'hypertrophie.

L'identification des effecteurs transcriptionnels reliés à la réponse hypertrophique physiologique et pathologique du cœur est nécessaire pour déterminer les mécanismes régissant ces deux types d'hypertrophie, et afin de mieux comprendre les voies signalétiques impliquées dans l'une et dans l'autre. Les résultats obtenus pourraient mener éventuellement au développement de nouvelles approches préventives ou thérapeutiques pour contrer la dysfonction cardiaque.

## CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODOLOGIE

### 2.1 Préparation des adénovirus

#### 2.1.1 Construction des vecteurs

La construction des adénovirus recombinants a été effectuée en utilisant le système de recombinaison homologue *Ad-Easy (Stratagene)*. Il s'agit d'adénovirus humains de sérotype 5 dont la réplication est rendue défectueuse par la délétion des exons 1 et 3 du génome viral. Les vecteurs adénoviraux permettent la transduction d'une grande variété de cellules, résultant en la surexpression transitoire de gènes exogènes, et ce, à de hauts niveaux. Les ADNc (ADN complémentaires) de GATA4 WT ainsi que des mutants G4-S105A et G4<sub>(201-440)</sub>, récupérés par digestion *Hind III* et *EcoR V* à partir de vecteurs pCS2<sup>+</sup>-GATA4(WT), -S105A et -G4<sub>(201-440)</sub>, ont été sous-clonés dans le vecteur navette (*pShuttle-CMV*). L'ADNc de PEX1, contenu dans le vecteur pCGN, a été sous-cloné dans *pShuttle-CMV* par digestion aux sites *Kpn I* et *BamH I*. Le plasmide pCGN contenant le mutant G4-F108A, a servi de matrice pour l'amplification de l'ADNc de G4-F108A, par PCR (*polymerase chain reaction*). Les paires d'amorces qui ont été utilisées sont décrites dans le tableau IV, dans lesquelles des sites de restriction pour les endonucléases *Xho I* et *Hind III* ont été rajoutés, afin de permettre l'insertion dans le plasmide *pShuttle-CMV*. Toutes les constructions possèdent la séquence étiquette HA en N-terminal, faisant partie de la séquence codante.

Les sous-clonages dans *pShuttle-CMV* ont été effectués dans des bactéries compétentes *E.coli* (*XL-1 blue*) en utilisant la *T4 DNA ligase* (*Invitrogen*) et en utilisant les ensembles d'extraction et de purification d'ADN (*minipreps*, *Qiagen*). Tous les sous-clonages ont été subséquemment séquencés pour la vérification de l'intégrité des séquences codantes insérées. Les vecteurs ont ensuite été rendus linéaires par digestion *Pme I*, puis cotransformés dans des bactéries *E. coli* électrocompétentes (BJ5183) contenant la majeure partie du génome viral *pAdEasy*. Les recombinants sont sélectionnés par résistance à la kanamycine et la recombinaison est confirmée par la migration sur gel d'agarose 1% des ADN digérés par l'endonucléase de restriction *Pac I*. L'ADN des recombinants est amplifié, extrait et purifié en utilisant les bactéries ultracompetentes *E.coli* (*XL-10 gold*) pour les *maxipreps* (*Qiagen*) et est subséquemment linéarisé de nouveau (par *Pac I*) pour la transfection dans des cellules *HEK293* (*Ad293*), permettant ainsi l'empaquetage et la production des adénovirus d'intérêt.

### **2.1.2 Production virale**

Les cellules *HEK293* sontensemencées au nombre de 100 000 dans des flacons T-25 et cultivées dans 5 mL de milieu modifié Dulbecco's Eagle's (DMEM), 10% de sérum bovin foetal (FBS, *Invitrogene*), 1% PenStrep et pyruvate sodique 1X (*Gibco*). Les transfusions sont effectuées à 50-70% de confluence cellulaire par lipofectamine (*Invitrogen*) en volume minimal d'*OptiMem* (*Gibco*) pour une période de 4-12 heures. Pour 5 µg d'ADN transfecté, 24 µL de

lipofectamine sont utilisés dans un volume de 4 mL. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C en présence de 5% CO<sub>2</sub>. L'étape de génération des adénovirus nécessite habituellement 7 à 12 jours selon l'efficacité de transfection. Les cellules présentant un phénotype d'infection (aspect globuleux et brillant) sont récoltées et conservées à -80°C. Une série de 3 gels/dégels est effectuée pour libérer le virus des cellules. L'échantillon est par la suite centrifugé à 3 000rpm pendant 15 minutes à 4°C et le surnageant est filtré sur une membrane *Millipore* à 0,22 µm. Les adénovirus ainsi produits sont amplifiés afin d'obtenir une grande quantité de virus, ceci se fait de manière progressive en cultivant les cellules *HEK293* infectées dans des flacons de différentes tailles : 1X T-25, 2X T-175 et 50X T-175. Les cellules sontensemencées au nombre de 300 000 dans les T-25 et de 2 millions dans les T-175 ( $\approx 12\,000$  cellules/cm<sup>2</sup>), puis les cultures sont conservées de 1 à 3 jours post-infection, jusqu'à l'apparition du phénotype d'infection. Les cellules sont récoltées et procédées comme mentionné ci-haut.

### **2.1.3 Purification des adénovirus**

Pour purifier le virus, le lysat cellulaire est passé 4 fois dans une seringue à aiguille 18G pour cisailer l'ADN génomique et est filtré sur membrane 5µm. Dans des tubes SW28, on prépare un gradient de CsCl (dans Tris-HCl 10mM pH 8,0/MgCl<sub>2</sub> 2mM) de 1,25g/mL et 1,35g/mL avec une seringue reliée à une canule. Les extraits cellulaires sont déposés à la surface du gradient. Les tubes sont équilibrés avec du milieu de culture avant d'être ultracentrifugés à 25 000 rpm et à 4°C durant 16 à 20 h sans frein. On obtient ensuite différentes bandes bleuâtres,

situées au centre des tubes. On récolte, dans un volume minimal, la bande la plus épaisse contenant les virus, qui est située entre les deux couches de CsCl. Une fois transféré dans des tubes SW55, l'échantillon est équilibré avec un mélange 1:1 des deux solutions de CsCl pour une ultracentrifugation à 32 500 rpm et à 4°C durant 16 à 20 h sans frein. La seule bande présente, qui contient le virus, est récoltée dans un volume minimal ( $\approx 2$  mL). On effectue ensuite deux dialyses de deux heures chacune à 4°C contre 2 L de tampon de dialyse (Tris-HCl 10mM pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 2mM et sucrose 4%) en utilisant une membrane *Spectra/Por* 10mm (0,32mL/cm). La solution virale est récoltée et filtrée sur membrane 0,22  $\mu$ m puis aliquotée pour la conservation à -80°C. Le titre viral est obtenu par dilution limite tel que décrit par Nyberg-Hoffman et al (1997) et est mesuré en pfu/mL (*plaque forming unit/mL*).

## **2.2 Cultures primaires de cardiomyocyte**

### **2.2.1 Préparation des cardiomyocytes**

Les cultures primaires de myocytes cardiaques sont préparées à partir de cœurs de rats néonataux *Sprague-Dawley* âgés de 4 jours. Les ventricules de 80-90 cœurs (8 portées) sont digérés 4 fois pendant 15 minutes dans du milieu Joklik MEM (Sigma) avec 220U/mL de collagénase (*Worthington Biochemical Corp.*). La digestion enzymatique est arrêtée avec du FBS (*Invitrogene*) et les tissus non digérés sont retirés par filtration sur maille de nylon à porosité de 100  $\mu$ m. Les cardiomyocytes sont purifiés par deux mises en culture transitoires de 30 minutes afin de retirer les cellules non myocytaires résiduelles par adhérence différentielle.

Les myocytes (cellules non adhérentes) sont ensuite mis en culture dans des pétris pour culture primaire (Primeria, Falcon) dans du DMEM, FBS 10 %, PenStrep 1% pour une période de 16-24h à 37°C à 5% CO<sub>2</sub>. Pour les extraits cellulaires et les ARNm, les cellules sontensemencées à 2 millions dans les pétris de 100mm de diamètre et à 180 000 dans des plaques de 12 puits contenant des lamelles pour les expériences d'immunofluorescence et de TUNEL. Après environ 20h, le milieu est changé pour un milieu sans sérum (SF) pour les infections sans traitement doxorubicine et sans sérum/sans hormone (SFHF) pour les traitements à la doxorubicine (tableau II). Le milieu SFHF est un milieu contenant des vitamines et des antioxydants permettant d'éviter un effet trop cytotoxique sur les cardiomyocytes lors de l'utilisation de la doxorubicine.

**Tableau II-** *Composition des milieux sans sérum (SF) et sans sérum / sans hormone (SFHF) utilisés pour la culture primaire des cardiomyocytes de rats néonataux*

<b>Solutions</b>	<b>Milieu sans sérum (SF)</b>	<b>Milieu sans sérum sans hormone (SFHF)</b>
<i>Bicarbonate de Sodium</i>	38 mM	38 mM
<i>Milieu Dulbeco's Eagle Modifié (DMEM)</i>	6.68g/L	6.68g/L
<i>Milieu cellgro Ham's F12 (Mediatech)</i>	5.32g/L	5.32g/L
<i>BSA sans acide gras (faible en endotoxines)</i>	10g/L	-
<i>Apo-Transfériue</i>	2.5mg/L	2.5mg/L
<i>Pen/Strep</i>	2%	2%
<i>ITS Supplément de culture (VWR CACB354351)</i>	1X	1X
<i>Chlorure de Calcium</i>	80mg/L	80mg/L
<i>FETUIN (Sigma)</i>	-	0.25g/L
<i>L-acide ascorbique</i>	-	20mg/L
<i>MEM- Solution d'acides aminés non-essentiels</i>	-	0.1mM
<i>Vitamines (Gibco 11120-052)</i>	-	1X
<i>BSA/Palmitate</i>	-	0.20%



### **2.2.2 Infections avec les adénovirus**

Les cardiomyocytes sont infectés 24h après la mise en culture, 3 heures après le changement de milieu (SF ou SFHF). Les calculs des volumes de la quantité de virus à utiliser pour les infections sont effectués à partir du titre viral (en pfu/ $\mu$ L) selon la multiplicité d'infection (MOI) optimale des virus et le nombre de cellules à infecter:

$$\text{Volume} = \frac{(\text{nb. de cellules}) \times \text{MOI}}{\text{titre viral}}$$

Les infections sont effectuées sur une période de 48h à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>, en changeant le milieu de culture 12-16h post-infection. Une courbe d'infectivité a été effectuée par immunofluorescence (non montrée) pour chacun des adénovirus, afin de déterminer la dose virale optimale (MOI de 1 à 20). Dans ce projet, une MOI de 2 est utilisée lors de l'infection des cellules pour les extraits cellulaires et les ARNm et une MOI de 5 s'est avérée optimale pour les immunofluorescences et les analyses TUNEL. Pour le virus PEX1, des MOI de 4, 10 et 20 ont été sélectionnées pour les analyses d'immunofluorescence, de qPCR et de *western blot* respectivement. Toutes les expériences ont été effectuées en duplicata au moins deux fois.

### **2.2.3 Traitements à la doxorubicine**

La doxorubicine (DOX), une anthracycline utilisée en chimiothérapie, a été choisie pour l'induction de l'apoptose des cardiomyocytes tel que décrit précédemment (Aries et al. 2004). Les cellules sont préalablement infectées par les adenovirus sur une période de 24 heures avant le traitement. Essentiellement, la DOX (*Sigma*) est fraîchement dissoute dans le milieu SFHF et gardée à l'abri de la lumière. Les traitements DOX sont effectués à 300nM sur une période de 12h. Les cellules sont ensuite fixées à la paraformaldéhyde 1% selon la méthode décrite dans la section TUNEL (section 2.6.2).

## **2.3 Analyses protéiques**

### **2.3.1 Préparation des extraits nucléaires et cytoplasmiques**

Une fois les cellules lavées au PBS (*Phosphate Buffered Saline*) on ajoute 1mL de PBS NaOV 1mM préalablement refroidi sur glace. Les cellules sont récoltées et transférées dans des tubes pour centrifugation à 5 000 rpm à 4°C pour 30 secondes. Le culot est resuspendu dans un volume approprié ( $\approx 400\mu\text{L}$ /pétri de 100mm) de tampon hypotonique (HEPES 20mM pH 7.9, NaF 20mM, Na pyrophosphate 1mM, Na orthovanadate 1mM, Na molybdate 0,25mM,  $\beta$ -glycérophosphate 40mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, DTT 2mM, PMSF 0,5mM, Leupeptine 10

$\mu\text{g/mL}$ , Aprotinine 10  $\mu\text{g/mL}$  et Pepstatine 10  $\mu\text{g/mL}$ ). Après 15 minutes sur glace, on ajoute du NP-40 pour obtenir une concentration finale de 0,5%. Les échantillons sont ensuite vortexés 20 secondes et centrifugés à 13 000 rpm à 4°C pendant 30 secondes. Le surnageant représente la fraction cytoplasmique conservée à -80°C. Le culot est de nouveau resuspendu avec un volume approprié ( $\approx 5$  fois le volume du culot) de tampon à forte teneur en sels (HEPES 20mM pH 7.9, NaF 20mM, Na pyrophosphate 1mM, Na orthovanadate 1mM, Na molybdate 0,25 mM,  $\beta$ -glycérophosphate 40mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, Glycérol 20 %, NaCl 0,4 M, DTT 2 mM, PMSF 0,5 mM, Leupeptine 10  $\mu\text{g/mL}$ , Aprotinine 10  $\mu\text{g/mL}$  et Pepstatine 10  $\mu\text{g/mL}$ ). Les échantillons sont agités pendant 1 heure à 4°C sur vortex et centrifugés à 13 000 rpm à 4°C pendant 20 minutes. Le surnageant représente la fraction nucléaire conservée à -80°C.

### ***2.3.2 Préparation des extraits cellulaires totaux***

Une fois les cellules lavées au PBS on ajoute un volume approprié ( $\approx 250\mu\text{L}$ /pétri de 100mm) de tampon d'extraction (Tris Hcl 50mM pH 7,5, NaCl 250 mM, NP-40 0,1 %, EDTA 5 mM, DTT 2 mM, PMSF 0,5 mM, Leupeptine 10  $\mu\text{g/mL}$ , Aprotinine 10  $\mu\text{g/mL}$  et Pepstatine 10  $\mu\text{g/mL}$ ). Après 30 minutes d'incubation à 4°C les cellules sont récoltées dans des tubes pour centrifugation à 5 000 rpm à 4°C pendant 30 secondes. Le surnageant représente la fraction des protéines totales conservée à -80°C.

### 2.3.3 SDS-PAGE/Western Blot

Les gels de séparation sont composés d'acrylamide 12,5 % dans Tris-HCl 250 mM pH 8,8, SDS 0,1 %, APS 0,0001 % et TEMED 0,0004 %. On laisse polymériser pendant 10 minutes entre deux plaques de verre avec séparateurs. On ajoute ensuite le gel d'empilement d'acrylamide 5% dans Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1 %, APS 0,0001 % et TEMED 0,0001 % en insérant un peigne pour la confection des puits. Après 30 minutes de polymérisation, les échantillons sont préparés pour la migration. Les échantillons de protéines à migrer (5-100 $\mu$ g) sont ajustés avec le tampon de chargement d'échantillons à 1X ( 6X= Glycerol 20%, SDS 2 %, Bleu de bromophénol 1,25 mg, Tris-HCl 320 mM pH 6,8 et  $\beta$ -mercaptoethanol 5 %). Les échantillons sont amenés à ébullition pendant 5 minutes avant le chargement dans les puits du gel. L'électrophorèse est mise en marche en utilisant le tampon d'électrophorèse ( Tris 25 mM, Glycine 200 mM, SDS 1 %) à une intensité de 100V pendant 15 minutes puis en augmentant à 150V pendant environ 60 minutes, ou jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne le bas du gel. Par la suite, on prépare une membrane de PVDF à 0,45  $\mu$ m de porosité (*Immobilon-P ; Millipore*) de grandeur adéquate au gel en l'activant dans le méthanol 100 % pendant 15 secondes. La membrane est ensuite brièvement transférée dans l'eau *MilliQ*, puis laissée au repos dans le tampon de transfert (Tris 25mM, Glycine 200mM, Méthanol 20 %). Dans une cassette prévue à cet effet, on place un papier éponge et des filtres de papier *whatman* (2) de chaque côté du gel de polyacrylamide et de la membrane de transfert sans provoquer la formation de bulles. La cassette est placée dans le module de transfert pour une durée de 90 minutes à une intensité de 100 à 150V à 4°C dans le tampon de transfert. Ensuite, après le

lavage de la membrane au PBS, un premier blocage est effectué avec une solution de lait 5 % dans le PBS-Tween 0,2 % (PBS-T) à 4°C toute une nuit durant, sur agitateur. Le lendemain, on incube la membrane pendant 1 heure avec le premier anticorps dilué dans le tampon de blocage à 1% de lait (voir le tableau III pour les dilutions utilisées).

**Tableau III :** *Description des anticorps utilisés lors des analyses de western blot et les immunofluorescences*

Anticorps	Hôte	Analyse	Couplage	Dilution utilisée	Source - # catalogue
ANP (I-28) rat	lapin	immunofluorescence	-	1/500	Peninsula
BAF47	souris	western blot	-	1/1 500	BD Pharmingen - 612110
Bcl-x s/I (S-18)	lapin	western blot	-	1/500	SantaCruz - Sc-634
GATA4(C-term) rat	lapin	western blot	-	1/1 500	Anticorps maison
HA (Y-11)	lapin	immunofluo/western	-	1/500	SantaCruz - Sc-805
PEX1	lapin	western blot	-	1/1 000	Anticorps maison
$\alpha$ -lapin	chèvre	western blot	Peroxydase	1/50 000	Sigma - A6154
$\alpha$ -lapin	chèvre	immunofluorescence	Alexa fluor 546	1/500	Molecular Probe - A-11035
$\alpha$ -souris	chèvre	western blot	Peroxydase	1/50 000	Sigma - A4416
Phalloïdine	-	immunofluorescence	Alexa fluor 488	1/200	Molecular Probe - A12379

Après lavage au PBS-T, la membrane est incubée sur agitateur à température pièce pendant 45 minutes avec le second anticorps couplé à la peroxydase dilué dans du PBS-T (voir tableau III). Après lavage au PBS-T, on prépare la solution de chimiluminescence *ECL plus* (Amersham) selon les directives du manufacturier et on l'applique sur la membrane pendant 5 minutes à température pièce, à exposition lumineuse réduite. La membrane est enveloppée dans une pellicule de plastique et transférée dans une cassette pour une exposition sur film à rayon X de 20 secondes à 30 minutes, selon le niveau d'expression des protéines.

## 2.4 Analyses d'ARN

### 2.4.1 *Extraction de l'ARN total*

L'ARN total est extrait des cellules en culture selon les directives du manufacturier du réactif TRIZOL (*Invitrogen*). Essentiellement, les cellules sont lysées en ajoutant le réactif TRIZOL (2 mL/pétri de 100mm). Les cellules sont ensuite récoltées et transférées dans un tube pour une incubation de 5 minutes à température pièce. On ajoute ensuite le chloroforme (0,2 mL/mL de TRIZOL) et on agite vigoureusement pendant 15 secondes. Après 2-3 minutes de repos, les échantillons sont centrifugés à 12 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le mélange est maintenant séparé en une phase rosée phénol-chloroforme (basse), une interphase (centrale) et une phase aqueuse transparente (haute). La phase aqueuse, où l'ARN demeure exclusivement, est récoltée et transférée dans un nouveau tube pour la précipitation à l'alcool isopropylique (0,5mL/mL de TRIZOL). Après 10 minutes d'incubation à température pièce, les échantillons sont centrifugés à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est ensuite lavé avec de l'éthanol 75 % (1mL/mL de TRIZOL) préparé avec de l'eau DEPC. Puis, les échantillons sont vortexés brièvement et centrifugés à 7 500 g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot d'ARN est finalement séché à l'air libre pendant 5 à 10 minutes et resuspendu dans l'eau DEPC ( $\approx 30\mu\text{L}$ ). Après une incubation de 10 minutes à 60°C pour maximiser la solubilisation, les échantillons sont conservés à -80°C.

### **2.4.2 Préparation des ADN complémentaires**

Afin de vérifier l'intégrité de l'ARN, les échantillons ont été migrés sur gel d'agarose TAE. Après dosage par spectrophotométrie, les ADN complémentaires (ADNc) sont obtenus par réaction enzymatique RT-PCR avec la transcriptase inverse en utilisant le système *Omniscript* (Qiagen). Chaque réaction contient 2µg d'ARN, le tampon de réaction (1X), *dNTP* 0,5 mM, *Oligo-dT primer* 95nM, inhibiteurs d'*ARNase* 0,18U/µL, transcriptase reverse *Omniscript* (1µL) et de l'eau sans *ARNase*. Les échantillons sont ensuite incubés à 37°C pendant 2 heures et conservés à -20°C.

### **2.5 PCR quantitatif**

La confection d'oligonucléotides pour le PCR quantitatif (qPCR) doit respecter certaines généralités quant à la qualité du produit de PCR issu de la réaction. Les amorces, composées de 35 à 75% de GC, contiennent de 20 à 26 nucléotides pour l'amplification d'un produit de PCR de 150 à 300 paires de bases. La température de fusion (*melting*;  $T_M$ ) des amorces doit être située près de 58°C. La région C-terminale des ADNc (équivalent aux ARNm) est généralement ciblée en incluant, si possible, deux exons différents pour éviter l'amplification de l'ADN génomique s'il y a lieu. Les paires d'amorces sont ensuite testées en effectuant une courbe de dilution d'un ADNc exprimant le gène d'intérêt. La courbe standard des amplifications doit avoir un pourcentage d'efficacité situé entre 95 et 105% et la courbe de dissociation doit montrer

l'amplification d'un seul produit de PCR. Une fois approuvés, les oligonucléotides sont utilisés pour une réaction quantitative d'ADNc préparés selon la méthode décrite dans la section précédente.

Chaque échantillon est préparé à partir d'une dilution d'ADNc (1:100) de laquelle 2µL sont utilisés pour la réaction. La concentration de chaque oligonucléotide est de 0,6µM et le *SybrGreen MasterMix (Qiagen)* est utilisé à concentration finale de 1X. Les conditions de qPCR sont décrites par le manufacturier (*Qiagen*). Tous les oligonucléotides utilisés dans cette étude sont décrits dans le tableau IV. Afin de normaliser la quantification d'ARNm pour chaque échantillon, les amorces de l'ARNm de la protéine S16 de la sous-unité ribosomiale 40S ont été utilisées comme contrôle interne. Toutes les expériences ont été effectuées en duplicata au moins deux fois.

**Tableau IV:** *Description des oligonucléotides utilisés lors des analyses par qPCR*

Gène	Oligonucléotides sens	Oligonucléotides antisens
<i>ProtéineS16 (40S)</i>	TCTGGCAAGGAGAGATTTG	CCGCCAAACTTCTTGGATTC
<i>α-Sk-actine</i>	CAACAGCATCATGAAGTGCGAC	TACTCCTGCTTGGTGATCCACATC
<i>α-actine-ca</i>	AAACTGTGTTATGTCGCCCTGG	ACAGGACATTGTTGGCGTACAG
<i>α-MHC (myh 6)</i>	AAGCTGCAGTTGAAGGTGAAGG	AGCTTGTTGACCTGGGACTC
<i>β-MHC (myh7)</i>	AACACCAACCTGTCCAAGTTC	ATCCTTAGGGTTGGGTAGCACAAAG
<i>ANP</i>	CCGATAGATCTGCCCTCTTG	TCCAGGAGGGTATTCACCAC
<i>BNP</i>	CAGCTCTCAAAGGACCAAGG	CTTGAGAGGTGGTCCCAGAG
<i>PEX</i>	CCTTATGAATGTAAAGGGTGTGG	CTCCAATATGAATTTTCTCATGCTC
<i>GATA4-endogène (3'UTR)</i>	GGACATAATCACCGGTAATCAGCA	GAAGTCTCCTGCTCACTGAAGAGC
<i>GATA4-exogène (HA-G4)</i>	TTATGACGTGCCTGACTATGCC	ACAGGCGTTGCATAGGTAGTGTC
<i>GATA4-total (C-terminal)</i>	CAGCAGCAGTGAAGAGATGC	ATGTCCCATGACTGTCAGC
<i>G4(201-440) exogène (HA-G4)</i>	TTATGACGTGCCTGACTATGCC	GGTGGTAGTCTGGCAGTTGG
<i>GATA4 F108A (pCGN) *clonage</i>	GATCCTCGAGATGGCTTCTAGCTATCCTTATG	GATCAAGCTTTTACGCGGTGATTATGTC



## 2.6 Analyses cellulaires

### 2.6.1 Immunofluorescences

Les analyses d'immunofluorescences ont été effectuées pour déterminer les cellules infectées par les adénovirus ( $\alpha$ HA), détecter les variations d'expression de certaines protéines cardiaques ( $\alpha$ ANP et  $\alpha$ GATA4) et observer la réorganisation cytosquelettique (phalloïdine). Les dilutions utilisées sont mentionnées dans le tableau III. Ainsi, après 48 heures d'infection des cardiomyocytes avec les adénovirus, les cellules sont lavées au PBS et fixées avec de la paraformaldéhyde 4 % fraîchement diluée dans du PBS, pH 7.4 pendant 10 minutes à température pièce. Après lavage au PBS, on perméabilise les cellules avec une solution de PBS-Triton 0,2 % pendant 15 minutes à température pièce. On lave encore les cellules au PBS avant de procéder à leur blocage avec une solution de PBS-Tween 0,2 % BSA 5 % pendant 3 heures à température pièce. Les échantillons sont ensuite incubés avec le premier anticorps, dilué dans la solution de BSA, à 4°C pendant toute la nuit (tableau III). Les cellules sont lavées avant d'effectuer un deuxième blocage avec la solution de BSA pendant 30 minutes à température pièce. Les échantillons sont incubés à température pièce pendant 45 minutes dans la solution de BSA contenant le second anticorps dilué et la phalloïdine (tableau III). Après le lavage des cellules au PBS, on effectue une coloration DAPI pendant 10 minutes, en agitant à température pièce. Après lavage au PBS, les lames sont montées avec du *Vectashield (Vector)* et du vernis, puis conservées à 4°C à l'abri de la lumière. Les photos sont prises au microscope à fluorescence à 350nm, 488nm et 546nm.

### 2.6.2 TUNEL

Le kit de détection d'apoptose *ApopTag® Fluorescein* (Chemicon/Millipore) permet de révéler les cellules apoptotiques *in situ* par la méthode indirecte *Terminal Deoxynucleotidyltransferase-Mediated dUTP End-Labeling* (TUNEL). Par l'intermédiaire d'un anticorps anti-digoxigénine conjugué à la fluoresceine et l'enzyme *Terminal Deoxynucleotidyltransferase* (Tdt), tous deux fournis par le manufacturier, il est possible de détecter les cellules dont l'ADN est fragmenté en réponse à l'apoptose. En effet, la fluoresceine est transférée sur l'extrémité 3'-OH des fragments d'ADN grâce à l'enzyme TdT, ce qui permet la détection des cellules apoptotiques par observation à 488 nm. Ainsi, après le traitement dox, les cardiomyocytes sont lavées au PBS, et fixées avec de la paraformaldéhyde 1 % fraîchement diluée dans du PBS, pH 7.4 pendant 10 minutes à température pièce. Les cellules sont lavées de nouveau avec du PBS avant d'être perméabilisées (5 minutes à -20°C) avec une solution Éthanol:Acide acétique (2:1) préalablement refroidie. On lave ensuite les spécimens avant l'application du tampon d'équilibration. Après une incubation de 30 à 60 minutes à température pièce, on applique la solution enzymatique TdT (30% enzyme TdT et 70% de tampon de réaction) directement sur les spécimens en incubant à 37°C pour 60 minutes. On ajoute le tampon d'arrêt/lavage pour 10 minutes à température pièce, puis on lave les cellules au PBS. Ensuite, la solution anti-digoxigénine conjuguée est appliquée directement sur les spécimens, qui sont ensuite incubés en milieu humidifié à température pièce pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. Après le lavage des cellules au PBS, on effectue une coloration DAPI pour 10 minutes en agitant à température pièce. Après lavage au PBS, les lames sont montées avec du

*Vectashield (Vector)* et du vernis, puis conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  à l'abri de la lumière. Les photos sont prises au microscope à fluorescence à 350nm et 488nm. Pour les analyses de chaque adénovirus  $\pm$  dox, 10 champs comprenant de 300 à 800 cellules/champ, ont été comptés. Les expériences ont été effectuées deux fois en duplicata. Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le test de T non pairé bilatéral avec le logiciel *Prism (GraphPad Software)*. Les moyennes  $\pm$  SEM (erreur standard sur la moyenne) ont été calculée pour chaque conditions et les valeurs dont le  $P \leq 0,05\%$  sont considérées comme significativement différentes des valeurs avec lesquelles elles ont été comparées.

### ***2.6.3 Analyse de la régulation transcriptionnelle***

#### ***2.6.3.1 Transfections transitoires***

Afin de déterminer l'effet de certains facteurs de transcription sur des promoteurs cibles, des analyses de transfections transitoires de ces promoteurs liés à un gène rapporteur, en l'occurrence la luciférase, ont été effectuées. Dans la présente étude, le promoteur Bcl-X<sub>L</sub> (figure 15A section 3.4.1) a été utilisé. Ce plasmide contient 747 pb du promoteur (souris) et a déjà été décrit précédemment (Arie et al. 2004). Les différentes protéines GATA4 étaient clonées dans le vecteur d'expression pCGN, et ont déjà été décrites précédemment (Charron et al. 2001). Les transfections transitoires ont été effectuées dans des cellules NIH 3T3 mises en culture à 35,000 cellules/puits dans des plaques 12 puits en croissance dans du DMEM supplémenté de FBS 10% et de Penstrep 1%. Environ 24 heures après la mise en culture et 3 heures avant la transfection, on procède au changement de milieu. Les dilutions adéquates des

plasmides à transfecter sont préparées en ajoutant les solutions de  $\text{CaCl}_2$  (Tris Hcl 2mM pH 7,9, EDTA 0,2 mM et  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  500mM) et HBS (HEPES 50 mM pH 7,1, NaCl 280mM et  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,5 mM). En laissant reposer 10 minutes, on ajoute le mélange aux cellules en culture et on change le milieu le lendemain.

### 2.6.3.2 Luciférase

Cette expérience est effectuée 48 heures après la transfection. On aspire le milieu de culture des cellules, puis on ajoute une quantité adéquate du tampon de lyse (Tris Hcl 100mM pH 7,9, NP-40 0,5 %, DTT 1 mM). Après 10 minutes à température pièce sur agitation, le lysat de chaque puits est transféré dans des tubes de plastique pour lecture au luminomètre. Cette lecture est effectuée en utilisant une solution de luciférine (1 Tris-HCl : 8  $\text{H}_2\text{O}$  : 1 Luciferine). Les expériences ont été répétées deux fois, en duplicata. Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le test de T non païré bilatéral avec le logiciel *Prism (GraphPad Software)*. Les moyennes  $\pm$  SEM ont été calculée pour chaque conditions et les valeurs dont le  $P \leq 0,05\%$  sont considérées comme significativement différentes des valeurs avec lesquelles elles ont été comparées.

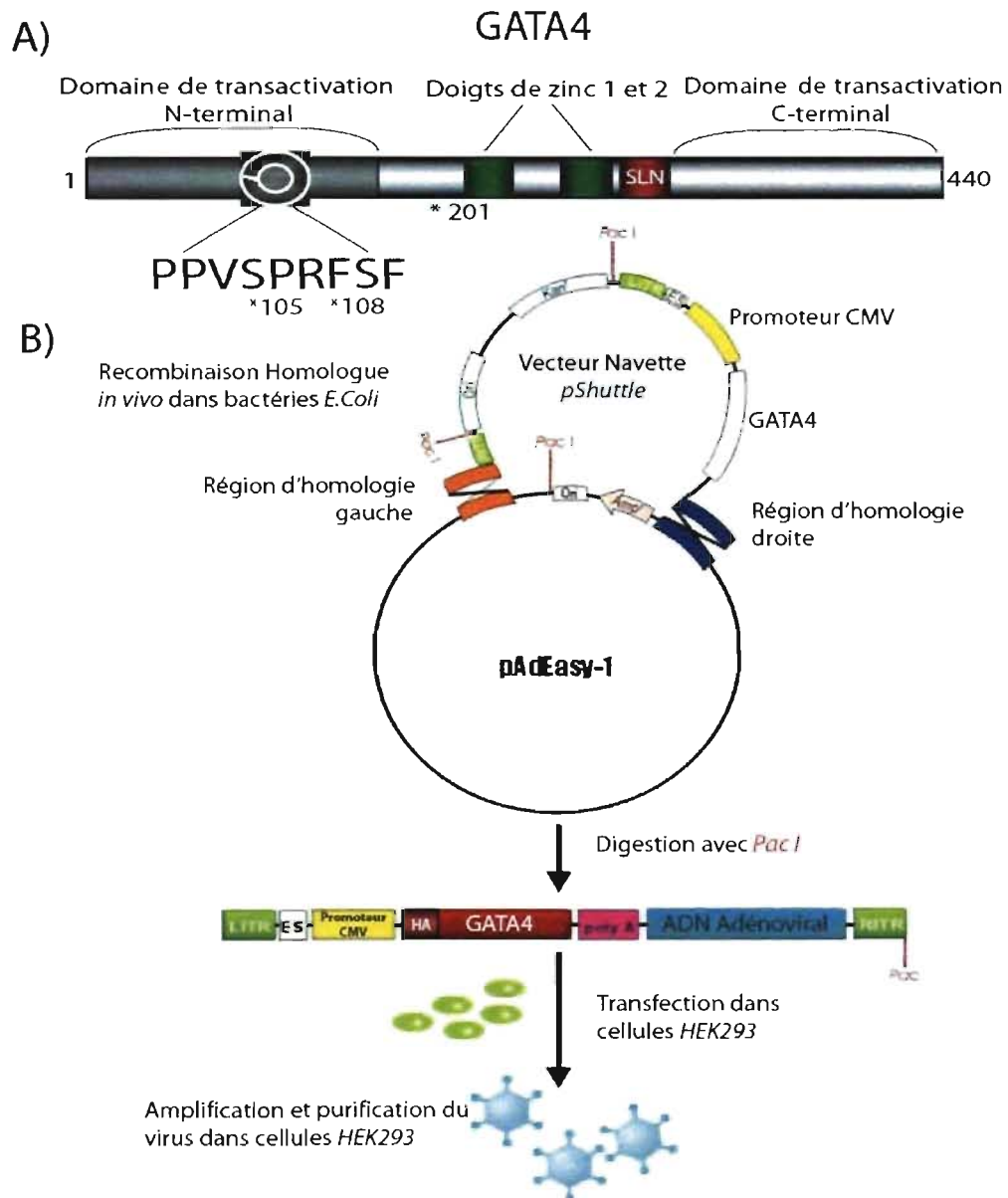
## **CHAPITRE III. RÉSULTATS**

### **3.1 Rôle du domaine de transactivation N-terminal de GATA4 dans l'hypertrophie et la cardioprotection**

Il est connu que la surexpression adénovirale de GATA4 dans des cultures primaires de cardiomyocytes entraîne la réorganisation du cytosquelette, l'augmentation de la surface cellulaire et l'augmentation significative de l'accumulation des protéines totales (Charron et al 2001; Liang et al, 2001). Par ailleurs, la surexpression de GATA4 procure aussi une amélioration de la survie des cardiomyocytes et une protection contre l'apoptose (Aries et al. 2004).

#### **3.1.1 Construction et caractérisation des adénovirus GATA4**

Afin de déterminer si l'effet hypertrophique et anti-apoptotique de GATA4 implique des mécanismes communs ou distincts, nous avons décidé de cartographier les domaines de GATA4 impliqués dans l'hypertrophie et la survie cellulaire. Pour ceci, nous avons construit quatre adénovirus contenant diverses formes de la protéine GATA4 ; un de type sauvage (WT) et trois différents mutants. Deux de ceux-ci contiennent des mutations ponctuelles situées dans le domaine de transactivation N terminal soit la sérine 105 et la phénylalanine 108 substituées en alanine (figure 7A). La sérine à la position 105 est un site de phosphorylation MAPK de motif PXSP, conservé entre différentes espèces comme la souris, l'humain et le poulet (Liang et al, 2001 ; Charron et al. 2001).



**Figure 7. Protéine GATA4 et construction des adénovirus**

**A.** Illustration de la protéine GATA4 montrant les différents domaines fonctionnels de la protéine ciblés dans la présente étude. Les mutants ont été construits par mutations ponctuelles de la sérine 105 et la phénylalanine 108 en alanine ainsi que par la délétion de la partie N-terminale (1-200) incluant un domaine de transactivation de la protéine.

**B.** Schéma du modèle de recombinaison homologue utilisé pour la construction des Adénovirus. Les vecteurs navettes contiennent les différentes formes de l'ADNc GATA4 et l'étiquette HA en N-terminal qui sont sous l'influence d'un promoteur CMV. L'utilisation des cellules HEK293 permet de faire la production et l'amplification des adénovirus.

La phénylalanine à la position 108, elle, fait partie d'un site de liaison de haute affinité avec les MAPK, permettant ainsi l'interaction de GATA4 avec les différentes MAPK associées à sa phosphorylation (Charron et al. 2001). La phosphorylation de GATA4, par l'entremise des voies de signalisation des kinases activées, entre autres, par les agonistes hypertrophiques, favorise sa propre liaison avec l'ADN et sa fonction de transactivation génique (Charon et al. 2001). Le mutant de délétion G4<sub>(201-440)</sub>, quant à lui, contient une protéine déléetée de la partie N terminale, incluant la totalité du domaine de transactivation de cette région, mais qui conserve les deux doigts de zinc et le domaine de transactivation C-terminal : ce mutant lie l'ADN, interagit avec certains cofacteurs et active la transcription (Charron et al. 1999 ; Morin et al. 2001). Les mutants, ainsi que le type sauvage (WT) de la protéine GATA4 ont été clonés dans des vecteurs adénoviraux de sérotype 5 par recombinaison homologue selon le modèle schématisé dans la figure 7B. Tous les adénovirus construits dans cette étude contiennent la séquence étiquette hémagglutinine (HA ; YPYDVPDYA), permettant d'identifier facilement dans les cellules, la protéine exogène.

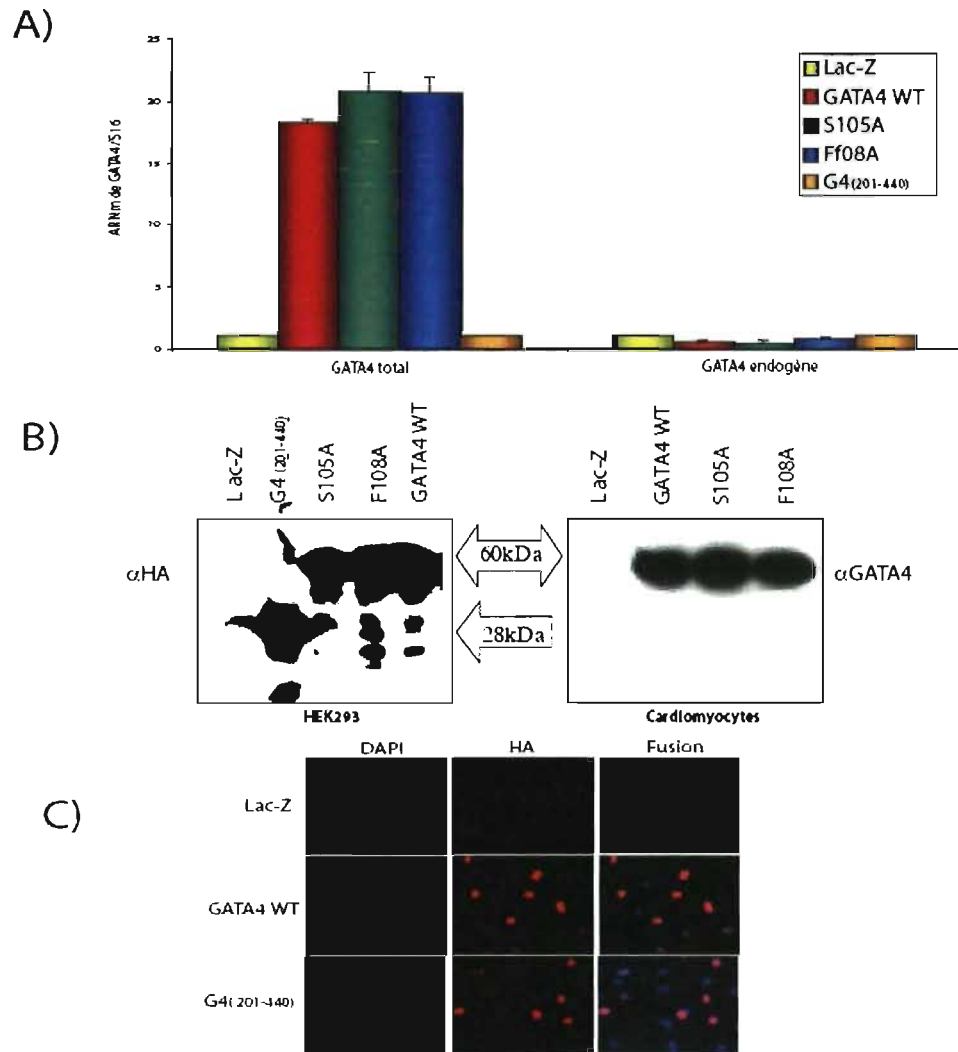
Les constructions adénovirales ont été préparées selon la technique décrite dans la section 2.1.1, qui est schématisée dans la figure 7B. Afin de caractériser les 4 adénovirus (WT et 3 mutants), nous avons *a priori* vérifié leur surexpression dans les cellules HEK293 par *western blot*. Nous pouvons observer une forte surexpression des différentes protéines en utilisant l'anticorps anti-HA contre les extraits nucléaires des cellules infectées (figure 8B, panneau de gauche). Cette analyse indique que tous les adénovirus produisent une quantité équivalente de la protéine attendue dans les cellules HEK293.

Afin de déterminer la multiplicité d'infection (MOI) optimale pour les infections dans les cardiomyocytes, des analyses dose-réponse ont été effectuées par immunofluorescence sur une échelle de 1 à 20. En immunofluorescence, à MOI de 5, le pourcentage des cellules infectées était d'environ 90% (figure 8C), alors qu'à MOI de 2, moins de 75% des cellules étaient infectées (données non montrées). Pour la caractérisation des différents adénovirus et l'analyse comparative des niveaux de protéines produites par chaque virus, les cardiomyocytes étaient infectés à MOI de 2. Des amorces ont été préparées dans différentes parties de GATA4 soit dans les régions 5'UTR, C-terminale et HA/N-terminale des séquences génomiques, ceci permettant de déterminer spécifiquement l'ARN endogène, exogène et total, respectivement (voir tableau IV, section 2.5). Le niveau d'expression d'ARNm total de GATA4 montre une augmentation d'environ 20 fois lors d'infections de cardiomyocytes à MOI de 2 avec les adénovirus contenant les mutants S105A, F108A ou le GATA4 WT comparativement aux cellules infectées avec Lac-Z (figure 8A). Ainsi, les ARNm des trois adénovirus sont produits à des niveaux semblables.

Toutefois, la surexpression de l'adénovirus G4(201-440) n'a pas pu être détectée par cette méthode (figure 8A), malgré l'essai de plusieurs paires d'oligonucléotides différentes (tableau IV, section 2.5) ciblant les régions N-terminale, centrale et C-terminale de la séquence d'ADNc de ce mutant (données non montrées). Il est possible de croire que des modifications post-transcriptionnelles seraient effectuées sur les ARNm de cette protéine, ce qui empêcherait l'amplification par qPCR. La figure 8B (panneau de droite)



montre le western blot avec l'anticorps anti-GATA4 de cardiomyocytes infectés à MOI de 2 avec les différents adénovirus, ce qui confirme le résultat de l'analyse de l'ARNm pour GATA4 WT, S105A et F108A (figure 8A). Par contre, il n'a pas été possible de détecter la surexpression de la protéine du mutant G4(201-440) par western blot avec l'anti-GATA4 ou l'anti-HA dans les cardiomyocytes (données non montrées). L'anti-GATA4 cible la partie C-terminale de la protéine GATA4, tandis que l'anti-HA, la portion N-terminale, ce qui appuie l'hypothèse qu'un épissage particulier des ARNm ou des modifications post-traductionnelles de la protéine empêchent la détection de la surexpression de ce mutant par cette méthode. Nous avons alors essayé de vérifier l'expression de ce mutant dans les cardiomyocytes par immunofluorescence en utilisant l'anticorps anti-HA. Cette fois-ci, nous avons pu observer l'expression du mutant G4<sub>(201-440)</sub> (figure 8C), ainsi que pour les autres constructions (figure 9A).

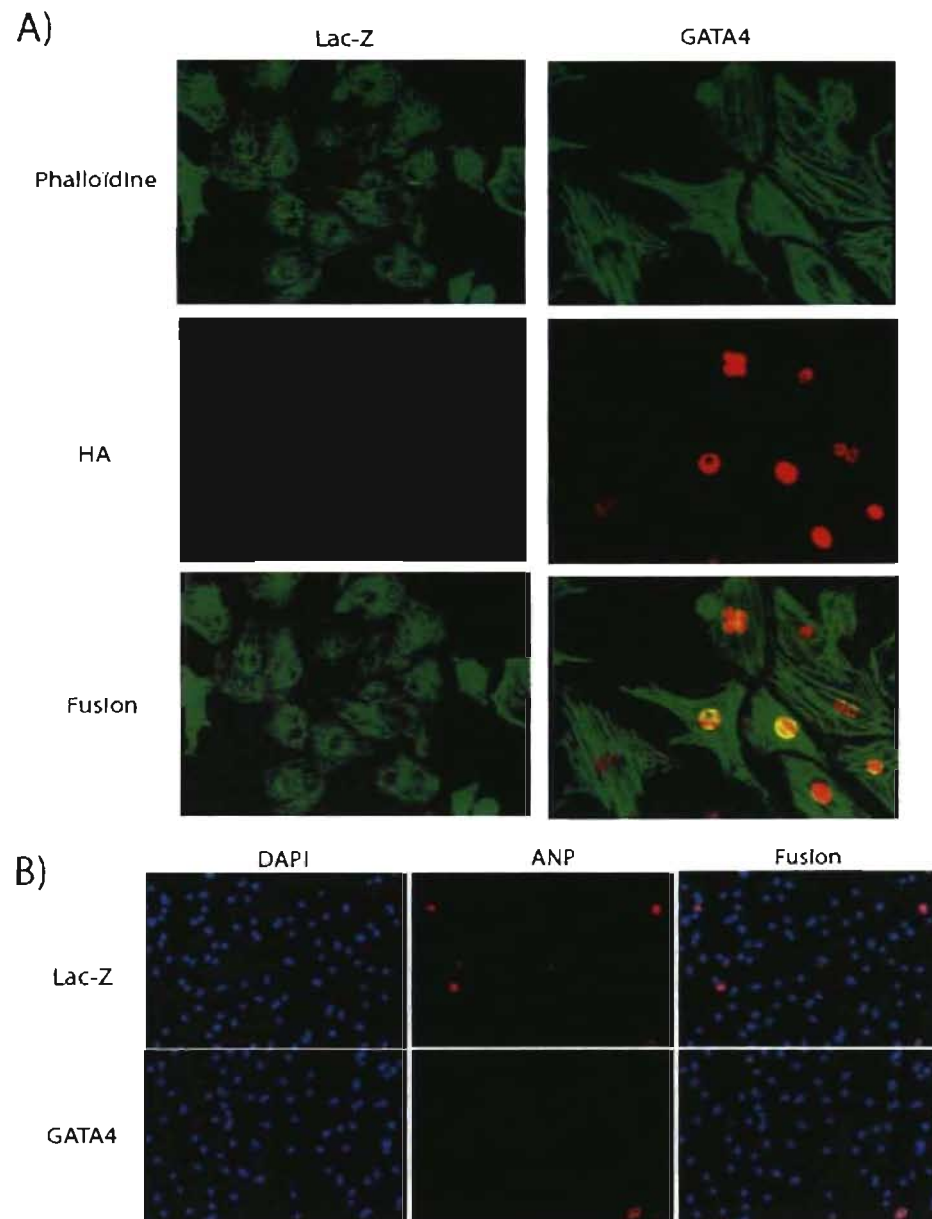


### Figure 8. Surexpression des différents mutants GATA4

**A.** PCR quantitatifs effectués à partir d'ADNc de cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux infectés par les différents adénovirus utilisés à MOI de 2, mesurant le niveau d'expression d'ARNm de GATA4 total et endogène. **B.** Les extraits nucléaires provenant d'infections de cellules par les adénovirus ont été migrés sur SDS-PAGE 12,5% et transférés sur membrane de PVDF pour *western blot*. L'anti-HA (Y11) a été utilisé (panneau de gauche) pour vérifier la surexpression dans les HEK293 lors de la confection des virus à titre encore inconnu à cette étape et l'anti-GATA4 permet de révéler (panneau de droite) la surexpression dans les cardiomyocytes infectés à MOI de 2 par trois des virus de l'étude. Poids théorique de GATA4 = 46kDa **C.** Expression des protéines HA-GATA4 WT et HA-G4<sub>(201-440)</sub> par immunofluorescence tel que révéle avec l'anti-HA (rouge) lors d'infections de cardiomyocytes avec les adénovirus Lac-Z, GATA4 et G4<sub>(201-440)</sub> à MOI de 5. Le DAPI (bleu) marque les noyaux cellulaires.

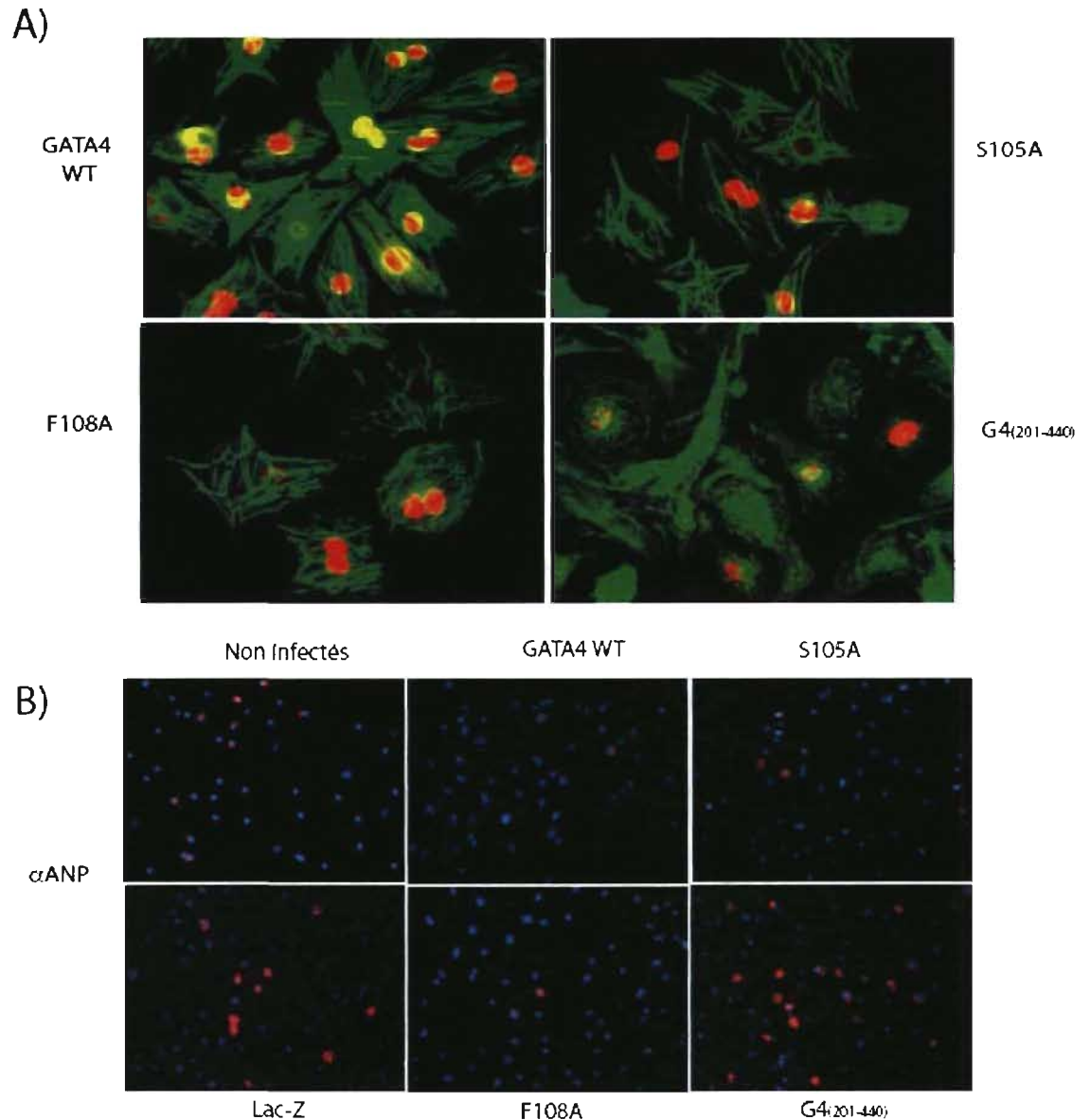
### 3.1.2 Effet des différents adénovirus sur la réorganisation sarcomérique des cardiomyocytes

Il est connu que GATA4 régule l'expression de plusieurs protéines contractiles impliquées dans l'hypertrophie cardiaque (Charron et *al*, 1999). De plus, il a été rapporté que la surexpression de GATA4 induit la polymérisation de l'actine filamenteuse (actine-F) lors de la réorganisation du cytosquelette tout comme la phényléphrine ou l'endothéline-1 qui sont des stimuli hypertrophiques (Charron et *al*, 2001). Lors de la réorganisation du cytosquelette, on assiste à la polymérisation de l'actine-F qui est détectable par immunofluorescence en utilisant la phalloïdine. Dans la présente étude, nous avons pu observer, en accord avec la littérature, l'apparence striée des fibres d'acto-myosine dans les cardiomyocytes infectés par l'adénovirus GATA4, comparativement à ceux qui ont été infectés par le contrôle Lac-Z (figure 9A). Il est également possible de confirmer la surexpression de GATA4 par immunofluorescence en utilisant l'anti-HA. Toutefois, lorsqu'on observe l'effet des différents mutants sur la réorganisation cellulaire, on remarque certaines divergences comparativement à GATA4 WT. Ainsi, les mutants S105A et F108A induisent une certaine réorganisation du cytosquelette (figure 10A), mais l'aspect global de l'actine-F est plutôt désorganisé. En effet, les filaments sont striés, mais leur distribution est aléatoire et multidirectionnelle comparativement à la distribution majoritairement uniforme et unidirectionnelle des filaments des cardiomyocytes infectés par GATA4 WT. Par contre, l'adénovirus mutant G4<sub>(201-440)</sub> ne semble pas induire de réorganisation du cytosquelette (figure 10A), puisque l'aspect des cellules exprimant HA



**Figure 9. Réorganisation de l'actine et expression de l'ANP dans les cardiomyocytes infectés avec le virus GATA4 WT**

**A.** Immunofluorescences montrant la réorganisation de l'actine par coloration à la phalloïdine-Alexa<sub>488</sub> (vert) et l'expression de la protéine HA-GATA4 tel que révélée avec l'anti-HA (rouge) dans les cardiomyocytes infectés avec l'adénovirus GATA4 WT ou Lac-Z à MOI de 5. On remarque l'aspect strié des filaments d'actine des cellules surexprimant GATA4, comparativement à Lac-Z. **B.** Diminution de l'expression de la protéine ANP révélée avec l'anti-ANP<sub>1-28</sub> (rouge) dans les cardiomyocytes surexprimant GATA4. LeDAPI (bleu) marque le noyau des cellules.



**Figure 10. Réorganisation de l'actine et de expression de l'ANP dans les cardiomyocytes infectés avec les adénovirus exprimant les différentes protéines GATA4**

**A.** Immunofluorescences montrant la réorganisation de l'actine par coloration à la phalloïdine-Alexa<sub>488</sub> (vert) et l'expression des différentes protéines HA-GATA4 tel que révélé avec l'anti-HA (rouge). L'infection des cardiomyocytes avec les différents adénovirus est à MOI de 5. **B.** Expression de la protéine ANP révélée avec l'anti-ANP<sub>1-28</sub> (rouge) par immunofluorescence lors d'infections de cardiomyocytes par les adénovirus à MOI de 5 et dans des cardiomyocytes non infectés. Le DAPI (bleu) marque les noyaux cellulaires.

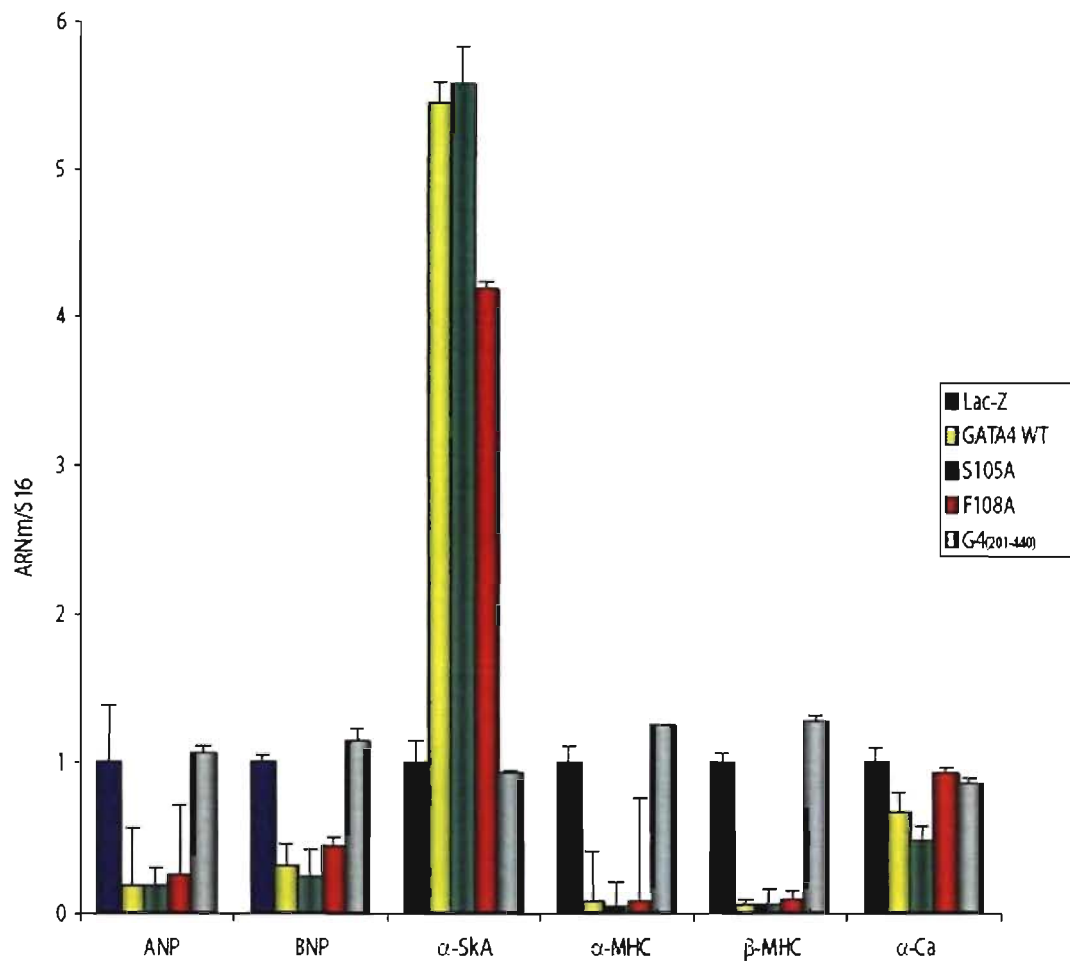
s'apparente aux cellules infectées par Lac-Z (figure 9A). Néanmoins, les cellules infectées par l'adénovirus G4<sub>(201-440)</sub> semblent être endommagées par l'infection lorsqu'on observe l'aspect global des échantillons. L'ensemble de ces données suggère que les domaines de GATA4, impliqués dans la réorganisation du cytosquelette, feraient partie de la portion N-terminale de la protéine. Aussi, les sites S105 et F108 auraient une implication significative pour la réorganisation du cytosquelette suggérant que la phosphorylation et/ou la liaison de MAPK serait impliquée dans l'hypertrophie cardiaque.

### **3.1.3 Effet des différents mutants de GATA4 sur l'expression des marqueurs de l'hypertrophie**

Plusieurs études ont déjà montré que GATA4, en collaboration avec différents facteurs de transcription, permettait l'activation transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes embryonnaires dont plusieurs sont réinduits dans l'hypertrophie cardiaque pathologique tels l'ANP, l' $\alpha$ -SK, l' $\alpha$ -MHC et la  $\beta$ -MHC (Paradis et al. 1996 ; Hines et al. 1999 ; Pikkarainen et al. 2004). Ces études impliquaient généralement des analyses de promoteurs *in vitro* (Temsah et Nemer 2005). La régulation des gènes endogènes a été surtout étudiée dans le contexte de perte de fonction de GATA4 *in vivo* (Oka et al. 2006) ou de *knock-down* médié par des adénovirus antisens (Charron et al. 1999) ou d'un dominant négatif (Liang et al. 2001). Bien que GATA4 soit impliqué dans l'activation transcriptionnelle de l'ANP, nous n'avons pas pu observer par immunofluorescence une augmentation de l'expression de cette protéine dans les cardiomyocytes infectés par l'adénovirus GATA4 WT (figure 9B et 10B). Nous avons même remarqué une diminution du nombre de cellules qui sécrètent l'ANP lorsqu'on compare au contrôle Lac-Z (2.2%

G4WT vs 10.5% LZ). Il en est de même pour les mutants S105A (2.5%) et F108A (1.9%) qui n'augmentent pas l'expression de l'ANP (figure 10B). Toutefois, le mutant G4(201-440) ne semble pas inhiber l'expression de l'ANP (11.8%), qui paraît même plus forte que dans le contrôle infecté avec Lac-Z (figure 10B). La quantification des cellules qui sécrètent l'ANP a été effectuée sur environ 10 champs différents. Étant donné que l'ANP n'est pas augmenté lors de l'hypertrophie physiologique tel que celle observée durant l'exercice ou au cours du développement postnatal, ces résultats suggèrent que GATA4 pourrait induire une hypertrophie physiologique.

Afin d'examiner l'effet de GATA4 sur d'autres marqueurs moléculaires associés à l'hypertrophie, des analyses d'ARNm ont été effectuées. La technique du qPCR sur des ADNc a été utilisée tel que décrit dans la section 2.5. Pour commencer, nous avons vérifié les niveaux d'ARNm de l'ANP dans les cardiomyocytes infectés par les différents adénovirus. Ces résultats ont indiqué une diminution des ARNm de l'ANP et du BNP dans les cellules infectées par les adénovirus GATA4 WT, S105A et F108A, mais non dans ceux infectés avec l'adénovirus G4<sub>(201-440)</sub> (figure 11). Les changements au niveau de l'ANP sont donc en accord avec ce qui a été observé en immunofluorescence (figure 10B). Le profil d'expression de l'ARNm des chaînes lourdes de myosine (MHC)  $\alpha$  et  $\beta$  était aussi diminué dans les cellules surexprimant GATA4 ou les mutants S105A et F108A (figure 11). Par contre, une activation de 4 à 5.5 fois des niveaux de l'ARNm de l'actine squelettique (Sk- $\alpha$ ) est observable dans les cardiomyocytes infectés par GATA4 WT, S105A et F108A (figure 11).



**Figure 11. Effet des divers adénovirus sur l'expression des marqueurs d'hypertrophie.** Les ARNm totaux extraits de cardiomyocytes infectés par les différents adénovirus de l'étude à MOI de 5 pendant 48h ont été soumis à une transcription inverse. Les ADNc ainsi obtenus ont été amplifiés par PCR quantitatifs avec les paires d'amorces spécifiques décrites dans le tableau I. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  STD DEV d'un n=2 et sont représentatifs de 2 expériences indépendantes faites chacune en duplicata.

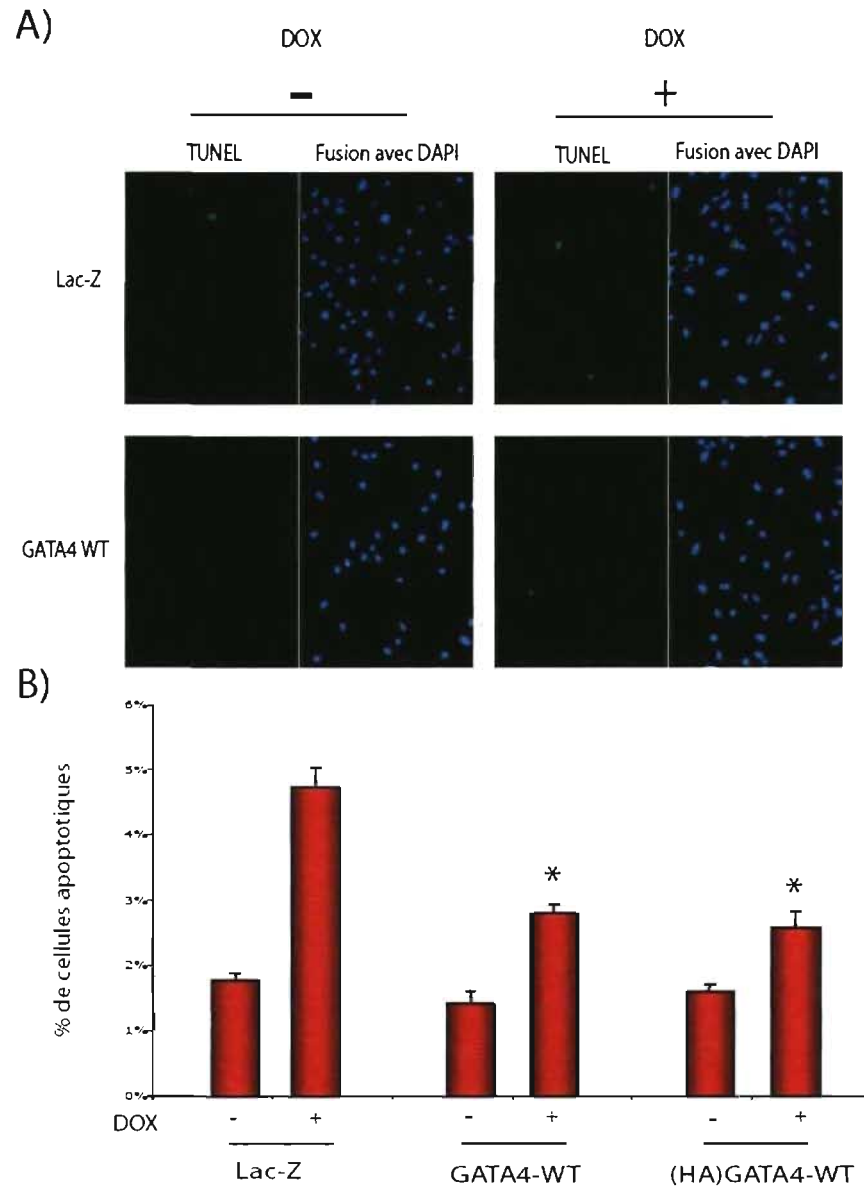


Le virus G4<sub>(201-440)</sub> ne démontre toutefois aucune différence par rapport au contrôle quant à l'ARNm de Sk- $\alpha$  (figure 11). Aucune augmentation de l'expression de l'ARNm de l'actine cardiaque ( $\alpha$ Ca) n'est notable pour tous les adénovirus, même qu'on observe une légère diminution pour GATA4 WT et S105A et aucun changement pour F108A et G4<sub>(201-440)</sub> par rapport au contrôle Lac-Z (figure 11). Ainsi, l'infection des cardiomyocytes par l'adénovirus GATA4 WT engendre une augmentation de l'actine squelettique, mais pas des autres marqueurs impliqués dans l'hypertrophie pathologique, ce qui suggère toujours que GATA4 induit une hypertrophie physiologique. Par ailleurs, les cellules infectées par G4<sub>(201-440)</sub> ne montre aucune augmentation de l'expression de l'actine squelettique, suggérant que la partie N-terminale de GATA4 est requise pour induire l'hypertrophie myocytaire.

#### **3.1.4 Effet des différents adénovirus sur la survie cellulaire et la cardioprotection**

La mort des myocytes cardiaques par apoptose accompagne souvent plusieurs maladies du cœur (Ogata et al, 2003). Étant donné que la protéine GATA4 possède un effet cardioprotecteur important sur les myocytes cardiaques et qu'elle a été caractérisée comme un activateur en amont de différents gènes antiapoptotiques (Aries et al, 2004), nous avons voulu étudier l'effet des différents mutants sur la survie des cardiomyocytes. Pour cela, nous avons mesuré l'induction de l'apoptose par la DOX dans les cardiomyocytes infectés par les adénovirus exprimant Lac-Z ou les différentes protéines GATA4 à MOI de 5. Ces expériences ont été effectuées avec l'essai TUNEL décrit dans la section 2.6.2. Tel que

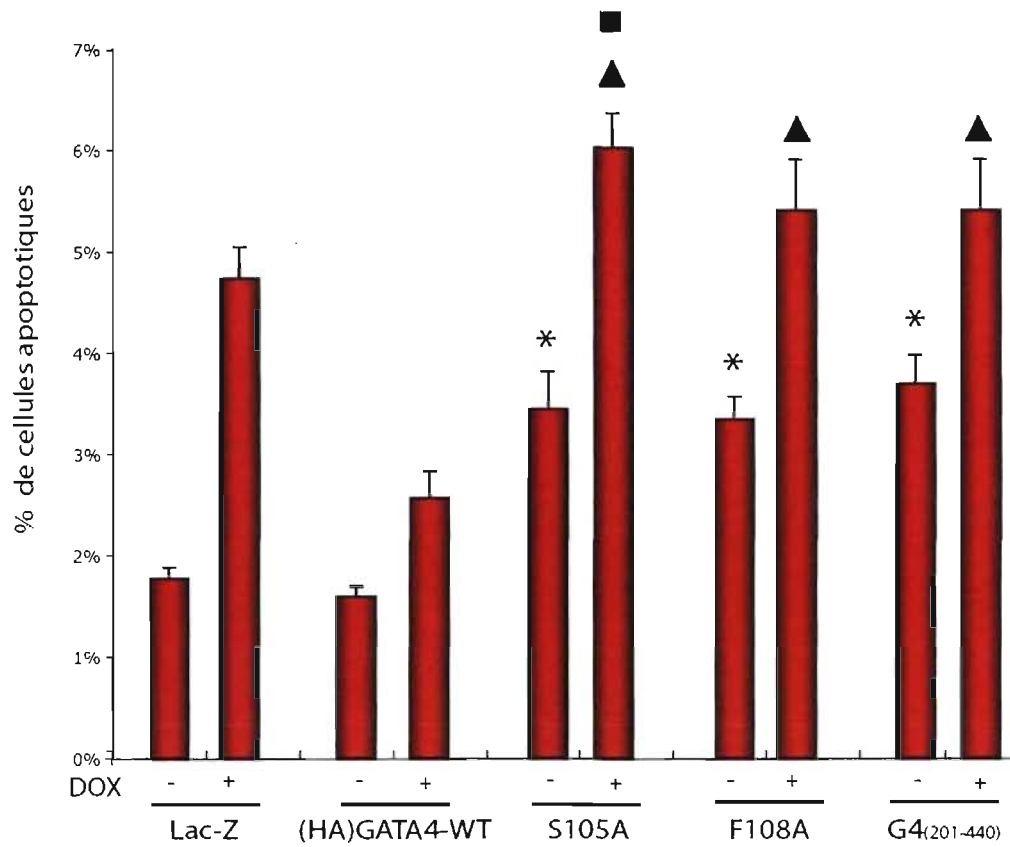
rapporté précédemment (Arie et al. 2004) nous avons observé une diminution du nombre de cellules apoptotiques dans les myocytes surexprimant GATA4 WT comparativement au contrôle Lac-Z (figure 12A et B). De plus, un autre adénovirus surexprimant GATA4, utilisé dans les travaux d'Aries et al (2004), a été testé pour comparer les effets cardioprotecteurs de l'adénovirus GATA4 WT construit dans la présente étude, qui diffère principalement par la technique de production du virus et de la présence de l'étiquette HA au début de la région N-terminale. Pour les deux adénovirus GATA4 WT, on observe une diminution d'environ 50 % de l'apoptose induite par la DOX par rapport au contrôle Lac-Z (figure 12B). D'autres analyses TUNEL ont été effectuées sur les cardiomyocytes infectés par les adénovirus exprimant les mutants de GATA4. On note une nette perte significative ( $P \leq 0,05\%$ ) de la fonction cardioprotectrice pour les 3 constructions S105A, F108A et G4<sub>(201-440)</sub> par rapport au contrôle, GATA4 en l'occurrence (figure 13). On remarque que le traitement DOX entraîne 50 % plus de mortalité pour les cellules surexprimant les trois mutants comparativement à celles qui sont infectées par GATA4 WT. De plus, on observe que l'apoptose basale est augmenté de près de 50 % ( $P \leq 0,05\%$ ) dans les cardiomyocytes surexprimant les protéines mutantes par rapport aux cardiomyocytes surexprimant GATA4 ou le contrôle Lac-Z (figure 13). Ceci suggère que la surexpression des mutants GATA4 serait néfaste pour la survie des cardiomyocytes et que les domaines impliqués dans la réorganisation du cytosquelette pourraient chevaucher ceux qui sont impliqués dans la cardioprotection.



**Figure 12. Effet cardioprotecteur de GATA4**

**A.** Analyse TUNEL (vert), avec DAPI (bleu), par fluorescence de cardiomyocytes infectés par l'adénovirus GATA4 WT et Lac-Z (MOI 5) soumis ou non à un traitement DOX.

**B.** Analyse quantitative de l'apoptose observée avec, ou sans, traitement DOX pour deux adénovirus surexprimant GATA-4 WT dans les cardiomyocytes infectés à MOI de 5. La construction GATA4-WT provient des études précédentes (Aries et al. 2004) et (HA)GATA4-WT est celle développée et utilisée dans la présente étude. Un total de 10 champs contenant 300 à 800 cellules chacun a été compté pour chaque condition. Les résultats obtenus sont la moyenne  $\pm$  SEM de 4 expériences. Les tests de T ont permis d'identifier les moyennes notées \*, qui sont significativement différentes ( $P \leq 0,05\%$ ) du contrôle Lac-Z en présence de DOX.



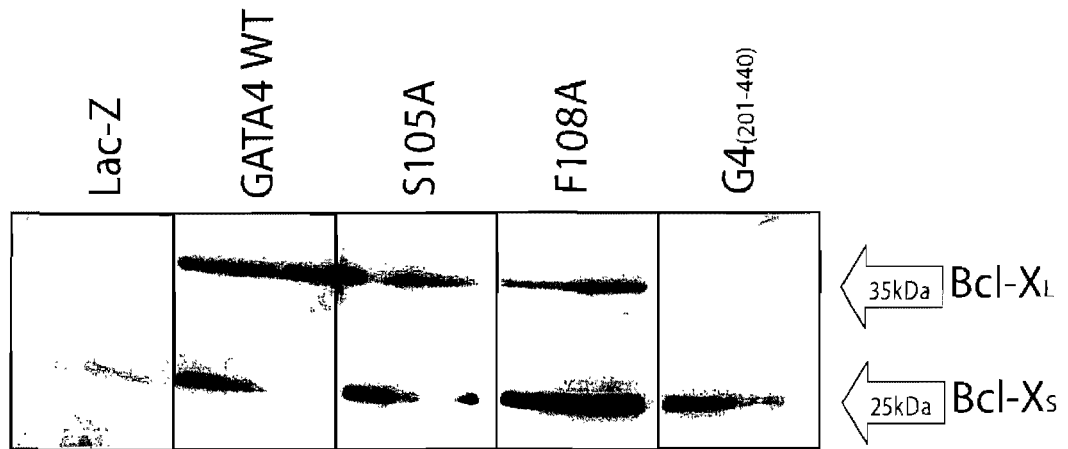
### Figure 13. Effet des différentes protéines GATA4 sur la survie cellulaire

Analyse quantitative de l'apoptose observée avec, ou sans, traitement DOX pour les différents adénovirus surexprimant Lac-Z, GATA4 WT, S105A, F108A et G4<sub>(201-440)</sub> dans les cardiomyocytes infectés à MOI de 5. Un total de 10 champs contenant 300 à 800 cellules chacun a été compté pour chaque condition et les résultats sont la moyenne  $\pm$  SEM de quatre déterminations indépendantes. Les tests de T ont permis d'identifier les moyennes notées \*, qui sont significativement différentes ( $P \leq 0,05\%$ ) des contrôles Lac-Z et GATA4 en absence de DOX. Les ▲ réfèrent aux moyennes significativement différentes ( $P \leq 0,05\%$ ) de GATA4 en présence de DOX. Le ■ identifie la valeur  $P \leq 0,05\%$  comparativement à Lac-Z en présence de DOX.

La protéine Bcl-X, faisant partie de la famille Bcl-2, inhibe l'apoptose d'une part, en maintenant l'intégrité membranaire des mitochondries et d'autre part, en prévenant le relâchement de divers facteurs pro-apoptotiques. GATA4 est reconnu pour être un activateur en amont de Bcl-X, qui est un des effecteurs de GATA4 dans la survie cellulaire (Aries et al, 2004). Le *western blot* de la figure 14 montre l'expression de la forme longue active (L) et courte inactive (S) de la protéine Bcl-X dans des cardiomyocytes infectés à MOI de 2, par les différents adénovirus de l'étude. Il est possible d'observer une augmentation de Bcl-X<sub>S</sub> dans les extraits nucléaires provenant des cardiomyocytes infectés avec les adénovirus exprimant toutes les protéines GATA4 par rapport à ceux exprimant le contrôle Lac-Z. Toutefois, Bcl-X<sub>L</sub>, soit la forme anti-apoptotique (Chen et al. 2007), est uniquement induite en réponse à la surexpression de GATA4 WT et des mutants S105A et F108A, qui augmentent Bcl-X<sub>L</sub> moins que GATA4 WT. Le mutant G4<sub>(201-440)</sub>, lui, n'induit pas du tout la forme longue de Bcl-X (figure 14). Ainsi, le ratio Bcl-X<sub>L</sub>/ Bcl-X<sub>S</sub> est >1 uniquement dans les cardiomyocytes expriment GATAWT, ce qui corrèle avec l'effet cardioprotecteur observé.

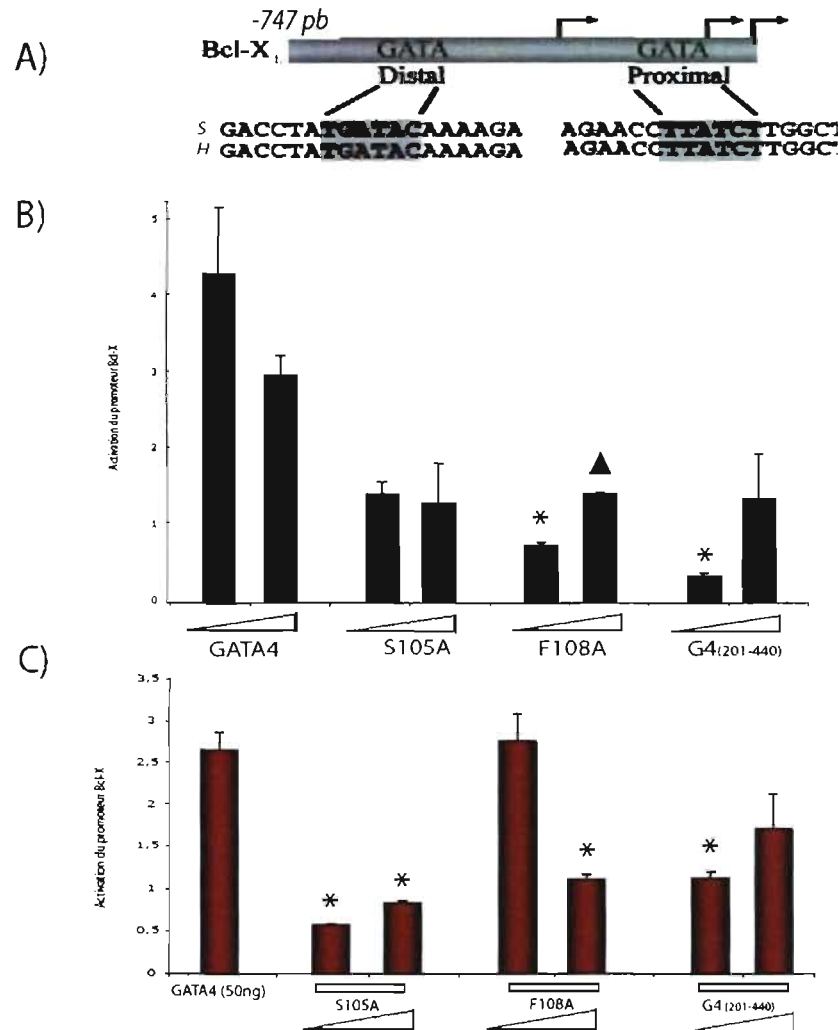
Nous avons aussi effectué des transfections transitoires, couplées à des mesures de l'activité luciférase, afin d'évaluer l'effet transcriptionnel des différents mutants GATA4 sur le promoteur de Bcl-X<sub>L</sub> (figure 15A). À dose croissante de 25 à 100 ng, la transfection de GATA4 WT dans des NIH 3T3 montre une activation d'environ 3 à 4 fois du promoteur (figure 15B). Aux mêmes concentrations, on remarque que les mutants S105A, F108A et G4<sub>(201-440)</sub> entraîne une activation maximale de 1,5 fois, soit 2 fois moins que le GATA4

WT (figure 15B) bien que peu de valeurs sont significativement différentes ( $P \leq 0,05\%$ ) au contrôle GATA4. Par ailleurs, si les mutants sont cotransfectés à 50 et 100ng en présence d'une dose constante de 50ng de GATA4 WT, on assiste à une répression significativement différente ( $P \leq 0,05\%$ ) pour la majorité des activation normale du promoteur BCL-X<sub>L</sub> par GATA4 WT suggérant que les mutants pourraient agir comme dominants négatifs de la protéine WT (figure 15C). Somme toute, l'activation du promoteur Bcl-X<sub>L</sub> par GATA4, semble être altérée par les mutations des sites 105 et 108 et la déletion de la partie N-terminale. Ceci concorde avec les résultats obtenus précédemment avec les analyses TUNEL ainsi que le *western blot* qui montrent une augmentation de l'apoptose et une diminution de l'expression de la protéine Bcl-X<sub>L</sub>, respectivement, dans les cardiomyocytes infectés avec les adénovirus exprimant les protéines GATA4 mutantes.



**Figure 14. Effet des différentes protéines GATA4 sur l'expression de la protéine antiapoptotique Bcl-X**

Les extraits cellulaires totaux des cardiomyocytes infectés par les différents adénovirus à MOI de 2 ont été migrés sur SDS-PAGE 15% et transférés sur membrane de PVDF pour *western blot*. L'anti-Bcl-X a été utilisé pour vérifier l'expression des formes longue (Bcl-X<sub>L</sub>) et courte (Bcl-X<sub>S</sub>) de la protéine. Les données sont représentatives de deux expériences différentes. Poids théorique de Bcl-X<sub>L</sub> = 27kDa et Bcl-X<sub>S</sub> = 19kDa



**Figure 15. Effet de GATA4 WT et ses mutants sur le promoteur Bcl-X<sub>L</sub>**

**A.** Schéma du promoteur Bcl-X<sub>L</sub> utilisé pour les transfections transitoires indiquant les sites GATA (modifié de Aries et al. 2004). S= souris H= Humain **B.** Activation du promoteur Bcl-X<sub>L</sub> lors de co-transfections transitoires dans les NIH 3T3 avec des vecteurs d'expression de GATA4 WT et des différents mutants. 1µg de rapporteur a été utilisée avec 25 et 50 ng de vecteurs d'expression. **C.** Inhibition de l'activation par GATA4 du promoteur Bcl-X<sub>L</sub> par des doses croissantes des mutants utilisés et une dose constante de 50 ng du vecteur d'expression GATA4 en combinaison avec 50 et 100ng des vecteurs exprimant les mutants. Les différentes séquences codantes de GATA4 sont clonées dans le vecteur d'expression pCGN qui ont été décrits précédemment (Charron et al. 2001). Les résultats sont la moyenne ± SEM de n=2 expériences indépendantes. Les tests de T ont permis d'identifier les moyennes notées \*, qui sont significativement différentes ( $P \leq 0,05\%$ ) des valeur de GATA4 à dose équivalente (A) ou à valeur de 50ng (B). Le ▲ réfère à la moyennes dont  $P \leq 0,05\%$  lorsque comparé au contrôle GATA4 à dose équivalente (A)

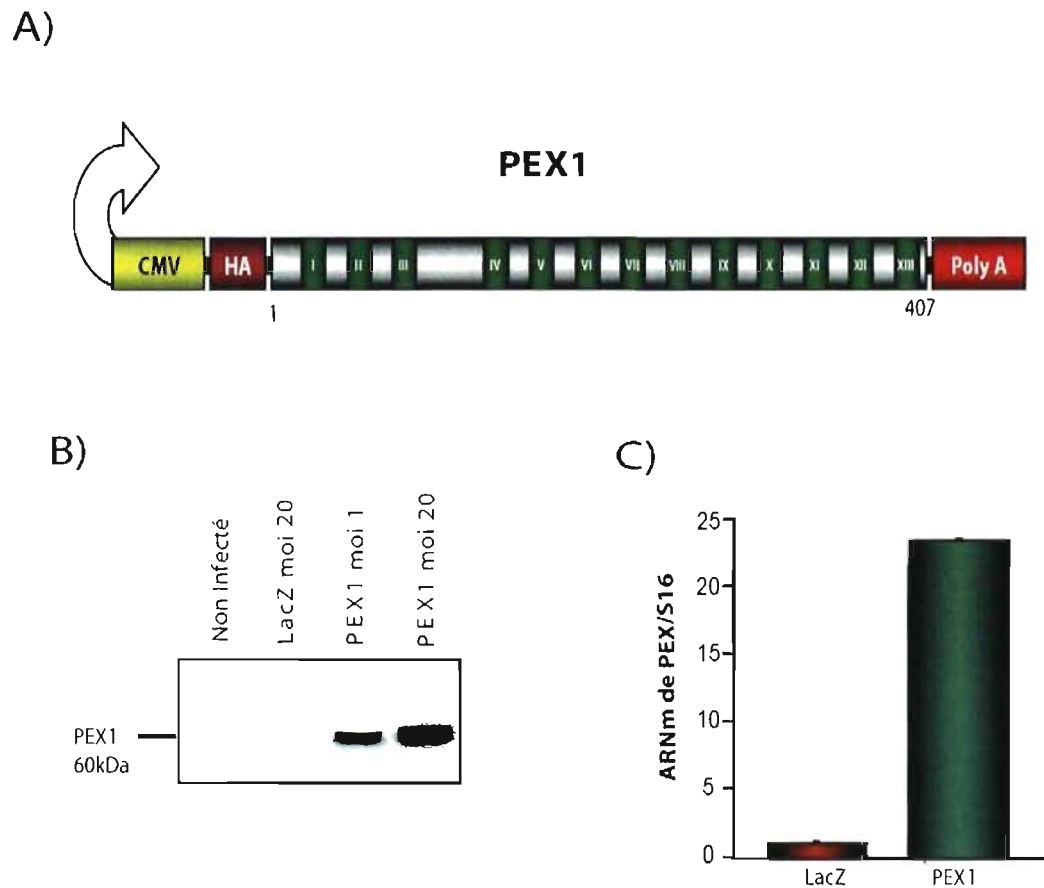


### **3.2 Rôle de la protéine PEX1 dans la croissance et la survie des cardiomyocytes**

Des études récentes de notre laboratoire ont montré que GATA4 et PEX1 interagissent mutuellement et activent de manière synergique la transcription de gènes reliés à l'hypertrophie des cardiomyocytes (Debrus et al, 2005). Par ailleurs, notre laboratoire a rapporté pour la première fois, à l'aide d'une stratégie antisens dans les cardiomyocytes, un rôle obligatoire de PEX1 dans la réponse hypertrophique induite par la PE et l'ET-1 qui rappelle celui de GATA4 (Charron et al. 2001 ; Debrus et al 2005 ; Komati et al, en cours). Pour tester l'effet d'un gain de fonction de PEX1 dans les cardiomyocytes, nous avons donc entrepris de déterminer si la surexpression de PEX1 suffisait pour induire l'hypertrophie, et si, comme GATA4, PEX1 régula la survie des cardiomyocytes.

#### ***3.2.1 Construction et caractérisation de l'adénovirus PEX1***

La construction d'un adénovirus surexprimant PEX1 et contenant l'épitope HA en N-terminale (figure 16A) a été effectuée selon la technique décrite dans le chapitre précédent (section 2.1), qui est schématisée dans la figure 7B. L'adénovirus exprimant PEX1 a été caractérisé tel que décrit pour les adénovirus GATA4 (section 3.1.1) et les MOI optimales ont préalablement été déterminées pour chacune des expériences. La surexpression de PEX1 au niveau protéique est significative dans les cellules HEK293 (figure 16B), mais la



**Figure 16. Adénovirus PEX1 et surexpression de la protéine**

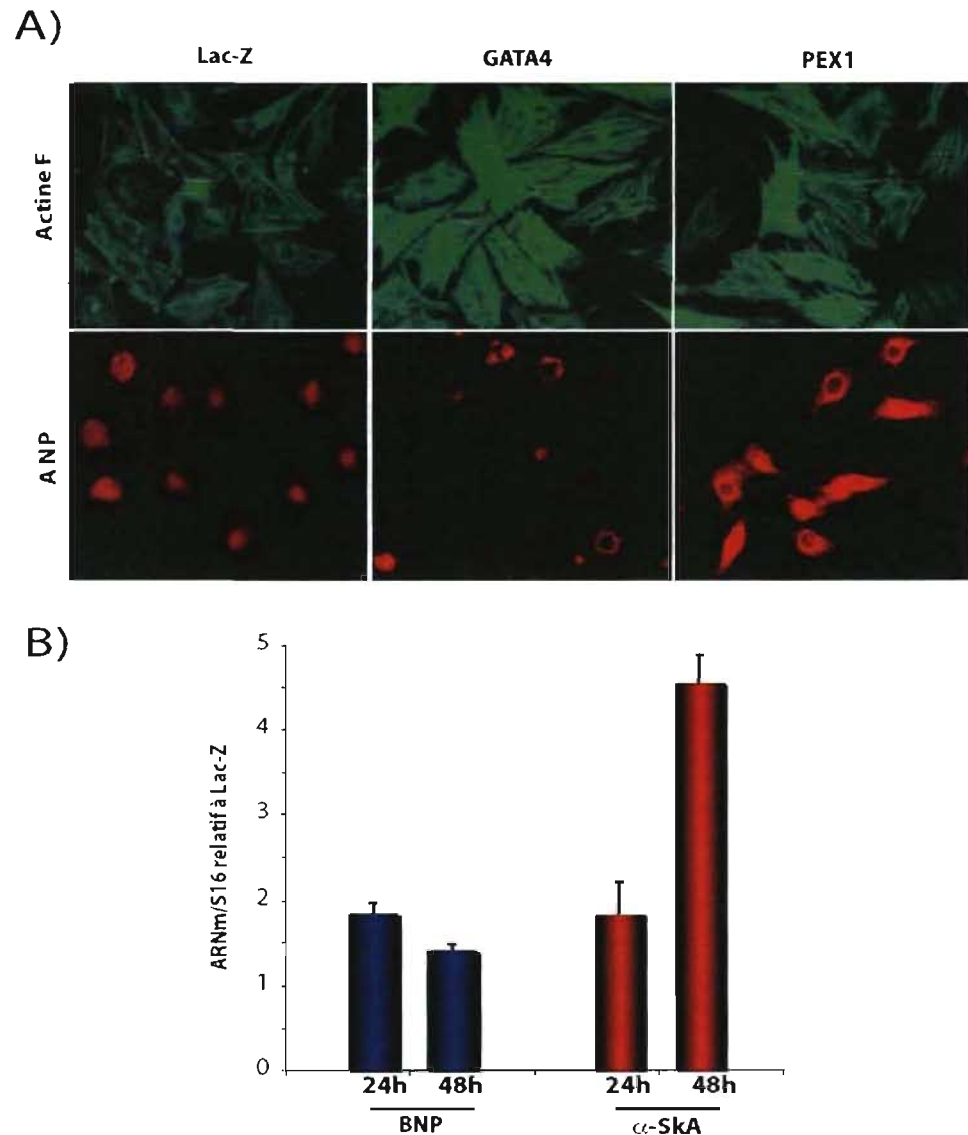
**A.** Illustration de la construction adénovirale PEX1 sous l'influence du promoteur CMV. La protéine possède 13 doigts de zinc et l'étiquette HA en N-terminal. **B.** Les extraits nucléaires des cellules HEK293 ont été migrés sur SDS-PAGE 12,5% et transférés sur membrane de PVDF pour *western blot*. L'anti-HA (Y11) a été utilisé pour vérifier la surexpression dans les cellules infectées par PEX1 à MOI initialement évaluée à 1 et à 20, par LacZ à MOI de 20. **C.** PCR quantitatifs effectués à partir d'ADNc de cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux mesurant le niveau d'ARNm de PEX1 total et endogène à MOI de 10. Poids théorique de PEX1<sub>L</sub> ≈ 45kDa

surexpression de la protéine dans les cardiomyocytes n'a pas pu être mise en évidence (données non montrées). Toutefois, on observe une nette différence des niveaux d'ARNm de PEX1 ( $\approx 25$  fois) dans les cardiomyocytes infectés par l'adénovirus PEX1 à MOI de 10 par rapport à ceux exprimant le contrôle LacZ (figure 16C). Il est possible de croire que la protéine subisse des modifications post-traductionnelles dans les cellules cardiaques, empêchant ainsi de voir l'expression de l'étiquette HA en N-terminal (figure 16A) par *western blot* et par immunofluorescence. Cette constatation est renforcée par l'apparition de deux formes différentes de PEX1 lors de son induction par GATA4 dans les cardiomyocytes (figure 18B à gauche). La présence d'une forme longue et courte de la protéine pourrait faire partie du mécanisme de régulation de la protéine, modulant ainsi son activité transcriptionnelle et transactivatrice dans les cellules cardiaques.

### ***3.2.2 Effet de la surexpression de PEX1 sur la réorganisation du cytosquelette et les marqueurs de l'hypertrophie***

Tel que mentionné ci haut, l'infection de cardiomyocytes avec un adénovirus exprimant l'antisens-PEX1 abroge la réponse hypertrophique à la PE et l'ET-1 (Debrus et al 2005 et Komati et al, en cours). De manière intéressante, nous avons observé que la surexpression de PEX1 dans les myocytes cardiaques induit une réorganisation du cytosquelette ainsi qu'une accumulation d'ANP (figure 17A) indiquant que PEX1 est essentiel, et que sa surexpression est suffisante pour induire l'hypertrophie des cardiomyocytes postnataux. Il est important de noter que le phénotype de la surexpression

de GATA4 est similaire à celui de PEX1 quant à la réorganisation sarcomérique, mais divergeant en ce qui a trait à l'accumulation de l'ANP (figure 17A). En considérant que l'activation transcriptionnelle de l'ANP au niveau ventriculaire est indicatrice des changements génétiques associés à l'hypertrophie cardiaque pathologique, il est possible de croire que GATA4 soit surtout un régulateur de l'hypertrophie physiologique et que PEX soit un médiateur nucléaire de la signalisation des RCPG dans le cœur, impliqué dans l'hypertrophie pathologique. De plus, en effectuant des qPCR sur des ADNc de cardiomyocytes infectés par PEX1, nous avons observé une augmentation des niveaux d'ARNm du BNP (près de 2 fois) et de  $\alpha$ -SkA (près de 5 fois) après 24 et 48 heures d'infection, respectivement (figure 17B). PEX1 serait un inducteur de ces marqueurs de la réponse hypertrophique qui font partie des gènes cardiaques  $\alpha$ 1/ET-1-inductibles (Zechner et al, 1997 ; Luodonpaa et al 2001). Toutefois, les analyses par PCR quantitatif en ce qui concerne l'ANP, l' $\alpha$ -MHC , la  $\beta$ -MHC et l'actine cardiaque n'ont pas montré de différences significatives par rapport au contrôle LacZ aux MOI utilisées pour l'infection (données non montrées). Il est donc possible que PEX1 affecte l'accumulation de l'ANP et non sa synthèse par un effet indirect sur sa sécrétion. Ainsi, l'effet transcriptionnel de PEX1 s'apparenterait à celui de GATA4.

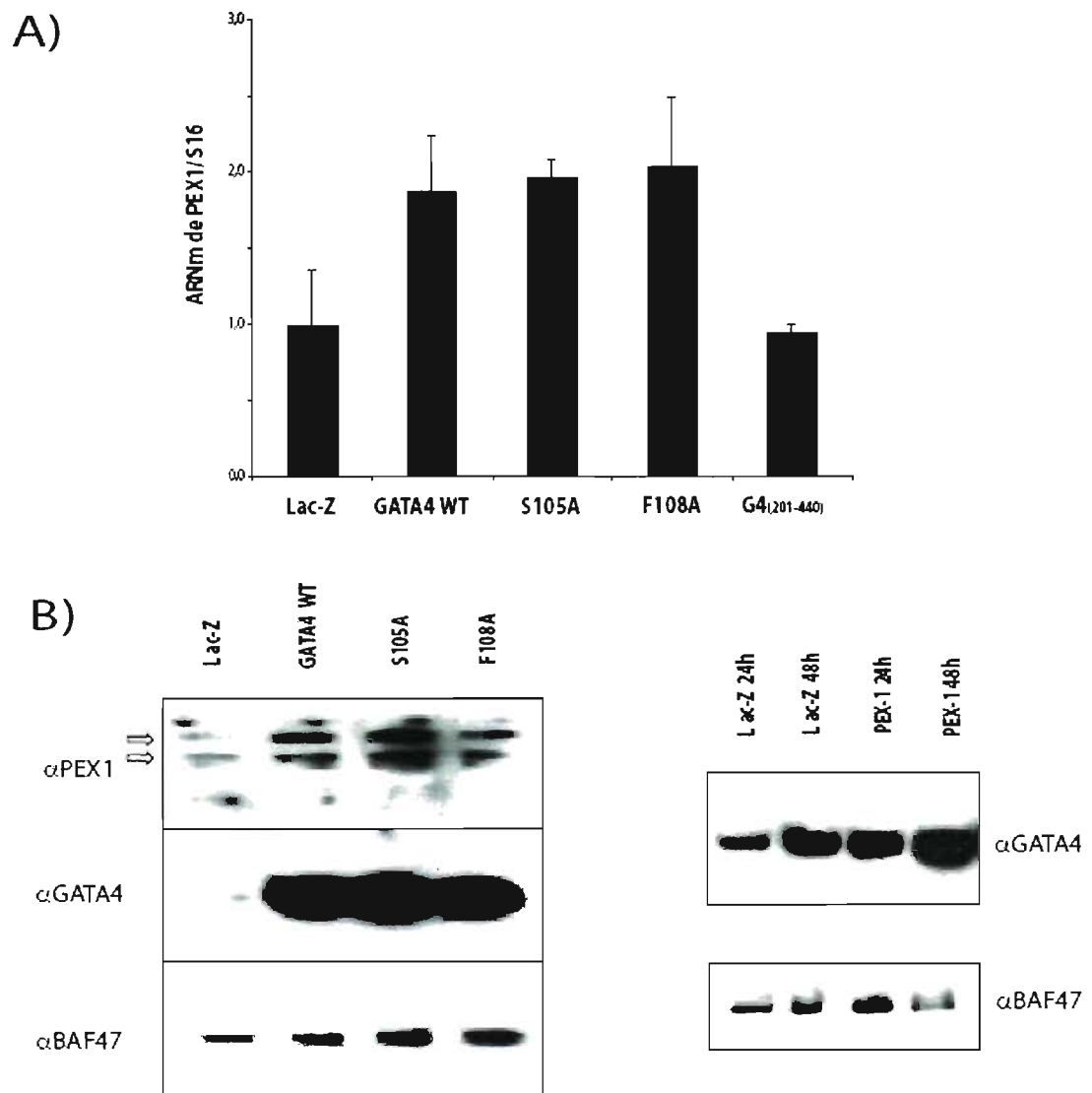


**Figure 17. Effet de PEX1 sur la réorganisation cellulaire et les marqueurs d'hypertrophie.**

**A.** Immunofluorescences montrant la réorganisation de l'actine par coloration à la phalloïdine-Alexa<sub>488</sub> (vert) avec l'expression de la protéine ANP (anti-ANP<sub>1-28</sub> en rouge) lors d'infections de cardiomyocytes avec l'adénovirus GATA4 WT à MOI de 5 et PEX1 à MOI de 4. On remarque l'aspect strié des filaments d'actine des cellules surexprimant GATA4 et PEX1, comparativement à Lac-Z. **B.** PCR quantitatifs effectués à partir d'ADNc de cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux mesurant le niveau d'expression d'ARNm de BNP et d' $\alpha$ -SkA lors des infections avec les adénovirus PEX-1 utilisé à MOI de 4. L'expression des ARNm de BNP et d' $\alpha$ -SkA a été mesurée après 24h et 48h d'infection. Les résultats proviennent d'une expérience effectuée en duplicata ( $\pm$  STD DEV) et sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

### 3.2.3 Co-régulation mutuelle de PEX1 et GATA4

Les effets cellulaires et géniques semblables obtenus par GATA4 et PEX1 peuvent s'expliquer par le fait que les deux protéines font partie d'un complexe transcriptionnel et qu'elles agissent comme cofacteurs l'une de l'autre. Des analyses *in vitro* de co-transfection de PEX1 et GATA4 suggèrent que ces deux facteurs de transcriptions interagissent physiquement et fonctionnellement ensemble (Debrus et al 2005). De plus, il est possible que les deux protéines régulent mutuellement la transcription de leurs gènes de façon à générer une boucle d'amplification ou qu'ils soient simplement en amont l'un de l'autre. Ce genre de relation est observée avec d'autres cofacteurs de GATA4, notamment Nkx2.5, SRF et MEF2 (Akazawa et Komuro 2003). Afin de déterminer si PEX1 et GATA4 sont des activateurs mutuels, nous avons mesuré les changements de l'expression de PEX1 dans les cardiomyocytes surexprimant GATA4. La surexpression de GATA4 WT, de S105A et F108A dans les cardiomyocytes permet d'augmenter le niveau des ARNm de PEX1 (figure 18A) ainsi que celui des protéines PEX1 (figure 18B panneau de gauche). Toutefois, le mutant G4<sub>(201-440)</sub> ne semble pas modifier l'expression de PEX1 au niveau des ARNm (figure 18A) et de la protéine (données non montrées). Ainsi, l'activation de PEX1 corrèle avec la capacité des protéines GATA4 à induire l'hypertrophie. La surexpression de PEX1 semble également entraîner l'activation de GATA4 dès 24h, mais encore plus, après 48h d'infection (figure 18B, panneau de droit). Ces résultats indiquent que PEX1 et GATA4 sont des régulateurs mutuels en plus d'agir comme cofacteurs l'un de l'autre.



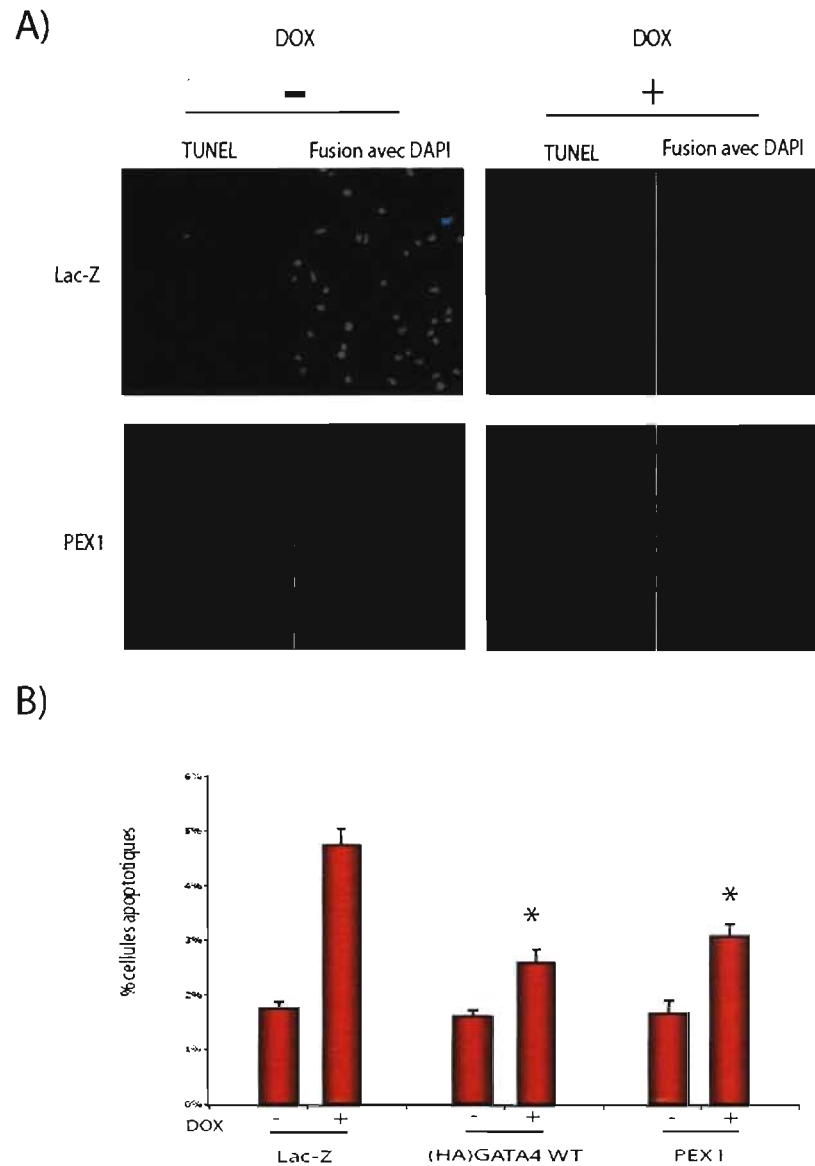
### Figure 18. Interactions régulatrices entre PEX1 et GATA4

**A.** PCR quantitatifs effectués à partir d'ADNc de cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux infectés par les différents adénovirus à MOI de 2, mesurant le niveau d'ARNm de PEX1 (n=2, représentatif de 2 expériences indépendantes  $\pm$  STD DEV). **B.** Les extraits nucléaires des cardiomyocytes infectés par les différents adénovirus ont été migrés sur SDS-PAGE 12,5% et transférés sur membrane de PVDF pour Western Blot. L'anti-PEX (Debrus et al. 2005) a été utilisé (panneau de gauche) pour vérifier l'effet de la surexpression des protéines GATA4 à MOI de 2 (anti-GATA4) sur la protéine PEX1. Dans cette figure les deux formes notables de PEX1 migrent entre 55 et 60 kDa. Sur le panneau de droite, on observe l'effet de la surexpression de PEX1 (MOI de 4) sur GATA4 dans les cardiomyocytes après 24 et 48h d'infection.

### **3.2.4 Effet de PEX1 sur la survie cellulaire et la cardioprotection**

Les analyses TUNEL ont permis de démontrer que la surexpression de GATA4 confère un potentiel anti-apoptotique aux cardiomyocytes. Considérant ce qui précède, nous avons testé l'effet de PEX1 sur la survie des cardiomyocytes en utilisant la même approche que celle décrite pour GATA4. Tel que le montre la figure 19 (A et B), on observe une diminution de plus de 30% de la mortalité des cardiomyocytes infectés par PEX1 suite au traitement à la DOX comparativement au contrôle LacZ. Bien que l'effet cardioprotecteur semble plus prononcé pour GATA4, ces résultats suggèrent que PEX joue également un rôle de cardioprotection dans les cellules myocytaires. Cet effet cardioprotecteur pourrait être dû à l'activation de GATA4 via PEX1, mais pourrait aussi être le résultat de l'activation directe par PEX1 d'une cascade anti-apoptotique. Des études futures devront adresser ces questions. Puisque PEX1 ne semble pas réguler l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-X<sub>L</sub> (données non montrée), il est possible de croire que d'autres protéines anti-apoptotiques seraient impliquées dans les processus de survie des cardiomyocytes





**Figure 19. Effet de la surexpression de PEX1 sur la survie cellulaire**

**A.** Analyse TUNEL (vert), avec DAPI (bleu), par fluorescence de cardiomyocytes infectés par l'adénovirus PEX1 et Lac-Z (MOI 5) soumis ou non à un traitement DOX. **B.** Quantification des cellules apoptotiques tel que déterminé par les analyses TUNEL, avec ou sans traitement de DOX, de cardiomyocytes infectés (MOI de 5) avec les adénovirus Lac-Z, GATA4 WT et PEX1. Un total de 10 champs contenant 300 à 800 cellules chacun a été compté pour chaque condition et les résultats sont la moyenne  $\pm$  SEM de quatre déterminations indépendantes. Les tests de T ont permis d'identifier la moyennes anotées \*, qui est significativement différentes ( $P \leq 0,05\%$ ) du contrôle Lac-Z en présence de DOX.

## CHAPITRE IV. DISCUSSION

Plusieurs facteurs de transcription font partie des cascades intracellulaires de la réponse hypertrophique des cardiomyocytes, mais peu de régulateurs transcriptionnels ont été répertoriés comme étant des effecteurs nodaux de la reprogrammation génique lors de l'hypertrophie cardiaque. La protéine à doigt de zinc GATA4 représente un des facteurs de transcription les mieux caractérisés, lequel régule l'expression génique du développement et de la différenciation cardiaques (Molkentin, 2000 ; Peterkin et al. 2005). Chez l'adulte, le niveau d'expression de GATA4 est augmenté sous des conditions de stress physiopathologique, participant entre autres à l'induction de gènes impliqués dans l'hypertrophie cardiaque et la survie cellulaire (Akazawa et Komuro, 2003 ; Aries et al. 2004). La présente étude a permis d'associer certaines régions et domaines fonctionnels de la protéine GATA4 à la réorganisation cellulaire et à la survie des cardiomyocytes. Effectivement, il a été trouvé que la partie N-terminale de GATA4 est nécessaire pour la réorganisation cytosquelettique des cardiomyocytes, impliquant entre autres les sites d'interaction avec les MAPK, S105 et F108. Cependant, l'impact de ces sites sur l'activité de GATA4 pour la survie cardiomyocytaire semble encore plus important que leur influence sur l'hypertrophie cardiaque. Ainsi, la région N-terminale de GATA4 est essentielle pour son activité dans la croissance ainsi que pour la survie des cellules, mais via des mécanismes distincts. Ce travail a aussi permis de mieux caractériser le rôle d'un nouveau facteur de transcription, PEX1, dans l'hypertrophie des myocytes cardiaques, tout en exposant sa fonction de collaborateur avec la protéine GATA4.

#### **4.1 Régulation du programme génétique de l'hypertrophie cardiaque**

L'hypertrophie cardiaque est caractérisée, entre autres, par un patron d'expression génique spécifique, souvent associé à la réinduction de gènes principalement exprimés lors du développement embryonnaire. Effectivement, lors de l'hypertrophie induite par des agonistes tels que l'ET-1, la PE et l'Ang II, on assiste à la réinduction des gènes fœtaux incluant l'actine squelettique ( $\alpha$ -SkA), l'actine cardiaque ( $\alpha$ -Ca), les chaînes lourdes de myosine - $\alpha$  et - $\beta$  ( $\alpha/\beta$ -MHC), ainsi qu'au réarrangement des chaînes d'acto-myosine et à la réorganisation subséquente du cytosquelette (Carè et al. 2007). Le cytosquelette est une structure flexible et dynamique impliquée dans une variété de fonctions cellulaires essentielles pour la survie des cellules, incluant la motilité, l'intégrité de la forme cellulaire, l'adhésion des cellules et l'interaction avec la matrice extracellulaire ainsi que l'ancrage des organelles (Mazza et al. 2007). Durant l'hypertrophie cardiaque, les petites protéines G (RhoA et Cdc42) sont associées aux réarrangements myofibrillaires (Nagai et al. 2003; Brown et al. 2006) et les travaux antérieurs de notre laboratoire ont démontré le rôle de GATA4 comme effecteur transcriptionnel des protéines impliquées dans la réorganisation sarcomérique (figure 9A ; Charron et al. 2001).

Les résultats obtenus par analyses quantitatives des ARNm des marqueurs de l'hypertrophie montrent un enrichissement des ARNm de l' $\alpha$ -SkA (figure 11) lors d'infections de cardiomyocytes avec GATA4. Toutefois, on observe étrangement une

diminution de la quantité des ARNm de  $\alpha/\beta$ -MHC, ce qui suggère que l'activation de certains gènes embryonnaires nécessite probablement un apport proportionnel d'autres cofacteurs. Des études récentes démontrent en effet l'importance de l'implication/collaboration du facteur de transcription SRF dans le profil d'expression des gènes fœtaux caractérisant la réponse hypertrophique des cardiomyocytes (Nelson et al. 2005). De plus, *in vivo*, il a été trouvé que la variation de l'expression des protéines  $\alpha/\beta$ -MHC est généralement corrélée au degré d'hypertrophie, et à la sévérité et/ou à la durée du stress, *e.g.* la pression de surcharge (Schwartz et al. 1992 ; Ecartot-Laubriet et al. 2000). Ainsi, il est possible que l'hypertrophie induite par GATA4 entraîne une hypertrophie adaptative ou physiologique, ne correspondant pas à celle induite en réponse au stress relié à la surcharge de pression sanguine *in vivo*. Le fait que les niveaux d'ANP n'augmentent pas non plus supporte cette hypothèse (figures 9B et 11).

Il est reconnu depuis longtemps que le développement de l'hypertrophie cardiaque pathologique concentrique ou excentrique chez le rat adulte est associé à la réexpression du gène fœtal cardiaque NPPA, le précurseur de l'ANP (Thibault et al. 1989 ; Dagnino et al. 1992). Conséquemment, l'ANP serait un marqueur parallèle à l'hypertrophie cardiaque, principalement exprimé durant le processus de pathogenèse cardiaque, et son augmentation au niveau ventriculaire ne refléterait qu'une partie de la réponse cellulaire pathologique (Vikstrom et al. 1998). Par contraste, on n'observe aucun changement, voire de modestes variations, au niveau de l'expression ventriculaire de NPPA dans les cœurs hypertrophiés d'animaux entraînés par l'exercice (Buttrick et al. 1994). Ce faisant, le profil disparate de la

régulation des ARNm de NPPA marque de manière différentielle l'hypertrophie cardiaque physiologique et pathologique. L'accumulation de l'ANP n'est donc pas une conséquence univoque de l'hypertrophie, étant principalement un indicateur sensitif de la réponse précoce du tissu cardiaque aux stimuli hémodynamiques pathologiques (Dagnino et al. 1992 ; Ecartot-Laubriet et al. 2000). Dans la présente étude, la surexpression de GATA4 dans les cardiomyocytes n'entraîne pas l'augmentation de l'expression d'ANP ou de ses ARNm (figures 9B et 11, respectivement). En accord avec les résultats obtenus et la littérature, il serait possible de croire que le facteur de transcription GATA4 soit impliqué dans une réponse hypertrophique de nature physiologique plutôt que pathologique.

#### **4.2 Domaines fonctionnels de GATA4 impliqués dans l'hypertrophie cardiaque**

Des analyses structure-fonction de la protéine GATA4 ont permis de démontrer que la partie C-terminale, incluant les deux doigts de zinc, est une région bifonctionnelle modulant entre autres sa liaison à l'ADN et son activité de localisation nucléaire (SLN) (Morrissey et al. 1997 ; Charron et al. 1999). Les doigts de zinc sont également nécessaires pour l'interaction entre GATA4 et d'autres protéines comme certains cofacteurs (*e.g.* MEF2 et SRF) (Morin et al. 2000 ; Morin et al. 2001). Aussi, le domaine de transactivation C-terminal contient plusieurs sites permettant la phosphorylation de GATA4 par certaines protéines kinases et subséquemment, la régulation de son activité transcriptionnelle (Temsah et Nemer, 2005). La partie N-terminale, elle, contient deux domaines d'activation

transcriptionnelle conservés à l'intérieur des sous-familles de GATA4/5/6, qui seraient importants pour l'expression génique lors du développement et de la réponse au stress (Morrisey et al. 1997 ; Suzuki, 2003).

Dans le cœur adulte, nous savons que l'activité de GATA4 est entre autres contrôlée par les MAPK p38 et ERK1/2 en présence de stress des parois ventriculaires (Charron et al. 2001; Tenhunen et al. 2004). Plus particulièrement, la sérine 105 du domaine N-terminal représente un site de phosphorylation consensus critique lors de la réponse aux MAPK, et pourrait être impliqué dans la réponse hypertrophique et/ou la survie cellulaire (Charron et al. 2001 ; Liang et al. 2001 ; Suzuki et Evans, 2004). Pour cette raison, nous avons concentré cette recherche sur la région N-terminale de GATA4 et particulièrement sur les sites associés à la phosphorylation de S105. Dans la présente étude, les cardiomyocytes néonataux infectés par l'adénovirus mutant S105A de GATA4 présentent un phénotype de réorganisation cytosquelettique différent de la souche sauvage de GATA4 (figure 10A). En effet, de manière généralisée, on observe une « désorganisation » des filaments d'actine polymérisée, suggérant que l'hypertrophie semble incomplète et lacunaire. De plus, les cardiomyocytes infectés par l'adénovirus mutant F108A de GATA4 présentent un phénotype notablement similaire à celui induit par le mutant S105A (Figure 10A).

Nous avons déjà montré que la phénylalanine en position 108 serait un site de liaison des MAPK, nécessaire pour leur amarrage sur la protéine GATA4 (Charron et al. 2001). Ce type de site de liaison, aussi connu sous le nom de site de *docking*, régule

l'efficacité, ainsi que la spécificité des réactions enzymatiques, et serait aussi d'une grande importance pour la commande et l'intégration du signal lors des cascades intracellulaires (Tanoue et Nishida 2002). La similarité des phénotypes des deux mutants S105A et F108A appuie notre hypothèse sur la fonction du site F108 comme site de liaison aux MAPK, puisque l'induction de l'hypertrophie ne se fait pas proprement pour les deux mutants, comparativement avec la souche sauvage de GATA4 (figure 10A). Toutefois, la surexpression de GATA4 comparativement à celle des mutants S105A et F108A dans les cardiomyocytes n'entraîne pas de divergences significatives concernant l'expression des ARNm des protéines du cytosquelette, *i.e.*  $\alpha$ -SkA,  $\alpha$ -MHC,  $\beta$ -MHC et  $\alpha$ -Ca (figure 11).

Les cardiomyocytes infectés par les deux mutants (S105A et F108A) de GATA4 présentent une réduction de l'intensité de l'hypertrophie comparativement à la souche sauvage de GATA4 (figure 10A), concordant avec le fait que ces deux mutants ont des activités transcriptionnelles réduites. Similairement, des études *in vivo* démontrent que des délétions de GATA4 spécifiques au cœur atténuent la réponse adaptative suivant la surcharge de pression ou l'exercice soutenu (Oka et al. 2006). Ces résultats *in vitro* et *in vivo* pourraient suggérer l'implication de certains facteurs de transcription dans la réponse hypertrophique des cardiomyocytes, qui seraient recrutés par GATA4 phosphorylé, pour induire l'hypertrophie cardiaque. Des cofacteurs connus de GATA4, tel que *c-fos* interagissent avec GATA4 via la région N-terminale et cette interaction est améliorée en présence de MAPK (McBride et al. 2003). Effectivement, on observe la perte de l'interaction fonctionnelle entre GATA4 et *c-fos* lorsque les acides aminés 93 à 200 de

GATA4 sont délétés, et on remarque aussi une diminution significative de la synergie des deux facteurs de transcription lorsque le site de phosphorylation S105 de GATA4 est muté (McBride et al. 2003). Ainsi, il est possible de supposer que la mutation des sites S105 et F108 entraîne l'altération de l'activité synergique de GATA4 avec différents facteurs de transcription lors du processus de réorganisation cellulaire, atténuant et affaiblissant ainsi la réponse hypertrophique. Ceci nous porte à croire que les MAPK pourraient réguler l'interaction combinatoire des facteurs nucléaires et conséquemment, leur activité transcriptionnelle lors de l'hypertrophie cardiaque.

L'adénovirus mutant G4<sub>(201-440)</sub> présente cependant un scénario différent lors de l'infection des cardiomyocytes (figure 10A). En effet, les cellules ne montrent pas de réorganisation du cytosquelette et s'apparentent plutôt aux cellules infectées par LacZ (figure 9A) ou non infectées (données non montrées). Les domaines de GATA4 impliqués dans la réorganisation cytosquelettique feraient donc partie de la région N-terminale, qui serait nécessaire pour le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de GATA4 lors de l'hypertrophie cardiaque. Cependant, il est possible de croire que d'autres domaines dans la partie N-terminale, différents de S105 et F108, possèdent un rôle plus spécifique sur l'hypertrophie cardiaque. Ainsi, des délétions plus fines au niveau du domaine de transactivation de GATA4 pourraient permettre le criblage des sites responsables de la réorganisation sarcomérique des cardiomyocytes.



L'expression de l'ANP et des ARNm de l'ANP est similaire lorsque l'on compare les immunofluorescences (figure 10B) et les qPCR (figure 11) des cardiomyocytes infectés par les adénovirus GATA4, S105A et F108A. D'un autre côté, l'adénovirus mutant G4<sub>(201-440)</sub> semble activer l'expression de l'ANP à un niveau même plus élevé que le contrôle LacZ (figure 10B). Cependant, cette divergence n'est pas notable pour les niveaux d'ARNm de l'ANP dans les cardiomyocytes infectés par G4<sub>(201-440)</sub> comparativement à LacZ (figure 11). L'augmentation de l'expression de l'ANP pourrait suggérer que la surexpression du mutant G4<sub>(201-440)</sub> serait, à long terme, nocive pour les cellules et que l'augmentation de l'ANP serait, dans ce cas, un indicateur de stress. Les résultats des analyses TUNEL supportent cette idée (figure 13) puisque les cardiomyocytes infectés par l'adénovirus G4<sub>(201-440)</sub> ont un taux de mortalité basal plus élevé que ceux infectés par le contrôle LacZ ou GATA4 WT. Ces résultats seront discutés de manière plus détaillée dans la section de la régulation de la survie des cardiomyocytes.

### **4.3 Rôle de PEX1 dans l'hypertrophie cardiaque**

Notre laboratoire a dernièrement caractérisé un nouveau facteur de transcription, PEX1, qui interagit de manière coopérative et synergique avec GATA4 et SRF pour l'activation du promoteur de l'ANP (Debrus et al. 2005). Ces deux régulateurs majeurs de la machinerie transcriptionnelle cardiaque sont impliqués dans le développement et l'hypertrophie. Selon nos travaux, l'expression de PEX1 est hautement régulée lors du développement cardiaque embryonnaire et postnatal. L'étude du profil d'expression de la

protéine PEX1 suggère que ce facteur cellulaire posséderait un rôle significatif dans le contrôle de la prolifération des cardiomyocytes et/ou dans la réponse des cellules cardiaques aux catécholamines durant le développement (Debrus et al. 2005).

Les résultats obtenus précédemment nous démontrent que PEX1 interagit physiquement et fonctionnellement avec la protéine GATA4, suggérant que cette interaction est critique pour la transduction des effets nucléaires et cytosquelettiques entre autres induits par les agonistes  $\alpha_1$ -adrénergiques (Debrus et al. 2005). De manière consistante avec les résultats obtenus avec l'adénovirus antisens PEX1 qui indiquent que PEX1 est nécessaire à la réponse hypertrophique induite par des agents  $\alpha_1$ -adrénergique (Debrus et al. 2005), nos données montrent que la surexpression de PEX1 est suffisante pour induire l'expression de l'ANP et la réorganisation du cytosquelette (figure 17A). L'effet de PEX1 sur le cytosquelette rappelle celui observé lors de la surexpression de GATA4 (figure 9A et 17A), cependant, la surexpression de GATA4 n'entraîne pas l'augmentation de l'ANP dans les cardiomyocytes, alors que la surexpression de PEX1 entraîne l'accumulation du peptide natriurétique. Ainsi, ces données pourraient suggérer que PEX1 est impliqué dans une réponse hypertrophique pathologique, tandis que, comme mentionné précédemment, GATA4 serait un effecteur de l'hypertrophie physiologique. Des données non publiées de notre laboratoire indiquent que la surexpression de PEX1 au niveau cardiaque, dans des souris transgéniques  $\alpha$ -MHC-PEX1, engendre des problèmes cardiovasculaires létaux au niveau embryonnaire et supportent donc notre conclusion.

Par ailleurs, nous avons précédemment démontré que GATA4 et SRF interagissaient de manière synergique lors de la réponse du promoteur de l'ANP à l'ET-1 (Morin et al 2001), ainsi que pour l'activation des gènes  $\alpha$ -SkA et  $\alpha$ -Ca (Belaguli et al. 2000). Dernièrement, nous avons trouvé que la transcription des gènes  $\alpha$ -SkA,  $\alpha$ -Ca et  $\beta$ -MHC, qui contiennent tous dans leurs promoteurs respectifs, des éléments PERE, GATA et SRE, est activée de façon synergique par PEX1 avec GATA4 et/ou SRF (Komati et al. en cours). Afin d'améliorer la compréhension de la relation entre GATA4 et PEX1, nous avons évalué l'effet de la surexpression de PEX1 sur la protéine GATA4 et *vice versa*. La surexpression de GATA4 ainsi que celle des mutants S105A et F108A dans les cardiomyocytes activent l'expression de PEX1 au niveau des ARNm et de la protéine (figure 18A et B panneau gauche). Par ailleurs, la surexpression de PEX1 dans les myocytes cardiaques entraîne également l'augmentation de l'expression de GATA4 (figure 18B panneau droit). Ainsi, ces deux facteurs de transcription feraient partie d'une boucle de régulation mutuelle et convergente. Les études *in vitro* de structure/fonction démontrent que la partie N-terminale de GATA4 (1-209) n'est pas nécessaire pour la synergie GATA4-PEX1 sur le promoteur de l'ANP, tandis que la partie C-terminal (333-440) semble primordiale pour l'activité synergique PEX1-GATA4 (Debrus et al. 2005). Toutefois, on n'observe pas d'augmentation des ARNm de PEX1 lors de la surexpression de l'adénovirus G4<sub>(201-440)</sub> dans les cardiomyocytes (figure 18A). Ces résultats pourraient suggérer que les domaines fonctionnels de GATA4 requis pour induire l'ANP et PEX1 sont distincts ou que les domaines cartographiés *in vitro* doivent être confirmés *in vivo*. Il est aussi possible que

l'effet activateur de GATA4 sur PEX1 soit indirect et requiert l'induction d'autres médiateurs associés à l'hypertrophie.

Il serait donc intéressant d'étudier plus en profondeur les interactions combinatoires entre les deux protéines en effectuant des co-infections dans les cardiomyocytes de différentes délétions de la protéine GATA4 avec la protéine PEX1, afin de spécifier *in vivo*, les sites de GATA4 nécessaires pour la réorganisation du cytosquelette et ceux requis pour activer PEX1. Néanmoins, l'ensemble du travail décrit dans ce mémoire supporte un rôle essentiel de PEX1 dans l'hypertrophie cardiaque et possiblement, via l'augmentation de GATA4, dans la survie des cardiomyocytes.

#### **4.4 Régulation de la survie des cardiomyocytes**

Durant les dernières années, l'accumulation de plusieurs données a permis d'identifier GATA4 comme régulateur essentiel de la survie des cardiomyocytes. En effet, la diminution de GATA4 augmente l'apoptose dans les cardiomyocytes *in vitro* et *in vivo* (Aries et al. 2004). De plus, le traitement de cardiomyocytes avec des agents cytotoxiques de la famille des anthracyclines comme la daunorubicine ou la doxorubicine, diminue l'expression de la protéine et des ARNm de GATA4 et inhibe son activité transcriptionnelle (Kim et al. 2003 ; Aries et al. 2004). La surexpression de GATA4 dans des cardiomyocytes traités avec la doxorubicine protège les cellules de la mort cellulaire (figure 12A et B). De manière consistante avec les expériences décrites précédemment (Aries et al. 2004). La

surexpression de GATA4 WT dans les cardiomyocytes entraîne l'augmentation de l'expression de la protéine Bcl-X<sub>L</sub> (figure 14). Le promoteur de Bcl-X<sub>L</sub> contient des éléments GATA (figure 15A) et il a été démontré que certains facteurs de croissance régulent l'expression de GATA4 ainsi que sa liaison à l'ADN (Aries et al. 2004 ; Suzuki et Evans 2004). De manière intéressante, l'expression *in vivo* du facteur de croissance du foie (HGF), un agent cardioprotecteur agissant entre autres via l'activation de la protéine anti-apoptotique Bcl-X<sub>L</sub>, est augmentée après l'ischémie-reperfusion myocardique et l'infarctus du myocarde (Ono et al. 1997 ; Nakamura et al. 2000). Ceci supporte donc nos résultats qui suggèrent que l'effet anti-apoptotique de la surexpression de GATA4 dans les cardiomyocytes en condition de stress serait dû en partie à l'activation de Bcl-X<sub>L</sub>.

D'autre part, nous pouvons constater que la surexpression des mutants S105A, F108A et G4<sub>(201-440)</sub> dans les cardiomyocytes entraîne la perte significative ( $P \leq 0.05$ ) de la cardioprotection que confère GATA4 lors des traitements de DOX (figure 12B et 13). De plus, les transfections et cotransfections transitoires démontrent une réduction de l'activation du promoteur de Bcl-X<sub>L</sub> pour les trois mutants de GATA4, comparativement à la souche sauvage (figure 15B et C). On assiste aussi à la réduction de l'expression de la protéine Bcl-X<sub>L</sub> dans les extraits nucléaires des cardiomyocytes infectés avec les trois adénovirus mutants S105A, F108A et G4<sub>(201-440)</sub>, ne retrouvant dans ce dernier que la forme inactive Bcl-X<sub>S</sub> (figure 14). Il a été recensé que HGF stimulait la voie MEK/ERK et entraînait la phosphorylation au site S105 de GATA4, de même que l'activation de Bcl-X<sub>L</sub> (Kitta et al. 2003). Ceci supporte nos résultats qui démontrent que le domaine de

transactivation N-terminal de GATA4 est primordial pour l'activité anti-apoptotique de la protéine, et qu'elle serait entre autres régulée par l'activité des MAPK via le site S105, de même que le site de liaison des MAPK, F108. D'autres études ont aussi rapporté que la signalisation déclenchée par HGF entraîne la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique Bad via PI3K/AKT, résultant en son inactivation et l'induction de Bcl-X<sub>L</sub> (Liu 1999). Notre laboratoire a dernièrement trouvé que l'interleukine 18, une cytokine pléiotropique qui possède des propriétés pro-inflammatoires et pro-apoptotiques, entraîne un mécanisme de défense cellulaire par la voie PI3K-PDK-AKT-GATA4 (Chandrasekar et al. 2005). Il est intéressant de noter que le site F108 de la protéine GATA4, en plus de lier les MAPK, chevauche un motif de liaison PDK, qui pourrait être impliqué dans la réponse de la survie cellulaire de la voie PI3K/AKT. Ainsi, la mutation F108A pourrait abroger les deux voies de signalisation potentiellement impliquées dans la survie des cardiomyocytes. Il est également important de constater que les trois adénovirus mutants entraînent une augmentation significative ( $P \leq 0.05$ ) de l'apoptose en absence de traitement de DOX comparativement à LacZ ou GATA4 (figure 13). Ceci met l'accent sur l'importance de GATA4 dans la régulation normale de la survie cellulaire, suggérant que les sites mutés (S105 et F108) ainsi que la partie N-terminale sont d'une importance critique pour l'homéostasie de la machinerie transcriptionnelle impliquée dans les voies de signalisation de l'apoptose dans les cardiomyocytes. Il est important de souligner que les sites S105 et F108 semblent avoir un plus faible impact sur le processus d'hypertrophie des cardiomyocytes comparativement à la survie cellulaire. En effet, la surexpression des mutants de ces sites dans les cardiomyocytes n'abroge pas la réorganisation cellulaire

comme le fait le mutant délété en N-terminal, tandis que l'expression des mutants S105 et F108 entraîne la perte de la cardioprotection au même niveau que la surexpression de G4<sub>(201-440)</sub>. Ceci suggère que d'autres domaines, situés dans la partie N-terminale, moduleraient l'activité transcriptionnelle de GATA4 reliée à l'hypertrophie, dissociant ainsi les domaines impliqués dans la survie cellulaire, des domaines responsables de la réponse hypertrophique.

Dans la signalisation anti-apoptotique, il a été trouvé que GATA4 interagissait de concert avec d'autres facteurs de transcription comme NFATc. En effet, des études ont démontré que l'ET-1 entraîne la phosphorylation de GATA4 ainsi que l'activation calcineurine-dépendante de NFATc pour la protection contre l'apoptose induite par le stress (Kakita et al. 2001). L'identification des gènes cibles requérant l'activation par le complexe GATA/NFATc serait d'un grand intérêt pour la compréhension des voies de signalisation dans la cardioprotection et l'identification des facteurs de transcription de la réponse au stress. L'interaction GATA4-NFATc est également importante pour l'hypertrophie cardiaque, nécessitant possiblement le doigt de zinc C-terminal de la protéine GATA4 (Molkentin et al. 1998). Il serait intéressant de déterminer avec plus de précision les résidus de GATA4 impliqués dans cette interaction et si ces mêmes domaines de GATA4 sont requis pour la réponse hypertrophique et/ou la survie cellulaire. Ceci aiderait à définir le rôle de l'interaction GATA4-NFATc comme modulatrice de l'hypertrophie ou de la survie des cardiomyocytes.

Les phases d'initiation et d'exécution du processus de l'apoptose impliquent généralement l'activation d'une famille de protéases cystéines aspartate-spécifique appelées caspases. L'activité de la caspase-3 est reconnue pour être impliquée dans l'apoptose induite par différentes pathologies comme les cardiomyopathies dilatées, l'insuffisance cardiaque terminale et les dommages d'ischémie reperfusion (Yaoita et al. 1998 ; Narula et al. 1999). Les travaux récents du *KO* partiel de GATA4 spécifiquement au cœur démontrent que l'absence de GATA4 entraîne l'augmentation de la caspase-12 dans le cœur des souris transgéniques (Oka et al. 2006). Il est connu que la caspase-12 est un médiateur de la voie apoptotique reliée au stress du réticulum endoplasmique (Bisping et al. 2006) et son activation serait dépendante de l'activité de Bcl-X<sub>L</sub>, via la translocation de Bim dans le réticulum (Morishima et al. 2004). Effectivement, la surexpression de Bcl-X<sub>L</sub> dans des clones stables de C2C12 supprime la translocation de Bim dans le réticulum endoplasmique, tandis que le *knock-down* de Bim par interférence d'ARN (ARNi) confère une résistance contre le stress relié au réticulum endoplasmique, associée à la diminution de l'expression de la caspase-12 (Morishima et al. 2004). Ainsi, il est possible de supposer que GATA4 est un facteur de transcription situé en amont de la cascade de l'apoptose reliée au stress du réticulum endoplasmique et que son inactivation entraîne la mort cellulaire via la diminution de l'expression de Bcl-X<sub>L</sub>, ainsi que l'activation concomitante de Bim et de la caspase-12. D'autre part, la DOX est reconnue pour augmenter, entre autres, l'activité de la caspase-3 (Ascensao et al. 2005). De façon intéressante, une étude de notre laboratoire démontre que certaines caspases clivent GATA4 à des endroits bien spécifiques de la protéine (Aries et Nemer, résultats non publiés) et pourraient participer à l'inhibition de



son activité dans les cardiomyocytes, entraînant ainsi une boucle de régulation qui amplifie l'apoptose.

Les analyses TUNEL ont également permis de souligner que la surexpression de PEX1 dans les cardiomyocytes traités à la doxorubicine entraîne une réduction du nombre de cellules apoptotiques (figure 19) qui est très rapprochée de la cardioprotection induite par la surexpression de GATA4. Puisque PEX1 augmente l'expression de la protéine GATA4 (figure 18B panneau droit), il est possible de croire que l'activité anti-apoptotique conférée par la surexpression de PEX1 se ferait via l'activation de GATA4. Toutefois, la surexpression de PEX1 dans les cardiomyocytes ne semble pas réguler la protéine anti-apoptotique Bcl-X<sub>L</sub> (données non montrées), suggérant l'existence d'autres mécanismes impliqués dans les voies de signalisation anti-apoptotiques cardiaques. À l'avenir, il serait intéressant de déterminer si les domaines de PEX1 impliqués dans l'interaction avec GATA4 sont aussi requis pour son effet anti-apoptotique. D'ici là, la découverte que PEX1 est également impliqué dans la survie des cardiomyocytes ouvrent des pistes intéressantes pour la cardioprotection.

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES FUTURES**

Pris dans leur ensemble, les résultats de ce mémoire suggèrent que l'activité transcriptionnelle de la protéine GATA4 lors de la réorganisation cytosquelettique serait principalement régulée par des domaines situés dans la partie N-terminale de la protéine. En effet, la surexpression adéovirale du mutant délété de cette partie abroge la réorganisation du sarcomères des cardiomyocytes. Le site de phosphorylation S105, ainsi que le site de liaison des MAPK F108, participeraient à la fonction de GATA4 comme effecteur de la réorganisation sarcomérique, mais il semblerait que ces sites sont beaucoup plus étroitement reliés au rôle de GATA4 dans la survie cellulaire. La surexpression des mutants pour ces sites déstabilise la réorganisation cellulaire des cardiomyocytes comparativement à la surexpression de GATA4 WT, mais ne la bloque pas totalement. Ces données indiquent donc que d'autres régions de la protéine GATA4 seraient importantes pour la réorganisation du cytosquelette et, plus globalement, pour la réponse hypertrophique. Selon les résultats de cette étude, il semblerait que GATA4 soit modulateur de la réponse hypertrophique physiologique, tandis que PEX1 serait plutôt impliqué dans une réponse pathologique. Cependant, ce rapport démontre que ces deux facteurs de transcription interagissent mutuellement dans les mécanismes reliés à l'hypertrophie et la survie des cardiomyocytes. L'élucidation des mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation des protéines GATA4 et PEX1 est une tâche très complexe, mais l'accumulation de données à ce sujet pourrait éventuellement nous mener à une meilleure

compréhension des programmes régulateurs transcriptionnels combinatoires impliqués dans la réponse hypertrophique de même qu'au niveau de la cardioprotection.

Pour approfondir les connaissances sur les domaines fonctionnels de la protéine GATA4, il serait intéressant de générer différents adénovirus surexprimant des délétions plus fines de la partie N-terminale de GATA4 pour cribler les régions impliquées dans l'hypertrophie cardiaque. Par la suite, il serait possible de muter la protéine aux sites putatifs aux MAPK identifiés (*e.g.* la tyrosine en position 100) et de vérifier si leur surexpression dans les cardiomyocytes bloque la réorganisation cytosquelettique. De plus, l'utilisation du modèle de surexpression adénovirale ne se limite pas aux études *in vitro*. Effectivement, nous entretenons présentement un partenariat avec un groupe de recherche spécialisé dans l'utilisation d'adénovirus *in vivo*, permettant d'effectuer des études de gain et de perte de fonction de gènes cibles dans des organes spécifiques. Ainsi, on pourrait à l'avenir utiliser cette approche pour évaluer l'effet de la surexpression cardiaque des mutants S105A et F108A dans le développement embryonnaire et postnatal du cœur de souris et subséquemment pour vérifier l'implication de ces sites dans le développement de l'hypertrophie cardiaque, ainsi que dans la survie cardiomyocytaire. Par ailleurs, les résultats présentés dans ce mémoire justifient pleinement le développement de souris transgéniques dans lesquelles le gène GATA4 aurait été muté à la sérine 105 par recombinaison homologue (*knock-in*).

D'autre part, la découverte que PEX1 induit la réorganisation des cardiomyocytes et protège contre l'apoptose mérite d'être poursuivie. Des études de perte et de gain de fonction de PEX1 *in vivo* dans le cœur pour établir l'importance physiologique de ce nouveau facteur de transcription dans les myocytes sont essentielles. Des données non publiées de notre laboratoire nous ont indiqué que la surexpression de PEX1, sous l'influence du promoteur  $\alpha$ -MHC dans des souris transgéniques, engendrait une létalité embryonnaire. Le dosage précis de PEX1 semble donc critique pour le développement embryonnaire. Afin de ne pas perturber le développement fœtal, nous avons établi une lignée de souris issue du croisement de souris  $\alpha$ -MHC-MER/CRE/MER (*murine estrogen receptor*) avec des souris CAT<sup>(FL/FL)</sup>-PEX1, permettant d'induire conditionnellement PEX1 dans le cœur. L'induction au tamoxifène permet de retirer le gène CAT (*chloramphenicol acetyl transferase*), via l'activité de la CRE-recombinase, et de surexprimer PEX1 de manière contrôlée. Ainsi, PEX1 pourra être induit tôt dans la vie postnatale ou alors plus tard chez des animaux adultes. Ceci permettra de mieux cibler le rôle de PEX1 *in vivo* dans l'hypertrophie et de déterminer son rôle dans le développement pathologique ou physiologique du cœur. En parallèle, il sera aussi utile d'analyser les conséquences de la délétion de PEX1 dans des souris KO. Ceci aidera à identifier l'importance de PEX1 au niveau embryonnaire et lors du développement postnatal, dépendamment de la viabilité des souris. L'utilisation d'adénovirus surexprimant PEX1 et l'antisens PEX1 dans les souris pourrait également fournir des renseignements intéressants quant aux fonctions physiologiques de cette protéine dans le cœur.

L'ensemble de ces expériences, qui constituent la suite logique de ce mémoire permettrait de mieux comprendre les mécanismes transcriptionnels reliés aux protéines GATA4 et PEX1 dans le cœur et leurs rôles respectifs dans l'hypertrophie cardiaque physiologique, ainsi que pathologique. C'est en ciblant les effecteurs modulateurs cardiaques de l'hypertrophie et de la survie des cardiomyocytes que nous parviendrons à établir des stratégies préventives et/ou thérapeutiques pour contrer certaines maladies cardiovasculaires.

## BIBLIOGRAPHIE

Adderley, S.R., et Fitzgerald, D.J. (1999). Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2. *The Journal of biological chemistry* 274, 5038-5046.

Aikawa, R., Komuro, I., Yamazaki, T., Zou, Y., Kudoh, S., Tanaka, M., Shiojima, I., Hiroi, Y., et Yazaki, Y. (1997). Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *The Journal of clinical investigation* 100, 1813-1821.

Aikawa, R., Komuro, I., Yamazaki, T., Zou, Y., Kudoh, S., Zhu, W., Kadowaki, T., et Yazaki, Y. (1999). Rho family small G proteins play critical roles in mechanical stress-induced hypertrophic responses in cardiac myocytes. *Circulation research* 84, 458-466.

Akazawa, H., et Komuro, I. (2003). Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circulation research* 92, 1079-1088.

Allan, L.A., Morrice, N., Brady, S., Magee, G., Pathak, S., et Clarke, P.R. (2003). Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nature cell biology* 5, 647-654.

Aoyagi, T., et Izumo, S. (1993). Mapping of the pressure response element of the c-fos gene by direct DNA injection into beating hearts. *The Journal of biological chemistry* 268, 27176-27179.

Arai, K., Maruyama, Y., Nishida, M., Tanabe, S., Takagahara, S., Kozasa, T., Mori, Y., Nagao, T., et Kurose, H. (2003). Differential requirement of G alpha12, G alpha13, G alphaq, and G beta gamma for endothelin-1-induced c-Jun NH2-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase activation. *Molecular pharmacology* 63, 478-488.

Aramburu, J., Garcia-Cozar, F., Raghavan, A., Okamura, H., Rao, A., et Hogan, P.G. (1998). Selective inhibition of NFATC activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFATC. *Molecular cell* 1, 627-637.

Aramburu, J., Yaffe, M.B., Lopez-Rodriguez, C., Cantley, L.C., Hogan, P.G., et Rao, A. (1999). Affinity-driven peptide selection of an NFATC inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science (New York, NY)* 285, 2129-2133.

Ardati, A., et Nemer, M. (1993). A nuclear pathway for alpha 1-adrenergic receptor signaling in cardiac cells. *The EMBO journal* 12, 5131-5139.

Arden, K.C., Viars, C.S., Weiss, S., Argentin, S., et Nemer, M. (1995). Localization of the human B-type natriuretic peptide precursor (NPPB) gene to chromosome 1p36. *Genomics* 26, 385-389.

Aries, A., Paradis, P., Lefebvre, C., Schwartz, R.J., et Nemer, M. (2004). Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 6975-6980.

Ascensao, A., Magalhaes, J., Soares, J.M., Ferreira, R., Neuparth, M.J., Marques, F., Oliveira, P.J., et Duarte, J.A. (2005). Moderate endurance training prevents doxorubicin-induced in vivo mitochondriopathy and reduces the development of cardiac apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H722-731.

Babu, G.J., Lalli, M.J., Sussman, M.A., Sadoshima, J., et Periasamy, M. (2000). Phosphorylation of elk-1 by MEK/ERK pathway is necessary for c-fos gene activation during cardiac myocyte hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology* 32, 1447-1457.

Badrian, B., et Bogoyevitch, M.A. (2007). Gene expression profiling reveals complex changes following MEK-EE expression in cardiac myocytes. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 349-365.

Baines, C.P., et Molkentin, J.D. (2005). STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *Journal of molecular and cellular cardiology* 38, 47-62.

Beals, C.R., Clipstone, N.A., Ho, S.N., et Crabtree, G.R. (1997). Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes & development* 11, 824-834.

Belaguli, N.S., Sepulveda, J.L., Nigam, V., Charron, F., Nemer, M., et Schwartz, R.J. (2000). Cardiac tissue enriched factors serum response factor and GATA-4 are mutual coregulators. *Molecular and cellular biology* 20, 7550-7558.

Belaguli, N.S., Zhou, W., Trinh, T.H., Majesky, M.W., et Schwartz, R.J. (1999). Dominant negative murine serum response factor: alternative splicing within the activation domain inhibits transactivation of serum response factor binding targets. *Molecular and cellular biology* 19, 4582-4591.

Bers, D.M., et Guo, T. (2005). Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1047, 86-98.

Bhattacharya, M., Babwah, A.V., et Ferguson, S.S. (2004). Small GTP-binding protein-coupled receptors. *Biochemical Society transactions* 32, 1040-1044.

Bhavsar, P.K., Dellow, K.A., Yacoub, M.H., Brand, N.J., et Barton, P.J. (2000). Identification of cis-acting DNA elements required for expression of the human cardiac troponin I gene promoter. *Journal of molecular and cellular cardiology* 32, 95-108.

Bienengraeber, M., Olson, T.M., Selivanov, V.A., Kathmann, E.C., O'Coilain, F., Gao, F., Karger, A.B., Ballew, J.D., Hodgson, D.M., Zingman, L.V., et al. (2004). ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating. *Nature genetics* 36, 382-387.

Blaeser, F., Ho, N., Prywes, R., et Chatila, T.A. (2000). Ca(2+)-dependent gene expression mediated by MEF2 transcription factors. *The Journal of biological chemistry* 275, 197-209.

Bogoyevitch, M.A., Andersson, M.B., Gillespie-Brown, J., Clerk, A., Glennon, P.E., Fuller, S.J., et Sugden, P.H. (1996). Adrenergic receptor stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade and cardiac hypertrophy. *The Biochemical journal* 314 ( Pt 1), 115-121.

Bogoyevitch, M.A., Clerk, A., et Sugden, P.H. (1995). Activation of the mitogen-activated protein kinase cascade by pertussis toxin-sensitive and -insensitive pathways in cultured ventricular cardiomyocytes. *The Biochemical journal* 309 ( Pt 2), 437-443.

Bogoyevitch, M.A., Glennon, P.E., et Sugden, P.H. (1993). Endothelin-1, phorbol esters and phenylephrine stimulate MAP kinase activities in ventricular cardiomyocytes. *FEBS letters* 317, 271-275.

Bowman, J.C., Steinberg, S.F., Jiang, T., Geenen, D.L., Fishman, G.I., et Buttrick, P.M. (1997). Expression of protein kinase C beta in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates. *The Journal of clinical investigation* 100, 2189-2195.

Braz, J.C., Bueno, O.F., Liang, Q., Wilkins, B.J., Dai, Y.S., Parsons, S., Braunwart, J., Glascock, B.J., Klevitsky, R., Kimball, T.F., et al. (2003). Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFATC signaling. *The Journal of clinical investigation* 111, 1475-1486.

Brown, J.H., Del Re, D.P., et Sussman, M.A. (2006). The Rac and Rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits. *Circulation research* 98, 730-742.

Bruneau, B.G. (2002). Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circulation research* 90, 509-519.

Brunner, F., Bras-Silva, C., Cerdeira, A.S., et Leite-Moreira, A.F. (2006). Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacology & therapeutics* 111, 508-531.



Bueno, O.F., De Windt, L.J., Lim, H.W., Tymitz, K.M., Witt, S.A., Kimball, T.R., et Molkentin, J.D. (2001). The dual-specificity phosphatase MKP-1 limits the cardiac hypertrophic response in vitro and in vivo. *Circulation research* 88, 88-96.

Bueno, O.F., De Windt, L.J., Tymitz, K.M., Witt, S.A., Kimball, T.R., Klevitsky, R., Hewett, T.E., Jones, S.P., Lefer, D.J., Peng, C.F., et al. (2000). The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *The EMBO journal* 19, 6341-6350.

Bueno, O.F., van Rooij, E., Molkentin, J.D., Doevendans, P.A., et De Windt, L.J. (2002a). Calcineurin and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions. *Cardiovascular research* 53, 806-821.

Bueno, O.F., Wilkins, B.J., Tymitz, K.M., Glascock, B.J., Kimball, T.F., Lorenz, J.N., et Molkentin, J.D. (2002b). Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta - deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 4586-4591.

Burch, J.B. (2005). Regulation of GATA gene expression during vertebrate development. *Seminars in cell & developmental biology* 16, 71-81.

Buttrick, P.M., Kaplan, M., Leinwand, L.A., et Scheuer, J. (1994). Alterations in gene expression in the rat heart after chronic pathological and physiological loads. *Journal of molecular and cellular cardiology* 26, 61-67.

Cao, L., et Gardner, D.G. (1995). Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. *Hypertension* 25, 227-234.

Care, A., Catalucci, D., Felicetti, F., Bonci, D., Addario, A., Gallo, P., Bang, M.L., Segnalini, P., Gu, Y., Dalton, N.D., et al. (2007). MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nature medicine* 13, 613-618.

Chandrasekar, B., Mummidi, S., Claycomb, W.C., Mestral, R., et Nemer, M. (2005). Interleukin-18 is a pro-hypertrophic cytokine that acts through a phosphatidylinositol 3-kinase-phosphoinositide-dependent kinase-1-Akt-GATA4 signaling pathway in cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry* 280, 4553-4567.

Charron, F., et Nemer, M. (1999). GATA transcription factors and cardiac development. *Seminars in cell & developmental biology* 10, 85-91.

Charron, F., Paradis, P., Bronchain, O., Nemer, G., et Nemer, M. (1999). Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression. *Molecular and cellular biology* 19, 4355-4365.

Charron, F., Tsimiklis, G., Arcand, M., Robitaille, L., Liang, Q., Molkentin, J.D., Meloche, S., et Nemer, M. (2001). Tissue-specific GATA factors are transcriptional effectors of the small GTPase RhoA. *Genes & development* 15, 2702-2719.

Chen, H.H., et Burnett, J.C. (2000). Natriuretic peptides in the pathophysiology of congestive heart failure. *Current cardiology reports* 2, 198-205.

Chen, M., Guerrero, A.D., Huang, L., Shabier, Z., Pan, M., Tan, T.H., et Wang, J. (2007). Caspase-9-induced Mitochondrial Disruption through Cleavage of Anti-apoptotic BCL-2 Family Members. *The Journal of biological chemistry* 282, 33888-33895.

Chien, K.R. (1999). Stress pathways and heart failure. *Cell* 98, 555-558.

Cho, Y., Somer, B.G., et Amatya, A. (1999). Natriuretic peptides and their therapeutic potential. *Heart disease (Hagerstown, Md)* 1, 305-328.

Choukroun, G., Hajjar, R., Kyriakis, J.M., Bonventre, J.V., Rosenzweig, A., et Force, T. (1998). Role of the stress-activated protein kinases in endothelin-induced cardiomyocyte hypertrophy. *The Journal of clinical investigation* 102, 1311-1320.

Clement, S.A., Tan, C.C., Guo, J., Kitta, K., et Suzuki, Y.J. (2002). Roles of protein kinase C and alpha-tocopherol in regulation of signal transduction for GATA-4 phosphorylation in HL-1 cardiac muscle cells. *Free radical biology & medicine* 32, 341-349.

Clerk, A., Cullingford, T.E., Fuller, S.J., Giraldo, A., Markou, T., Pikkarainen, S., et Sugden, P.H. (2007). Signaling pathways mediating cardiac myocyte gene expression in physiological and stress responses. *Journal of cellular physiology* 212, 311-322.

Clerk, A., Pham, F.H., Fuller, S.J., Sahai, E., Aktories, K., Marais, R., Marshall, C., et Sugden, P.H. (2001). Regulation of mitogen-activated protein kinases in cardiac myocytes through the small G protein Rac1. *Molecular and cellular biology* 21, 1173-1184.

Clerk, A., et Sugden, P.H. (2000). Small guanine nucleotide-binding proteins and myocardial hypertrophy. *Circulation research* 86, 1019-1023.

Cobb, M.H. (1999). MAP kinase pathways. *Progress in biophysics and molecular biology* 71, 479-500.

Crackower, M.A., Oudit, G.Y., Kozieradzki, I., Sarao, R., Sun, H., Sasaki, T., Hirsch, E., Suzuki, A., Shioi, T., Irie-Sasaki, J., et al. (2002). Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* 110, 737-749.

Crow, M.T., Mani, K., Nam, Y.J., et Kitsis, R.N. (2004). The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circulation research* 95, 957-970.

D'Angelo, D.D., Sakata, Y., Lorenz, J.N., Boivin, G.P., Walsh, R.A., Liggett, S.B., et Dorn, G.W., 2nd (1997). Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 8121-8126.

Dagnino, L., Drouin, J., et Nemer, M. (1991). Differential expression of natriuretic peptide genes in cardiac and extracardiac tissues. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 5, 1292-1300.

Dagnino, L., Lavigne, J.P., et Nemer, M. (1992). Increased transcripts for B-type natriuretic peptide in spontaneously hypertensive rats. Quantitative polymerase chain reaction for atrial and brain natriuretic peptide transcripts. *Hypertension* 20, 690-700.

Davis, F.J., Gupta, M., Pogwizd, S.M., Bacha, E., Jeevanandam, V., et Gupta, M.P. (2002). Increased expression of alternatively spliced dominant-negative isoform of SRF in human failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282, H1521-1533.

De Windt, L.J., Lim, H.W., Haq, S., Force, T., et Molkentin, J.D. (2000a). Calcineurin promotes protein kinase C and c-Jun NH2-terminal kinase activation in the heart. Cross-talk between cardiac hypertrophic signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* 275, 13571-13579.

De Windt, L.J., Lim, H.W., Taigen, T., Wencker, D., Condorelli, G., Dorn, G.W., 2nd, Kitsis, R.N., et Molkentin, J.D. (2000b). Calcineurin-mediated hypertrophy protects cardiomyocytes from apoptosis in vitro and in vivo: An apoptosis-independent model of dilated heart failure. *Circulation research* 86, 255-263.

Debrus, S., Rahbani, L., Marttila, M., Delorme, B., Paradis, P., et Nemer, M. (2005). The zinc finger-only protein Zfp260 is a novel cardiac regulator and a nuclear effector of alpha1-adrenergic signaling. *Molecular and cellular biology* 25, 8669-8682.

Dempsey, E.C., Newton, A.C., Mochly-Rosen, D., Fields, A.P., Reyland, M.E., Insel, P.A., et Messing, R.O. (2000). Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L429-438.

Derijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.H., Han, J., Ulevitch, R.J., et Davis, R.J. (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science (New York, NY)* 267, 682-685.

Dodou, E., Verzi, M.P., Anderson, J.P., Xu, S.M., et Black, B.L. (2004). Mef2c is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development. *Development (Cambridge, England)* 131, 3931-3942.

- Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S., Goodnow, C.C., et Healy, J.I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature* 386, 855-858.
- Dorn, G.W., 2nd, et Force, T. (2005). Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *The Journal of clinical investigation* 115, 527-537.
- Dostal, D.E. (2000). The cardiac renin-angiotensin system: novel signaling mechanisms related to cardiac growth and function. *Regulatory peptides* 91, 1-11.
- Downward, J. (1998). Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Current opinion in cell biology* 10, 262-267.
- Drazner, M.H., Peppel, K.C., Dyer, S., Grant, A.O., Koch, W.J., et Lefkowitz, R.J. (1997). Potentiation of beta-adrenergic signaling by adenoviral-mediated gene transfer in adult rabbit ventricular myocytes. *The Journal of clinical investigation* 99, 288-296.
- Durocher, D., Charron, F., Warren, R., Schwartz, R.J., et Nemer, M. (1997). The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *The EMBO journal* 16, 5687-5696.
- Ecarnot-Laubriet, A., De Luca, K., Vandroux, D., Moisan, M., Bernard, C., Assem, M., Rochette, L., et Teyssier, J.R. (2000). Downregulation and nuclear relocation of MLP during the progression of right ventricular hypertrophy induced by chronic pressure overload. *Journal of molecular and cellular cardiology* 32, 2385-2395.
- Engel, F.B., Schebesta, M., Duong, M.T., Lu, G., Ren, S., Madwed, J.B., Jiang, H., Wang, Y., et Keating, M.T. (2005). p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes & development* 19, 1175-1187.
- Engelhardt, S., Hein, L., Wiesmann, F., et Lohse, M.J. (1999). Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 7059-7064.
- Esler, M., Kaye, D., Lambert, G., Esler, D., et Jennings, G. (1997). Adrenergic nervous system in heart failure. *The American journal of cardiology* 80, 7L-14L.
- Esposito, G., Rapacciuolo, A., Naga Prasad, S.V., Takaoka, H., Thomas, S.A., Koch, W.J., et Rockman, H.A. (2002). Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. *Circulation* 105, 85-92.

- Fauvel, H., Marchetti, P., Chopin, C., Formstecher, P., et Nevriere, R. (2001). Differential effects of caspase inhibitors on endotoxin-induced myocardial dysfunction and heart apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H1608-1614.
- Firestein, S. (2001). How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413, 211-218.
- Force, T., et Bonventre, J.V. (1998). Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension* 31, 152-161.
- Franke, T.F., Hornik, C.P., Segev, L., Shostak, G.A., et Sugimoto, C. (2003). PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 22, 8983-8998.
- Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C., et Toker, A. (1997). Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science (New York, NY)* 275, 665-668.
- Fuller, S.J., Davies, E.L., Gillespie-Brown, J., Sun, H., et Tonks, N.K. (1997). Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 inhibits the stimulation of gene expression by hypertrophic agonists in cardiac myocytes. *The Biochemical journal* 323 ( Pt 2), 313-319.
- Fuller, S.J., Finn, S.G., Downward, J., et Sugden, P.H. (1998). Stimulation of gene expression in neonatal rat ventricular myocytes by Ras is mediated by Ral guanine nucleotide dissociation stimulator (Ral.GDS) and phosphatidylinositol 3-kinase in addition to Raf. *The Biochemical journal* 335 ( Pt 2), 241-246.
- Gether, U. (2000). Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocrine reviews* 21, 90-113.
- Gething, M.J., et Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45.
- Goldberg, M., Zhang, H.L., et Steinberg, S.F. (1997). Hypoxia alters the subcellular distribution of protein kinase C isoforms in neonatal rat ventricular myocytes. *The Journal of clinical investigation* 99, 55-61.
- Gove, C., Walmsley, M., Nijjar, S., Bertwistle, D., Guille, M., Partington, G., Bomford, A., et Patient, R. (1997). Over-expression of GATA-6 in Xenopus embryos blocks differentiation of heart precursors. *The EMBO journal* 16, 355-368.
- Gray, M.O., Karliner, J.S., et Mochly-Rosen, D. (1997). A selective epsilon-protein kinase C antagonist inhibits protection of cardiac myocytes from hypoxia-induced cell death. *The Journal of biological chemistry* 272, 30945-30951.

Grepin, C., Dagnino, L., Robitaille, L., Haberstroh, L., Antakly, T., et Nemer, M. (1994). A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Molecular and cellular biology* 14, 3115-3129.

Grepin, C., Nemer, G., et Nemer, M. (1997). Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor. *Development (Cambridge, England)* 124, 2387-2395.

Grepin, C., Robitaille, L., Antakly, T., et Nemer, M. (1995). Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks in vitro cardiac muscle differentiation. *Molecular and cellular biology* 15, 4095-4102.

Gupta, M., Zak, R., Libermann, T.A., et Gupta, M.P. (1998). Tissue-restricted expression of the cardiac alpha-myosin heavy chain gene is controlled by a downstream repressor element containing a palindrome of two ets-binding sites. *Molecular and cellular biology* 18, 7243-7258.

Gupta, S., Das, B., et Sen, S. (2007). Cardiac hypertrophy: mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling* 9, 623-652.

Hadcock, J.R., et Malbon, C.C. (1993). Agonist regulation of gene expression of adrenergic receptors and G proteins. *Journal of neurochemistry* 60, 1-9.

Hahn, H.S., Marreez, Y., Odley, A., Sterbling, A., Yussman, M.G., Hilty, K.C., Bodi, I., Liggett, S.B., Schwartz, A., et Dorn, G.W., 2nd (2003). Protein kinase Calpha negatively regulates systolic and diastolic function in pathological hypertrophy. *Circulation research* 93, 1111-1119.

Hahn, H.S., Yussman, M.G., Toyokawa, T., Marreez, Y., Barrett, T.J., Hilty, K.C., Osinska, H., Robbins, J., et Dorn, G.W., 2nd (2002). Ischemic protection and myofibrillar cardiomyopathy: dose-dependent effects of in vivo deltaPKC inhibition. *Circulation research* 91, 741-748.

Hambleton, M., Hahn, H., Pleger, S.T., Kuhn, M.C., Klevitsky, R., Carr, A.N., Kimball, T.F., Hewett, T.E., Dorn, G.W., 2nd, Koch, W.J., et al. (2006). Pharmacological- and gene therapy-based inhibition of protein kinase Calpha/beta enhances cardiac contractility and attenuates heart failure. *Circulation* 114, 574-582.

Han, J., Jiang, Y., Li, Z., Kravchenko, V.V., et Ulevitch, R.J. (1997). Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* 386, 296-299.

Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L., et Ulevitch, R.J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science (New York, NY)* 265, 808-811.

Haneda, M., Sugimoto, T., et Kikkawa, R. (1999). Mitogen-activated protein kinase phosphatase: a negative regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *European journal of pharmacology* 365, 1-7.

Hanford, D.S., Thuerauf, D.J., Murray, S.F., et Glembotski, C.C. (1994). Brain natriuretic peptide is induced by alpha 1-adrenergic agonists as a primary response gene in cultured rat cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 269, 26227-26233.

Haq, S., Choukroun, G., Kang, Z.B., Ranu, H., Matsui, T., Rosenzweig, A., Molkenin, J.D., Alessandrini, A., Woodgett, J., Hajjar, R., et al. (2000). Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *The Journal of cell biology* 151, 117-130.

Haq, S., Choukroun, G., Lim, H., Tymitz, K.M., del Monte, F., Gwathmey, J., Grazette, L., Michael, A., Hajjar, R., Force, T., et al. (2001). Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation* 103, 670-677.

Harada, H., Quearry, B., Ruiz-Vela, A., et Korsmeyer, S.J. (2004). Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15313-15317.

Harding, H.P., Zhang, Y., et Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271-274.

Hardt, S.E., et Sadoshima, J. (2002). Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. *Circulation research* 90, 1055-1063.

Harrison, S.N., Autelitano, D.J., Wang, B.H., Milano, C., Du, X.J., et Woodcock, E.A. (1998). Reduced reperfusion-induced Ins(1,4,5)P3 generation and arrhythmias in hearts expressing constitutively active alpha1B-adrenergic receptors. *Circulation research* 83, 1232-1240.

Hasegawa, K., Lee, S.J., Jobe, S.M., Markham, B.E., et Kitsis, R.N. (1997). cis-Acting sequences that mediate induction of beta-myosin heavy chain gene expression during left ventricular hypertrophy due to aortic constriction. *Circulation* 96, 3943-3953.

Hautala, N., Tenhunen, O., Szokodi, I., et Ruskoaho, H. (2002). Direct left ventricular wall stretch activates GATA4 binding in perfused rat heart: involvement of autocrine/paracrine pathways. *Pflugers Arch* 443, 362-369.

Hayashi, A., Seki, N., Hattori, A., Kozuma, S., et Saito, T. (1999). PKC $\nu$ , a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKC $\mu$ . *Biochimica et biophysica acta* 1450, 99-106.

Heidkamp, M.C., Bayer, A.L., Martin, J.L., et Samarel, A.M. (2001). Differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades and apoptosis by protein kinase C epsilon and delta in neonatal rat ventricular myocytes. *Circulation research* 89, 882-890.

Heineke, J., et Molkentin, J.D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature reviews* 7, 589-600.

Heling, A., Zimmermann, R., Kostin, S., Maeno, Y., Hein, S., Devaux, B., Bauer, E., Klovekorn, W.P., Schlepper, M., Schaper, W., et al. (2000). Increased expression of cytoskeletal, linkage, and extracellular proteins in failing human myocardium. *Circulation research* 86, 846-853.

Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., et Karin, M. (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes & development* 7, 2135-2148.

Hoshijima, M., Sah, V.P., Wang, Y., Chien, K.R., et Brown, J.H. (1998). The low molecular weight GTPase Rho regulates myofibril formation and organization in neonatal rat ventricular myocytes. Involvement of Rho kinase. *The Journal of biological chemistry* 273, 7725-7730.

Huang, H., John, S.W., et Steinhilper, M.E. (1996). Organization of the mouse cardiac natriuretic peptide locus encoding BNP and ANP. *Journal of molecular and cellular cardiology* 28, 1823-1828.

Huang, J., Ito, Y., Morikawa, M., Uchida, H., Kobune, M., Sasaki, K., Abe, T., et Hamada, H. (2003). Bcl-xL gene transfer protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Biochemical and biophysical research communications* 311, 64-70.

Hunter, J.J., et Chien, K.R. (1999). Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *The New England journal of medicine* 341, 1276-1283.

Hunter, J.J., Tanaka, N., Rockman, H.A., Ross, J., Jr., et Chien, K.R. (1995). Ventricular expression of a MLC-2 $\nu$ -ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry* 270, 23173-23178.

Ip, H.S., Wilson, D.B., Heikinheimo, M., Tang, Z., Ting, C.N., Simon, M.C., Leiden, J.M., et Parmacek, M.S. (1994). The GATA-4 transcription factor transactivates the cardiac muscle-specific troponin C promoter-enhancer in nonmuscle cells. *Molecular and cellular biology* 14, 7517-7526.



- Ito, M., Yoshioka, K., Akechi, M., Yamashita, S., Takamatsu, N., Sugiyama, K., Hibi, M., Nakabeppu, Y., Shiba, T., et Yamamoto, K.I. (1999). JSAP1, a novel jun N-terminal protein kinase (JNK)-binding protein that functions as a Scaffold factor in the JNK signaling pathway. *Molecular and cellular biology* 19, 7539-7548.
- Izumiya, Y., Kim, S., Izumi, Y., Yoshida, K., Yoshiyama, M., Matsuzawa, A., Ichijo, H., et Iwao, H. (2003). Apoptosis signal-regulating kinase 1 plays a pivotal role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodeling. *Circulation research* 93, 874-883.
- Jacobs, D., Glossip, D., Xing, H., Muslin, A.J., et Kornfeld, K. (1999). Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes & development* 13, 163-175.
- Jamison, R.L., Canaan-Kuhl, S., et Pratt, R. (1992). The natriuretic peptides and their receptors. *Am J Kidney Dis* 20, 519-530.
- Jiang, Y., et Evans, T. (1996). The Xenopus GATA-4/5/6 genes are associated with cardiac specification and can regulate cardiac-specific transcription during embryogenesis. *Developmental biology* 174, 258-270.
- Jones, M.B., Siderovski, D.P., et Hooks, S.B. (2004). The G $\beta$  $\gamma$  DIMER as a NOVEL SOURCE of SELECTIVITY in G-Protein Signaling: GGL-ing AT CONVENTION. *Mol Interv* 4, 200-214.
- Kadowaki, H., Nishitoh, H., et Ichijo, H. (2004). Survival and apoptosis signals in ER stress: the role of protein kinases. *Journal of chemical neuroanatomy* 28, 93-100.
- Kaiser, R.A., Bueno, O.F., Lips, D.J., Doevendans, P.A., Jones, F., Kimball, T.F., et Molkentin, J.D. (2004). Targeted inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase antagonizes cardiac injury and cell death following ischemia-reperfusion in vivo. *The Journal of biological chemistry* 279, 15524-15530.
- Kakita, T., Hasegawa, K., Iwai-Kanai, E., Adachi, S., Morimoto, T., Wada, H., Kawamura, T., Yanazume, T., et Sasayama, S. (2001). Calcineurin pathway is required for endothelin-1-mediated protection against oxidant stress-induced apoptosis in cardiac myocytes. *Circulation research* 88, 1239-1246.
- Kang, P.M., et Izumo, S. (2000). Apoptosis in heart failure: is there light at the end of the tunnel (TUNEL)? *Journal of cardiac failure* 6, 43-46.
- Karim, F.D., Urness, L.D., Thummel, C.S., Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Celada, A., Van Beveren, C., Maki, R.A., Gunther, C.V., Nye, J.A., et al. (1990). The ETS-domain: a new DNA-binding motif that recognizes a purine-rich core DNA sequence. *Genes & development* 4, 1451-1453.

- Karkkainen, S., et Peuhkurinen, K. (2007). Genetics of dilated cardiomyopathy. *Annals of medicine* 39, 91-107.
- Kaufman, R.J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes & development* 13, 1211-1233.
- Keys, J.R., et Koch, W.J. (2004). The adrenergic pathway and heart failure. *Recent progress in hormone research* 59, 13-30.
- Kim, Y., Ma, A.G., Kitta, K., Fitch, S.N., Ikeda, T., Ihara, Y., Simon, A.R., Evans, T., et Suzuki, Y.J. (2003). Anthracycline-induced suppression of GATA-4 transcription factor: implication in the regulation of cardiac myocyte apoptosis. *Molecular pharmacology* 63, 368-377.
- King, A.J., Sun, H., Diaz, B., Barnard, D., Miao, W., Bagrodia, S., et Marshall, M.S. (1998). The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature* 396, 180-183.
- Kitta, K., Day, R.M., Kim, Y., Torregroza, I., Evans, T., et Suzuki, Y.J. (2003). Hepatocyte growth factor induces GATA-4 phosphorylation and cell survival in cardiac muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 4705-4712.
- Kjaer, A., et Hesse, B. (2001). Heart failure and neuroendocrine activation: diagnostic, prognostic and therapeutic perspectives. *Clinical physiology (Oxford, England)* 21, 661-672.
- Kobayashi, S., Lackey, T., Huang, Y., Bisping, E., Pu, W.T., Boxer, L.M., et Liang, Q. (2006). Transcription factor gata4 regulates cardiac BCL2 gene expression in vitro and in vivo. *Faseb J* 20, 800-802.
- Kolodziejczyk, S.M., Wang, L., Balazsi, K., DeRepentigny, Y., Kothary, R., et Megeney, L.A. (1999). MEF2 is upregulated during cardiac hypertrophy and is required for normal post-natal growth of the myocardium. *Curr Biol* 9, 1203-1206.
- Kong, S.W., Bodyak, N., Yue, P., Liu, Z., Brown, J., Izumo, S., et Kang, P.M. (2005). Genetic expression profiles during physiological and pathological cardiac hypertrophy and heart failure in rats. *Physiological genomics* 21, 34-42.
- Kurose, H. (2003). Galpha12 and Galpha13 as key regulatory mediator in signal transduction. *Life sciences* 74, 155-161.
- Kyriakis, J.M., et Avruch, J. (1996). Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays* 18, 567-577.

- Kyriakis, J.M., et Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological reviews* 81, 807-869.
- Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J., et Woodgett, J.R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369, 156-160.
- Latronico, M.V., Costinean, S., Lavitrano, M.L., Peschle, C., et Condorelli, G. (2004). Regulation of cell size and contractile function by AKT in cardiomyocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1015, 250-260.
- Lavallee, G., Andelfinger, G., Nadeau, M., Lefebvre, C., Nemer, G., Horb, M.E., et Nemer, M. (2006). The Kruppel-like transcription factor KLF13 is a novel regulator of heart development. *The EMBO journal* 25, 5201-5213.
- Laverriere, A.C., MacNeill, C., Mueller, C., Poelmann, R.E., Burch, J.B., et Evans, T. (1994). GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *The Journal of biological chemistry* 269, 23177-23184.
- Lee, C.Y., et Burnett, J.C., Jr. (2007). Natriuretic peptides and therapeutic applications. *Heart failure reviews* 12, 131-142.
- Lee, Y., Shioi, T., Kasahara, H., Jobe, S.M., Wiese, R.J., Markham, B.E., et Izumo, S. (1998). The cardiac tissue-restricted homeobox protein Csx/Nkx2.5 physically associates with the zinc finger protein GATA4 and cooperatively activates atrial natriuretic factor gene expression. *Molecular and cellular biology* 18, 3120-3129.
- Levin, E.R., Gardner, D.G., et Samson, W.K. (1998). Natriuretic peptides. *The New England journal of medicine* 339, 321-328.
- Li, Q.J., Yang, S.H., Maeda, Y., Sladek, F.M., Sharrocks, A.D., et Martins-Green, M. (2003). MAP kinase phosphorylation-dependent activation of Elk-1 leads to activation of the co-activator p300. *The EMBO journal* 22, 281-291.
- Liang, F., et Gardner, D.G. (1999). Mechanical strain activates BNP gene transcription through a p38/NF-kappaB-dependent mechanism. *The Journal of clinical investigation* 104, 1603-1612.
- Liang, F., Lu, S., et Gardner, D.G. (2000). Endothelin-dependent and -independent components of strain-activated brain natriuretic peptide gene transcription require extracellular signal regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Hypertension* 35, 188-192.

Liang, Q., et Molkenin, J.D. (2002). Divergent signaling pathways converge on GATA4 to regulate cardiac hypertrophic gene expression. *Journal of molecular and cellular cardiology* 34, 611-616.

Liang, Q., Wiese, R.J., Bueno, O.F., Dai, Y.S., Markham, B.E., et Molkenin, J.D. (2001a). The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes. *Molecular and cellular biology* 21, 7460-7469.

Liang, Q., De Windt, L.J., Witt, S.A., Kimball, T.R., Markham, B.E., et Molkenin, J.D. (2001b). The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry* 276, 30245-30253.

Liao, P., Georgakopoulos, D., Kovacs, A., Zheng, M., Lerner, D., Pu, H., Saffitz, J., Chien, K., Xiao, R.P., Kass, D.A., et al. (2001). The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 12283-12288.

Liao, P., Wang, S.Q., Wang, S., Zheng, M., Zheng, M., Zhang, S.J., Cheng, H., Wang, Y., et Xiao, R.P. (2002). p38 Mitogen-activated protein kinase mediates a negative inotropic effect in cardiac myocytes. *Circulation research* 90, 190-196.

Lijnen, P., et Petrov, V. (1999). Renin-angiotensin system, hypertrophy and gene expression in cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 31, 949-970.

Lim, H.W., New, L., Han, J., et Molkenin, J.D. (2001). Calcineurin enhances MAPK phosphatase-1 expression and p38 MAPK inactivation in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 276, 15913-15919.

Lin, Q., Schwarz, J., Bucana, C., et Olson, E.N. (1997). Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science (New York, NY)* 276, 1404-1407.

Lips, D.J., deWindt, L.J., van Kraaij, D.J., et Doevendans, P.A. (2003). Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *European heart journal* 24, 883-896.

Liu, Y. (1999). Hepatocyte growth factor promotes renal epithelial cell survival by dual mechanisms. *The American journal of physiology* 277, F624-633.

Lorell, B.H., et Carabello, B.A. (2000). Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation* 102, 470-479.

Lotem, J., Kama, R., et Sachs, L. (1999). Suppression or induction of apoptosis by opposing pathways downstream from calcium-activated calcineurin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 12016-12020.

Luo, W., Sharif, T.R., et Sharif, M. (1996). Substance P-induced mitogenesis in human astrocytoma cells correlates with activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer research* 56, 4983-4991.

Luodonpaa, M., Vuolteenaho, O., Eskelinen, S., et Ruskoaho, H. (2001). Effects of adrenomedullin on hypertrophic responses induced by angiotensin II, endothelin-1 and phenylephrine. *Peptides* 22, 1859-1866.

Maack, T. (1992). Receptors of atrial natriuretic factor. *Annual review of physiology* 54, 11-27.

Maier, L.S., et Bers, D.M. (2002). Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *Journal of molecular and cellular cardiology* 34, 919-939.

Malhotra, A., Kang, B.P., Opawumi, D., Belizaire, W., et Meggs, L.G. (2001). Molecular biology of protein kinase C signaling in cardiac myocytes. *Molecular and cellular biochemistry* 225, 97-107.

Martin, T.F. (1998). Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking. *Annual review of cell and developmental biology* 14, 231-264.

Masuda, K., Shima, H., Watanabe, M., et Kikuchi, K. (2001). MKP-7, a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, functions as a shuttle protein. *The Journal of biological chemistry* 276, 39002-39011.

Matsui, T., Li, L., Wu, J.C., Cook, S.A., Nagoshi, T., Picard, M.H., Liao, R., et Rosenzweig, A. (2002). Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *The Journal of biological chemistry* 277, 22896-22901.

Matsui, T., Tao, J., del Monte, F., Lee, K.H., Li, L., Picard, M., Force, T.L., Franke, T.F., Hajjar, R.J., et Rosenzweig, A. (2001). Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo. *Circulation* 104, 330-335.

Mazza, R., Mannarino, C., Imbrogno, S., Barbieri, S.F., Adamo, C., Angelone, T., Corti, A., et Tota, B. (2007). Crucial role of cytoskeleton reorganization in the negative inotropic effect of chromogranin A-derived peptides in eel and frog hearts. *Regulatory peptides* 138, 145-151.

McBride, K., Charron, F., Lefebvre, C., et Nemer, M. (2003). Interaction with GATA transcription factors provides a mechanism for cell-specific effects of c-Fos. *Oncogene* 22, 8403-8412.

McDonough, A.A., Leong, P.K., et Yang, L.E. (2003). Mechanisms of pressure natriuresis: how blood pressure regulates renal sodium transport. *Annals of the New York Academy of Sciences* 986, 669-677.

McMullen, J.R., et Jennings, G.L. (2007). Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 34, 255-262.

McMullen, J.R., Shioi, T., Huang, W.Y., Zhang, L., Tarnavski, O., Bisping, E., Schinke, M., Kong, S., Sherwood, M.C., Brown, J., et al. (2004). The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway. *The Journal of biological chemistry* 279, 4782-4793.

Mellor, H., et Parker, P.J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *The Biochemical journal* 332 ( Pt 2), 281-292.

Mende, U., Kagen, A., Cohen, A., Aramburu, J., Schoen, F.J., et Neer, E.J. (1998). Transient cardiac expression of constitutively active Galphaq leads to hypertrophy and dilated cardiomyopathy by calcineurin-dependent and independent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13893-13898.

Mende, U., Kagen, A., Meister, M., et Neer, E.J. (1999). Signal transduction in atria and ventricles of mice with transient cardiac expression of activated G protein alpha(q). *Circulation research* 85, 1085-1091.

Messenguy, F., et Dubois, E. (2003). Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene* 316, 1-21.

Miano, J.M., Long, X., et Fujiwara, K. (2007). Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *American journal of physiology* 292, C70-81.

Milano, C.A., Allen, L.F., Rockman, H.A., Dolber, P.C., McMinn, T.R., Chien, K.R., Johnson, T.D., Bond, R.A., et Lefkowitz, R.J. (1994a). Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science (New York, NY)* 264, 582-586.

Milano, C.A., Dolber, P.C., Rockman, H.A., Bond, R.A., Venable, M.E., Allen, L.F., et Lefkowitz, R.J. (1994b). Myocardial expression of a constitutively active alpha 1B-adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 10109-10113.

Minamino, N., Kangawa, K., et Matsuo, H. (1988). Isolation and identification of a high molecular weight brain natriuretic peptide in porcine cardiac atrium. *Biochemical and biophysical research communications* 157, 402-409.

Minamino, T., Yujiri, T., Terada, N., Taffet, G.E., Michael, L.H., Johnson, G.L., et Schneider, M.D. (2002). MEKK1 is essential for cardiac hypertrophy and dysfunction induced by Gq. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 3866-3871.

Miska, E.A., Karlsson, C., Langley, E., Nielsen, S.J., Pines, J., et Kouzarides, T. (1999). HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *The EMBO journal* 18, 5099-5107.

Mitchell, S., Ota, A., Foster, W., Zhang, B., Fang, Z., Patel, S., Nelson, S.F., Horvath, S., et Wang, Y. (2006). Distinct gene expression profiles in adult mouse heart following targeted MAP kinase activation. *Physiological genomics* 25, 50-59.

Mochly-Rosen, D., Wu, G., Hahn, H., Osinska, H., Liron, T., Lorenz, J.N., Yatani, A., Robbins, J., et Dorn, G.W., 2nd (2000). Cardioprotective effects of protein kinase C epsilon: analysis by in vivo modulation of PKCepsilon translocation. *Circulation research* 86, 1173-1179.

Mogensen, J., Klausen, I.C., Pedersen, A.K., Egeblad, H., Bross, P., Kruse, T.A., Gregersen, N., Hansen, P.S., Baandrup, U., et Borglum, A.D. (1999). Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *The Journal of clinical investigation* 103, R39-43.

Molkentin, J.D. (2000). The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *The Journal of biological chemistry* 275, 38949-38952.

Molkentin, J.D., et Dorn, I.G., 2nd (2001). Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annual review of physiology* 63, 391-426.

Molkentin, J.D., Kalvakolanu, D.V., et Markham, B.E. (1994). Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the alpha-myosin heavy-chain gene. *Molecular and cellular biology* 14, 4947-4957.

- Molkentin, J.D., Lin, Q., Duncan, S.A., et Olson, E.N. (1997). Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes & development* 11, 1061-1072.
- Molkentin, J.D., Lu, J.R., Antos, C.L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S.R., et Olson, E.N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93, 215-228.
- Moorjani, N., Catarino, P., Trabzuni, D., Saleh, S., Moorji, A., Dzimiri, N., Al-Mohanna, F., Westaby, S., et Ahmad, M. (2007). Upregulation of Bcl-2 proteins during the transition to pressure overload-induced heart failure. *International journal of cardiology* 116, 27-33.
- Mora, A., Davies, A.M., Bertrand, L., Sharif, I., Budas, G.R., Jovanovic, S., Mouton, V., Kahn, C.R., Lucocq, J.M., Gray, G.A., et al. (2003). Deficiency of PDK1 in cardiac muscle results in heart failure and increased sensitivity to hypoxia. *The EMBO journal* 22, 4666-4676.
- Mori, K. (2000). Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 101, 451-454.
- Morimoto, T., Hasegawa, K., Kaburagi, S., Kakita, T., Wada, H., Yanazume, T., et Sasayama, S. (2000). Phosphorylation of GATA-4 is involved in alpha 1-adrenergic agonist-responsive transcription of the endothelin-1 gene in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 275, 13721-13726.
- Morin, S., Charron, F., Robitaille, L., et Nemer, M. (2000). GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters. *The EMBO journal* 19, 2046-2055.
- Morin, S., Paradis, P., Aries, A., et Nemer, M. (2001). Serum response factor-GATA ternary complex required for nuclear signaling by a G-protein-coupled receptor. *Molecular and cellular biology* 21, 1036-1044.
- Morisco, C., Seta, K., Hardt, S.E., Lee, Y., Vatner, S.F., et Sadoshima, J. (2001). Glycogen synthase kinase 3beta regulates GATA4 in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 276, 28586-28597.
- Morishima, N., Nakanishi, K., Tsuchiya, K., Shibata, T., et Seiwa, E. (2004). Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 279, 50375-50381.
- Morrissey, E.E., Ip, H.S., Tang, Z., et Parmacek, M.S. (1997). GATA-4 activates transcription via two novel domains that are conserved within the GATA-4/5/6 subfamily. *The Journal of biological chemistry* 272, 8515-8524.



Morrisey, E.E., Tang, Z., Sigrist, K., Lu, M.M., Jiang, F., Ip, H.S., et Parmacek, M.S. (1998). GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes & development* 12, 3579-3590.

Muntoni, F., Cau, M., Ganau, A., Congiu, R., Arvedi, G., Mateddu, A., Marrosu, M.G., Cianchetti, C., Realdi, G., Cao, A., et al. (1993). Brief report: deletion of the dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy. *The New England journal of medicine* 329, 921-925.

Murphy, A.M., Thompson, W.R., Peng, L.F., et Jones, L., 2nd (1997). Regulation of the rat cardiac troponin I gene by the transcription factor GATA-4. *The Biochemical journal* 322 ( Pt 2), 393-401.

Murriel, C.L., et Mochly-Rosen, D. (2003). Opposing roles of delta and epsilonPKC in cardiac ischemia and reperfusion: targeting the apoptotic machinery. *Archives of biochemistry and biophysics* 420, 246-254.

Muslin, A.J. (2005). Role of raf proteins in cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival. *Trends in cardiovascular medicine* 15, 225-229.

Muslin, A.J., et DeBosch, B. (2006). Role of Akt in cardiac growth and metabolism. *Novartis Foundation symposium* 274, 118-126; discussion 126-131, 152-115, 272-116.

Naga Prasad, S.V., Perrino, C., et Rockman, H.A. (2003). Role of phosphoinositide 3-kinase in cardiac function and heart failure. *Trends in cardiovascular medicine* 13, 206-212.

Nagai, T., Tanaka-Ishikawa, M., Aikawa, R., Ishihara, H., Zhu, W., Yazaki, Y., Nagai, R., et Komuro, I. (2003). Cdc42 plays a critical role in assembly of sarcomere units in series of cardiac myocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 305, 806-810.

Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., et Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98-103.

Nakamura, T., Mizuno, S., Matsumoto, K., Sawa, Y., Matsuda, H., et Nakamura, T. (2000). Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *The Journal of clinical investigation* 106, 1511-1519.

Narula, J., Pandey, P., Arbustini, E., Haider, N., Narula, N., Kolodgie, F.D., Dal Bello, B., Semigran, M.J., Bielsa-Masdeu, A., Dec, G.W., et al. (1999). Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 8144-8149.

- Neer, E.J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80, 249-257.
- Nelson, T.J., Balza, R., Jr., Xiao, Q., et Misra, R.P. (2005). SRF-dependent gene expression in isolated cardiomyocytes: regulation of genes involved in cardiac hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology* 39, 479-489.
- Nemer, G., et Nemer, M. (2002). Cooperative interaction between GATA5 and NF-ATc regulates endothelial-endocardial differentiation of cardiogenic cells. *Development (Cambridge, England)* 129, 4045-4055.
- Nemer, G., Qureshi, S.T., Malo, D., et Nemer, M. (1999). Functional analysis and chromosomal mapping of Gata5, a gene encoding a zinc finger DNA-binding protein. *Mamm Genome* 10, 993-999.
- Nemer, M., Chamberland, M., Sirois, D., Argentin, S., Drouin, J., Dixon, R.A., Zivin, R.A., et Condra, J.H. (1984). Gene structure of human cardiac hormone precursor, pronatriodilatin. *Nature* 312, 654-656.
- Neves, S.R., Ram, P.T., et Iyengar, R. (2002). G protein pathways. *Science (New York, NY)* 296, 1636-1639.
- Nicholas, S.B., et Philipson, K.D. (1999). Cardiac expression of the Na<sup>(+)</sup>/Ca<sup>(2+)</sup> exchanger NCX1 is GATA factor dependent. *The American journal of physiology* 277, H324-330.
- Nicholson, D.W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell death and differentiation* 6, 1028-1042.
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., et Ichijo, H. (2002). ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes & development* 16, 1345-1355.
- Nyberg-Hoffman, C., Shabram, P., Li, W., Giroux, D. et Aguilar-Cordova E. (1997). Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination. *Nature Medicine* 3, 808-811
- Oka, T., Maillet, M., Watt, A.J., Schwartz, R.J., Aronow, B.J., Duncan, S.A., et Molkenstein, J.D. (2006). Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circulation research* 98, 837-845.
- Ono, K., Matsumori, A., Shioi, T., Furukawa, Y., et Sasayama, S. (1997). Enhanced expression of hepatocyte growth factor/c-Met by myocardial ischemia and reperfusion in a rat model. *Circulation* 95, 2552-2558.

Onodera, T., Tamura, T., Said, S., McCune, S.A., et Gerdes, A.M. (1998). Maladaptive remodeling of cardiac myocyte shape begins long before failure in hypertension. *Hypertension* 32, 753-757.

Palczewski, K. (1997). GTP-binding-protein-coupled receptor kinases--two mechanistic models. *European journal of biochemistry / FEBS* 248, 261-269.

Palm-Leis, A., Singh, U.S., Herbelin, B.S., Olsovsky, G.D., Baker, K.M., et Pan, J. (2004). Mitogen-activated protein kinases and mitogen-activated protein kinase phosphatases mediate the inhibitory effects of all-trans retinoic acid on the hypertrophic growth of cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry* 279, 54905-54917.

Parrizas, M., Saltiel, A.R., et LeRoith, D. (1997). Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *The Journal of biological chemistry* 272, 154-161.

Passier, R., Zeng, H., Frey, N., Naya, F.J., Nicol, R.L., McKinsey, T.A., Overbeek, P., Richardson, J.A., Grant, S.R., et Olson, E.N. (2000). CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *The Journal of clinical investigation* 105, 1395-1406.

Peterkin, T., Gibson, A., Loose, M., et Patient, R. (2005). The roles of GATA-4, -5 and -6 in vertebrate heart development. *Seminars in cell & developmental biology* 16, 83-94.

Petrich, B.G., Liao, P., et Wang, Y. (2002). Using a gene-switch transgenic approach to dissect distinct roles of MAP kinases in heart failure. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 67, 429-437.

Petrich, B.G., Molkenin, J.D., et Wang, Y. (2003). Temporal activation of c-Jun N-terminal kinase in adult transgenic heart via cre-loxP-mediated DNA recombination. *Faseb J* 17, 749-751.

Petrich, B.G., et Wang, Y. (2004). Stress-activated MAP kinases in cardiac remodeling and heart failure; new insights from transgenic studies. *Trends in cardiovascular medicine* 14, 50-55.

Petros, A.M., Olejniczak, E.T., et Fesik, S.W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1644, 83-94.

Pfeffer, J.M., Pfeffer, M.A., Fletcher, P.J., et Braunwald, E. (1991). Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *The American journal of physiology* 260, H1406-1414.

- Piano, M.R., Bondmass, M., et Schwertz, D.W. (1998). The molecular and cellular pathophysiology of heart failure. *Heart Lung* 27, 3-19; quiz 20-11.
- Pikkarainen, S., Tokola, H., Kerkela, R., Majalahti-Palviainen, T., Vuolteenaho, O., et Ruskoaho, H. (2003). Endothelin-1-specific activation of B-type natriuretic peptide gene via p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear ETS factors. *The Journal of biological chemistry* 278, 3969-3975.
- Pikkarainen, S., Tokola, H., Kerkela, R., et Ruskoaho, H. (2004). GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovascular research* 63, 196-207.
- Pikkarainen, S., Tokola, H., Majalahti-Palviainen, T., Kerkela, R., Hautala, N., Bhalla, S.S., Charron, F., Nemer, M., Vuolteenaho, O., et Ruskoaho, H. (2003). GATA-4 is a nuclear mediator of mechanical stretch-activated hypertrophic program. *The Journal of biological chemistry* 278, 23807-23816.
- Proud, C.G. (2004). Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovascular research* 63, 403-413.
- Purcell, N.H., Darwis, D., Bueno, O.F., Muller, J.M., Schule, R., et Molkentin, J.D. (2004). Extracellular signal-regulated kinase 2 interacts with and is negatively regulated by the LIM-only protein FHL2 in cardiomyocytes. *Molecular and cellular biology* 24, 1081-1095.
- Raingaud, J., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Derijard, B., et Davis, R.J. (1996). MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Molecular and cellular biology* 16, 1247-1255.
- Ramirez, M.T., Sah, V.P., Zhao, X.L., Hunter, J.J., Chien, K.R., et Brown, J.H. (1997). The MEKK-JNK pathway is stimulated by alpha1-adrenergic receptor and ras activation and is associated with in vitro and in vivo cardiac hypertrophy. *The Journal of biological chemistry* 272, 14057-14061.
- Rao, A., Luo, C., et Hogan, P.G. (1997). Transcription factors of the NFATC family: regulation and function. *Annual review of immunology* 15, 707-747.
- Rapacciuolo, A., Esposito, G., Caron, K., Mao, L., Thomas, S.A., et Rockman, H.A. (2001). Important role of endogenous norepinephrine and epinephrine in the development of in vivo pressure-overload cardiac hypertrophy. *Journal of the American College of Cardiology* 38, 876-882.
- Raphael, J., Abedat, S., Rivo, J., Meir, K., Beeri, R., Pugatsch, T., Zuo, Z., et Gozal, Y. (2006). Volatile anesthetic preconditioning attenuates myocardial apoptosis in rabbits after regional ischemia and reperfusion via Akt signaling and modulation of Bcl-2 family proteins. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 318, 186-194.

Ravingerova, T., Barancik, M., et Strniskova, M. (2003). Mitogen-activated protein kinases: a new therapeutic target in cardiac pathology. *Molecular and cellular biochemistry* 247, 127-138.

Reed, J.C., et Paternostro, G. (1999). Postmitochondrial regulation of apoptosis during heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 7614-7616.

Reja, V., Goodchild, A.K., et Pilowsky, P.M. (2002). Catecholamine-related gene expression correlates with blood pressures in SHR. *Hypertension* 40, 342-347.

Richardson, P., McKenna, W., Bristow, M., Maisch, B., Mautner, B., O'Connell, J., Olsen, E., Thiene, G., Goodwin, J., Gyarfás, I., et al. (1996). Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 93, 841-842.

Ritchie, R.H., et Delbridge, L.M. (2006). Cardiac hypertrophy, substrate utilization and metabolic remodelling: cause or effect? *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 33, 159-166.

Robinson, M.J., et Cobb, M.H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current opinion in cell biology* 9, 180-186.

Rohrer, D.K., Chruscinski, A., Schauble, E.H., Bernstein, D., et Kobilka, B.K. (1999). Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta1- and beta2-adrenergic receptors. *The Journal of biological chemistry* 274, 16701-16708.

Rokosh, D.G., et Simpson, P.C. (2002). KO of the alpha 1A/C-adrenergic receptor subtype: the alpha 1A/C is expressed in resistance arteries and is required to maintain arterial blood pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 9474-9479.

Rosenkranz, A.C., Hood, S.G., Woods, R.L., Dusting, G.J., et Ritchie, R.H. (2002). Acute antihypertrophic actions of bradykinin in the rat heart: importance of cyclic GMP. *Hypertension* 40, 498-503.

Sabri, A., et Steinberg, S.F. (2003). Protein kinase C isoform-selective signals that lead to cardiac hypertrophy and the progression of heart failure. *Molecular and cellular biochemistry* 251, 97-101.

Sadoshima, J., Montagne, O., Wang, Q., Yang, G., Warden, J., Liu, J., Takagi, G., Karoor, V., Hong, C., Johnson, G.L., et al. (2002). The MEKK1-JNK pathway plays a protective role in pressure overload but does not mediate cardiac hypertrophy. *The Journal of clinical investigation* 110, 271-279.

Sah, V.P., Hoshijima, M., Chien, K.R., et Brown, J.H. (1996). Rho is required for Galphaq and alpha1-adrenergic receptor signaling in cardiomyocytes. Dissociation of Ras and Rho pathways. *The Journal of biological chemistry* 271, 31185-31190.

Sah, V.P., Minamisawa, S., Tam, S.P., Wu, T.H., Dorn, G.W., 2nd, Ross, J., Jr., Chien, K.R., et Brown, J.H. (1999). Cardiac-specific overexpression of RhoA results in sinus and atrioventricular nodal dysfunction and contractile failure. *The Journal of clinical investigation* 103, 1627-1634.

Saito, S., Hiroi, Y., Zou, Y., Aikawa, R., Toko, H., Shibasaki, F., Yazaki, Y., Nagai, R., et Komuro, I. (2000). beta-Adrenergic pathway induces apoptosis through calcineurin activation in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 275, 34528-34533.

Salazar, N.C., Chen, J., et Rockman, H.A. (2007). Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochimica et biophysica acta* 1768, 1006-1018.

Scheid, M.P., et Woodgett, J.R. (2001). PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nature reviews* 2, 760-768.

Schwartz, K., Boheler, K.R., de la Bastie, D., Lompre, A.M., et Mercadier, J.J. (1992). Switches in cardiac muscle gene expression as a result of pressure and volume overload. *The American journal of physiology* 262, R364-369.

Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., et Korsmeyer, S.J. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. *Science (New York, NY)* 300, 135-139.

Sepulveda, J.L., Belaguli, N., Nigam, V., Chen, C.Y., Nemer, M., et Schwartz, R.J. (1998). GATA-4 and Nkx-2.5 coactivate Nkx-2 DNA binding targets: role for regulating early cardiac gene expression. *Molecular and cellular biology* 18, 3405-3415.

Sheng, Z., Knowlton, K., Chen, J., Hoshijima, M., Brown, J.H., et Chien, K.R. (1997). Cardiotrophin 1 (CT-1) inhibition of cardiac myocyte apoptosis via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. Divergence from downstream CT-1 signals for myocardial cell hypertrophy. *The Journal of biological chemistry* 272, 5783-5791.

Shioi, T., Kang, P.M., Douglas, P.S., Hampe, J., Yballe, C.M., Lawitts, J., Cantley, L.C., et Izumo, S. (2000). The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *The EMBO journal* 19, 2537-2548.

Shioi, T., McMullen, J.R., Kang, P.M., Douglas, P.S., Obata, T., Franke, T.F., Cantley, L.C., et Izumo, S. (2002). Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Molecular and cellular biology* 22, 2799-2809.

Shiojima, I., Komuro, I., Oka, T., Hiroi, Y., Mizuno, T., Takimoto, E., Monzen, K., Aikawa, R., Akazawa, H., Yamazaki, T., *et al.* (1999). Context-dependent transcriptional cooperation mediated by cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *The Journal of biological chemistry* 274, 8231-8239.

Shiojima, I., Yefremashvili, M., Luo, Z., Kureishi, Y., Takahashi, A., Tao, J., Rosenzweig, A., Kahn, C.R., Abel, E.D., et Walsh, K. (2002). Akt signaling mediates postnatal heart growth in response to insulin and nutritional status. *The Journal of biological chemistry* 277, 37670-37677.

Shizukuda, Y., Reyland, M.E., et Buttrick, P.M. (2002). Protein kinase C-delta modulates apoptosis induced by hyperglycemia in adult ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282, H1625-1634.

Singal, P.K., et Iliskovic, N. (1998). Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *The New England journal of medicine* 339, 900-905.

Srivastava, D. (2001). Genetic assembly of the heart: implications for congenital heart disease. *Annual review of physiology* 63, 451-469.

Steenbergen, C. (2002). The role of p38 mitogen-activated protein kinase in myocardial ischemia/reperfusion injury; relationship to ischemic preconditioning. *Basic research in cardiology* 97, 276-285.

Stewart, A.F., Rokosh, D.G., Bailey, B.A., Karns, L.R., Chang, K.C., Long, C.S., Kariya, K., et Simpson, P.C. (1994). Cloning of the rat alpha 1C-adrenergic receptor from cardiac myocytes. alpha 1C, alpha 1B, and alpha 1D mRNAs are present in cardiac myocytes but not in cardiac fibroblasts. *Circulation research* 75, 796-802.

Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R., Nurnberg, B., *et al.* (1995). Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science (New York, NY)* 269, 690-693.

Sucharov, C.C. (2007). Beta-adrenergic pathways in human heart failure. *Expert review of cardiovascular therapy* 5, 119-124.

Sudoh, T., Kangawa, K., Minamino, N., et Matsuo, H. (1988). A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 332, 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. *Biochemical and biophysical research communications* 168, 863-870.

- Suga, S., Nakao, K., Itoh, H., Komatsu, Y., Ogawa, Y., Hama, N., et Imura, H. (1992). Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. Possible existence of "vascular natriuretic peptide system". *The Journal of clinical investigation* 90, 1145-1149.
- Sugden, P.H. (2003). An overview of endothelin signaling in the cardiac myocyte. *Journal of molecular and cellular cardiology* 35, 871-886.
- Sugden, P.H., et Clerk, A. (1998). Regulation of mitogen-activated protein kinase cascades in the heart. *Advances in enzyme regulation* 38, 87-98.
- Sugden, P.H., et Clerk, A. (2000). Activation of the small GTP-binding protein Ras in the heart by hypertrophic agonists. *Trends in cardiovascular medicine* 10, 1-8.
- Suttner, S.W., et Boldt, J. (2004). Natriuretic peptide system: physiology and clinical utility. *Current opinion in critical care* 10, 336-341.
- Suzuki, Y.J. (2003). Stress-induced activation of GATA-4 in cardiac muscle cells. *Free radical biology & medicine* 34, 1589-1598.
- Suzuki, Y.J., et Evans, T. (2004). Regulation of cardiac myocyte apoptosis by the GATA-4 transcription factor. *Life sciences* 74, 1829-1838.
- Takesono, A., Zahner, J., Blumer, K.J., Nagao, T., et Kurose, H. (1999). Negative regulation of alpha2-adrenergic receptor-mediated Gi signalling by a novel pathway. *The Biochemical journal* 343 Pt 1, 77-85.
- Tamir, Y., et Bengal, E. (2000). Phosphoinositide 3-kinase induces the transcriptional activity of MEF2 proteins during muscle differentiation. *The Journal of biological chemistry* 275, 34424-34432.
- Tamura, N., Ogawa, Y., Yasoda, A., Itoh, H., Saito, Y., et Nakao, K. (1996). Two cardiac natriuretic peptide genes (atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide) are organized in tandem in the mouse and human genomes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 28, 1811-1815.
- Tanoue, A., Nasa, Y., Koshimizu, T., Shinoura, H., Oshikawa, S., Kawai, T., Sunada, S., Takeo, S., et Tsujimoto, G. (2002). The alpha(1D)-adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *The Journal of clinical investigation* 109, 765-775.
- Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T., et Nishida, E. (2000). A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature cell biology* 2, 110-116.



Tanoue, T., et Nishida, E. (2002). Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Pharmacology & therapeutics* 93, 193-202.

Temsah, R., et Nemer, M. (2005). GATA factors and transcriptional regulation of cardiac natriuretic peptide genes. *Regulatory peptides* 128, 177-185.

Tenhunen, O., Sarman, B., Kerkela, R., Szokodi, I., Papp, L., Toth, M., et Ruskoaho, H. (2004). Mitogen-activated protein kinases p38 and ERK 1/2 mediate the wall stress-induced activation of GATA-4 binding in adult heart. *The Journal of biological chemistry* 279, 24852-24860.

Thibault, G., Lazure, C., Schiffrin, E.L., Gutkowska, J., Chartier, L., Garcia, R., Seidah, N.G., Chretien, M., Genest, J., et Cantin, M. (1985). Identification of a biologically active circulating form of rat atrial natriuretic factor. *Biochemical and biophysical research communications* 130, 981-986.

Thibault, G., Nemer, M., Drouin, J., Lavigne, J.P., Ding, J., Charbonneau, C., Garcia, R., Genest, J., Jasmin, G., Sole, M., *et al.* (1989). Ventricles as a major site of atrial natriuretic factor synthesis and release in cardiomyopathic hamsters with heart failure. *Circulation research* 65, 71-82.

Thorburn, A., Thorburn, J., Chen, S.Y., Powers, S., Shubeita, H.E., Feramisco, J.R., et Chien, K.R. (1993). HRas-dependent pathways can activate morphological and genetic markers of cardiac muscle cell hypertrophy. *The Journal of biological chemistry* 268, 2244-2249.

Thorburn, J., Xu, S., et Thorburn, A. (1997). MAP kinase- and Rho-dependent signals interact to regulate gene expression but not actin morphology in cardiac muscle cells. *The EMBO journal* 16, 1888-1900.

Thuerauf, D.J., Arnold, N.D., Zechner, D., Hanford, D.S., DeMartin, K.M., McDonough, P.M., Prywes, R., et Glembofski, C.C. (1998). p38 Mitogen-activated protein kinase mediates the transcriptional induction of the atrial natriuretic factor gene through a serum response element. A potential role for the transcription factor ATF6. *The Journal of biological chemistry* 273, 20636-20643.

Thuerauf, D.J., Hanford, D.S., et Glembofski, C.C. (1994). Regulation of rat brain natriuretic peptide transcription. A potential role for GATA-related transcription factors in myocardial cell gene expression. *The Journal of biological chemistry* 269, 17772-17775.

Tiyyagura, S.R., et Pinney, S.P. (2006). Left ventricular remodeling after myocardial infarction: past, present, and future. *The Mount Sinai journal of medicine, New York* 73, 840-851.

Tu, V.C., Bahl, J.J., et Chen, Q.M. (2002). Signals of oxidant-induced cardiomyocyte hypertrophy: key activation of p70 S6 kinase-1 and phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 300, 1101-1110.

Tu, V.C., Sun, H., Bowden, G.T., et Chen, Q.M. (2007). Involvement of oxidants and AP-1 in angiotensin II-activated NFATC3 transcription factor. *American journal of physiology* 292, C1248-1255.

Ueki, K., Muramatsu, T., et Kincaid, R.L. (1992). Structure and expression of two isoforms of the murine calmodulin-dependent protein phosphatase regulatory subunit (calcineurin B). *Biochemical and biophysical research communications* 187, 537-543.

Unger, T., et Li, J. (2004). The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 5 Suppl 1, S7-10.

Vahebi, S., et Solaro, R.J. (2005). Cardiac sarcomeric function, small G-protein signaling, and heart failure. *Panminerva medica* 47, 133-142.

van Empel, V.P., et De Windt, L.J. (2004). Myocyte hypertrophy and apoptosis: a balancing act. *Cardiovascular research* 63, 487-499.

Vanhaesebroeck, B., Leeyers, S.J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P.C., Woscholski, R., Parker, P.J., et Waterfield, M.D. (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annual review of biochemistry* 70, 535-602.

Vassilatis, D.K., Hohmann, J.G., Zeng, H., Li, F., Ranchalis, J.E., Mortrud, M.T., Brown, A., Rodriguez, S.S., Weller, J.R., Wright, A.C., et al. (2003). The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4903-4908.

Vega, R.B., Bassel-Duby, R., et Olson, E.N. (2003). Control of cardiac growth and function by calcineurin signaling. *The Journal of biological chemistry* 278, 36981-36984.

Vikstrom, K.L., Bohlmeyer, T., Factor, S.M., et Leinwand, L.A. (1998). Hypertrophy, pathology, and molecular markers of cardiac pathogenesis. *Circulation research* 82, 773-778.

Voet, D., et Voet, J. (1998). Biochimie. 2<sup>e</sup> édition. Paris. *De Boeck Université*.

Wakasaki, H., Koya, D., Schoen, F.J., Jirousek, M.R., Ways, D.K., Hoit, B.D., Walsh, R.A., et King, G.L. (1997). Targeted overexpression of protein kinase C beta2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 9320-9325.

- Wang, J., Paradis, P., Aries, A., Komati, H., Lefebvre, C., Wang, H., et Nemer, M. (2005). Convergence of protein kinase C and JAK-STAT signaling on transcription factor GATA-4. *Molecular and cellular biology* 25, 9829-9844.
- Wang, L., et Proud, C.G. (2002). Ras/Erk signaling is essential for activation of protein synthesis by Gq protein-coupled receptor agonists in adult cardiomyocytes. *Circulation research* 91, 821-829.
- Wang, Q.J. (2006). PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends in pharmacological sciences* 27, 317-323.
- Wang, Y. (2007). Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases. *Circulation* 116, 1413-1423.
- Wang, Y., Huang, S., Sah, V.P., Ross, J., Jr., Brown, J.H., Han, J., et Chien, K.R. (1998). Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *The Journal of biological chemistry* 273, 2161-2168.
- Wehrens, X.H., et Marks, A.R. (2004). Molecular determinants of altered contractility in heart failure. *Annals of medicine* 36 Suppl 1, 70-80.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., et Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science (New York, NY)* 292, 727-730.
- Weiss, M.J., et Orkin, S.H. (1995). GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Experimental hematology* 23, 99-107.
- Wilkins, B.J., Dai, Y.S., Bueno, O.F., Parsons, S.A., Xu, J., Plank, D.M., Jones, F., Kimball, T.R., et Molkentin, J.D. (2004). Calcineurin/NFATc coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circulation research* 94, 110-118.
- Wilkins, B.J., De Windt, L.J., Bueno, O.F., Braz, J.C., Glascock, B.J., Kimball, T.F., et Molkentin, J.D. (2002). Targeted disruption of NFATc3, but not NFATc4, reveals an intrinsic defect in calcineurin-mediated cardiac hypertrophic growth. *Molecular and cellular biology* 22, 7603-7613.
- Woods, R.L. (2004). Cardioprotective functions of atrial natriuretic peptide and B-type natriuretic peptide: a brief review. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 31, 791-794.

Xiao, L., Pimental, D.R., Amin, J.K., Singh, K., Sawyer, D.B., et Colucci, W.S. (2001). MEK1/2-ERK1/2 mediates alpha1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 33, 779-787.

Xu, Q., et Wu, Z. (2000). The insulin-like growth factor-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling pathway regulates myogenin expression in normal myogenic cells but not in rhabdomyosarcoma-derived RD cells. *The Journal of biological chemistry* 275, 36750-36757.

Yamaguchi, O., Watanabe, T., Nishida, K., Kashiwase, K., Higuchi, Y., Takeda, T., Hikoso, S., Hirotsu, S., Asahi, M., Taniike, M., et al. (2004). Cardiac-specific disruption of the c-raf-1 gene induces cardiac dysfunction and apoptosis. *The Journal of clinical investigation* 114, 937-943.

Yamamura, T., Otani, H., Nakao, Y., Hattori, R., Osako, M., et Imamura, H. (2001). IGF-I differentially regulates Bcl-xL and Bax and confers myocardial protection in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H1191-1200.

Yandle, T.G. (1994). Biochemistry of natriuretic peptides. *Journal of internal medicine* 235, 561-576.

Yang, S.H., Yates, P.R., Whitmarsh, A.J., Davis, R.J., et Sharrocks, A.D. (1998). The Elk-1 ETS-domain transcription factor contains a mitogen-activated protein kinase targeting motif. *Molecular and cellular biology* 18, 710-720.

Yaoita, H., Ogawa, K., Maehara, K., et Maruyama, Y. (1998). Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 97, 276-281.

Zechner, D., Craig, R., Hanford, D.S., McDonough, P.M., Sabbadini, R.A., et Glembotski, C.C. (1998). MKK6 activates myocardial cell NF-kappaB and inhibits apoptosis in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* 273, 8232-8239.

Zechner, D., Thuerauf, D.J., Hanford, D.S., McDonough, P.M., et Glembotski, C.C. (1997). A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in myocardial cell growth, sarcomeric organization, and cardiac-specific gene expression. *The Journal of cell biology* 139, 115-127.

Zeisberg, E.M., Ma, Q., Juraszek, A.L., Moses, K., Schwartz, R.J., Izumo, S., et Pu, W.T. (2005). Morphogenesis of the right ventricle requires myocardial expression of Gata4. *The Journal of clinical investigation* 115, 1522-1531.

Zhang, D., Mott, J.L., Chang, S.W., Stevens, M., Mikolajczak, P., et Zassenhaus, H.P. (2005). Mitochondrial DNA mutations activate programmed cell survival in the mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H2476-2483.

Zhang, X., Azhar, G., Chai, J., Sheridan, P., Nagano, K., Brown, T., Yang, J., Khrapko, K., Borrás, A.M., Lawitts, J., *et al.* (2001). Cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of serum response factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H1782-1792.

Zhu, W., Zou, Y., Aikawa, R., Harada, K., Kudoh, S., Uozumi, H., Hayashi, D., Gu, Y., Yamazaki, T., Nagai, R., *et al.* (1999). MAPK superfamily plays an important role in daunomycin-induced apoptosis of cardiac myocytes. *Circulation* 100, 2100-2107.

Zhu, Y.C., Zhu, Y.Z., Lu, N., Wang, M.J., Wang, Y.X., et Yao, T. (2003). Role of angiotensin AT1 and AT2 receptors in cardiac hypertrophy and cardiac remodelling. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 30, 911-918.

Zimmer, H.G. (1997). Catecholamine-induced cardiac hypertrophy: significance of proto-oncogene expression. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 75, 849-859.

Zou, Y., Takano, H., Akazawa, H., Nagai, T., Mizukami, M., et Komuro, I. (2002). Molecular and cellular mechanisms of mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Endocrine journal* 49, 1-13