

Université de Montréal

**Mécanismes moléculaires de l'hypertrophie vasculaire
dans le modèle animal d'hypertension essentielle (SHR)**

par

Mohammed Emehdi Atef

Département de physiologie moléculaire et intégrative

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du
grade de Philosophia Doctor (Ph.D.)
en physiologie

Août, 2015

© Mohammed Emehdi Atef, 2015

Université de Montréal
Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

**Mécanismes moléculaires de l'hypertrophie vasculaire
dans le modèle animal d'hypertension essentielle (SHR)**

présentée par :

Mohammed Emehdi Atef

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Rémy Sauvé, président rapporteur

Dre. Madhu B. Anand-Srivastava, directrice de recherche

Dre. Johanne Tremblay, membre du jury

Dr. Ghassan Bkaily, examinateur externe

Dr. Bruce G. Allen, représentant du doyen

Résumé

La voie de signalisation des phosphoinositides joue un rôle clé dans la régulation du tonus vasculaire. Plusieurs études rapportent une production endogène de l'angiotensin II (Ang II) et de l'endothéline-1 (ET-1) par les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) de rats spontanément hypertendus (*spontaneously hypertensive rats* : SHR). De plus, l'Ang II exogène induit son effet prohypertrophique sur les CMLVs selon un mécanisme dépendant de la protéine Gq α et de la PKC δ . Cependant, le rôle de l'axe Gq α /PLC β /PKC δ dans l'hypertrophie des CMLVs provenant d'un modèle animal de l'hypertension artérielle n'est pas encore étudié. L'objectif principal de cette thèse est d'examiner le rôle de l'axe Gq α /PLC β 1 dans les mécanismes moléculaires de l'hypertrophie des CMLVs provenant d'un modèle animal d'hypertension artérielle essentielle (*spontaneously hypertensive rats* : SHR). Nos premiers résultats indiquent que contrairement aux CMLVs de SHR âgés de 12 semaines (absence d'hypertrophie cardiaque), les CMLVs de SHR âgés de 16 semaines (présence d'hypertrophie cardiaque) présentent une surexpression protéique endogène de Gq α et de PLC β 1 par rapport aux CMLVs de rats WKY appariés pour l'âge. L'inhibition du taux d'expression protéique de Gq α et de PLC β 1 par des siRNAs spécifiques diminue significativement le taux de synthèse protéique élevé dans les CMLVs de SHR. De plus, la surexpression endogène des Gq α et PLC β 1, l'hyperphosphorylation de la molécule ERK1/2 et le taux de synthèse protéique élevé dans les CMLVs de SHR de 16 semaines ont été atténués significativement par des antagonistes des récepteurs AT1 (losartan) et ET_A (BQ123), mais pas par l'antagoniste du récepteur ET_B (BQ788). L'inhibition pharmacologique des MAPKs par PD98059 diminue significativement la surexpression endogène de Gq α /PLC β 1 et le taux de synthèse protéique élevé dans les CMLVs de SHR. D'un côté, l'inhibition du stress oxydatif (par DPI, inhibiteur de la NAD(P)H oxidase, et NAC, molécule anti-oxydante), de la molécule c-Src (PP2) et des récepteurs de facteurs de croissance (AG1024 (inhibiteur de l'IGF1-R), AG1478 (inhibiteur de l'EGFR) et AG1295 (inhibiteur du PDGFR)) a permis d'atténuer significativement la surexpression endogène élevée de Gq α /PLC β 1 et l'hypertrophie des CMLVs de SHR. D'un autre côté, DPI, NAC et PP2 atténuent significativement l'hyperphosphorylation de la molécule c-Src, des RTKs (récepteurs à activité tyrosine kinase) et de la molécule ERK1/2. Dans une autre étude, nous avons aussi démontré

que la PKC δ montre une hyperphosphorylation en Tyr³¹¹ dans les CMLVs de SHR comparées aux CMLVs de WKY. La rottlerin, utilisée comme inhibiteur spécifique de la PKC δ , inhibe significativement cette hyperphosphorylation en Tyr³¹¹ dépendamment de la concentration. L'inhibition de l'activité de la PKC δ par la rottlerin a été aussi associée à une atténuation significative de la surexpression protéique endogène de Gq α /PLC β 1 et l'hypertrophie des CMLVs de SHR. De plus, l'inhibition pharmacologique de l'activité de la PKC δ , en amont du stress oxydatif, a permis d'inhiber significativement l'activité de la NADPH, le taux de production élevée de l'ion superoxyde ainsi que l'hyperphosphorylation de la molécule ERK1/2, de la molécule c-Src et des RTKs. À notre surprise, nous avons aussi remarqué une surexpression protéique de l'EGFR et de l'IGF-1R dans les CMLVs de SHR à l'âge de 16 semaines. L'inhibition pharmacologique de l'activité de la PKC δ , de la molécule c-Src et du stress oxydatif a permis d'inhiber significativement la surexpression protéique endogène de ces RTKs. De plus, l'inhibition de l'expression protéique de l'EGFR et de la molécule c-Src par des siRNA spécifiques atténue significativement le taux d'expression protéique élevé de Gq α et de PLC β 1 ainsi que le taux de synthèse protéique élevé dans les CMLVs de SHR. Des siRNAs spécifiques à la PKC δ ont permis d'atténuer significativement le taux de synthèse protéique élevé dans les CMLVs de SHR et confirment le rôle important de la PKC δ dans les mécanismes moléculaires de l'hypertrophie des CMLVs selon une voie dépendante du stress oxydatif. En conclusion, ces résultats suggèrent un rôle important de l'activation endogène de l'axe Gq α -PLC β -PKC δ dans le processus d'hypertrophie vasculaire selon un mécanisme impliquant une activation endogène des récepteurs AT1/ETa, de la molécule c-Src, du stress oxydatif, des RTKs et des MAPKs.

Mots-clés : Gq α ; PLC β 1; PKC δ ; stress oxydatif; hypertrophie vasculaire; CMLV; SHR.

Abstract

Vascular Gq α signaling has been shown to regulate cardiovascular contractility and growth. Vascular smooth muscle cells (VSMC) from SHR have been shown to exhibit enhanced endogenous production of angiotensin II (Ang II) and endothéline-1 (ET-1). In addition, exogenous Ang II was shown to induce VSMC hypertrophy through Gq α and PKC δ signaling. However, studies on the role of Gq α /PLC β 1 proteins and PKC δ signaling in VSMC hypertrophy in animal model of essential hypertension are lacking. The objective of the present thesis is to examine the role of Gq α /PLC β proteins and the associated signaling pathways in VSMC hypertrophy using spontaneously hypertensive rats (SHR). VSMC from 16 week-old SHR (presence of cardiac hypertrophy) and not from 12 week-old SHR (absence of cardiac hypertrophy) exhibited enhanced levels of Gq α /PLC β 1 proteins as compared to age-matched Wistar-Kyoto (WKY) rats. The knockdown of Gq α and PLC β 1 in VSMC from 16 week-old SHR by antisense oligodeoxynucleotides and/or siRNA resulted in attenuation of protein synthesis. In addition, the enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins, enhanced phosphorylation of ERK1/2 and enhanced protein synthesis in VSMC from SHR were attenuated by Ang II AT₁ and ET-1 ET_A receptor antagonists losartan and BQ123, respectively, but not by ET_B receptor antagonist BQ788. In addition, PD98059 decreased the enhanced expression of Gq α /PLC β 1 and protein synthesis in VSMC from SHR. Since oxidative stress has been shown to be increased in hypertension, we tested the role of oxidative stress in enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and VSMC hypertrophy in SHR and further explore the underlying mechanisms responsible for this response. The increased expression of Gq α and PLC β 1 proteins as well as increased protein synthesis exhibited by VSMC from SHR were significantly attenuated by antioxidants: N-acetylcysteine (NAC), a scavenger of superoxide anion, DPI, an inhibitor of NAD(P)H oxidase, PP2 (c-Src inhibitor), AG1024 (IGFR inhibitor), AG1478 (EGFR inhibitor) and AG1295 (PDGFR inhibitor). In addition, the levels of IGF-1R and EGFR proteins and not of PDGFR were also enhanced in VSMC from 16 week-old SHR which were attenuated significantly by NAC, DPI and PP2. Furthermore, the inhibition of oxidative stress and c-Src molecule also attenuated the enhanced phosphorylation of IGF-1R, PDGFR, EGFR and ERK1/2 in VSMC from SHR. To

further confirm our results, the knockdown of EGFR and c-Src with specific siRNA was also associated with a significant decrease in the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis in VSMC from SHR. In another study we showed also that VSMC from 16 week-old SHR exhibit enhanced phosphorylation of PKC δ at Tyrosine 311 (Tyr³¹¹) as compared to VSMCs from WKY rats which was attenuated by rottlerin (PKC δ inhibitor) in a concentration dependant-manner. Furthermore, rottlerin also attenuated the increased production of superoxide anion, NAD(P)H oxidase activity, c-Src phosphorylation and ERK1/2 phosphorylation in VSMC from SHR. In addition, rottlerin and PKC δ -siRNA also attenuated the enhanced protein synthesis in VSMC from SHR. The increased expression of Gq α , PLC β 1, IGF-1R and EGFR exhibited by VSMC from SHR were also attenuated by rottlerin in a concentration dependant manner. Rottlerin also inhibited significantly the enhanced phosphorylation of IGF-1R, PDGFR and EGFR in VSMCs from SHR and WKY. These results suggest that the enhanced levels of endogenous Ang II and ET-1 enhanced the expression of Gq α /PLC β 1 proteins in VSMC from 16 week-old SHR and result in VSMC hypertrophy. On the other hand, the enhanced oxidative stress, c-Src and PKC δ activation, through the transactivation of growth factor receptors and MAPK signaling contribute to enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and resultant enhanced protein synthesis.

Key Words: Gq α ; PLC β 1; PKC δ ; oxidative stress; VSMC; hypertrophy; SHR.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières.....	vii
Liste des figures	xi
Liste des abréviations.....	xv
Remerciements.....	xxii
Chapitre I - Introduction (revue de littérature)	1
1.1 Système cardiovasculaire.....	2
1.1.1 Système vasculaire.....	2
1.1.1.1 Cellule musculaire lisse vasculaire	5
1.1.1.2 Cellule endothéliale	6
1.1.2 Système cardiaque	7
1.1.2.1 Généralité.....	7
1.1.2.2 Révolution cardiaque	8
1.2 Pression artérielle.....	9
1.2.1 Mécanisme de régulation de la pression artérielle.....	9
1.2.1.1 Mécanisme de régulation à court terme	9
1.2.1.2 Mécanismde de régulation à long terme	10
1.3 Rôle des agonistes vasoactifs dans la régulation de la pression artérielle	11
1.3.1 Système rénine angiotensine et angiotensine II	11
1.3.1.1 Récepteur type 1 de l'angiotensine II (AT1).....	14
1.3.1.2 Récepteur type 2 de l'angiotensine II (AT2).....	15
1.3.1.3 Peptides dérivant de l'angiotensin et leurs récepteurs.....	15
1.3.2 Système endothéline	17
1.3.2.1 Récepteurs de l'endothéline-1	20
1.3.2.2 Rôle de l'endothéline-1 dans l'hypertension artérielle pulmonaire	21
1.3.2.3 Système endothéline : Thérapies et limites.....	22
1.4 Mécanismes de signalisation transmembranaire.....	24
1.4.1 Récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G.....	25

1.4.2 Protéine G	26
1.4.3 Système adénylate cyclase	26
1.4.3.1 Système adénylate cyclase et adénosine monophosphate cyclique	26
1.4.3.2 Protéine $G_{i\alpha}$	28
1.4.4 Système de phosphoinositides	28
1.4.4.1 Protéine $G_{q/11\alpha}$	29
1.4.4.2 Phospholipase C (PLC) β	33
1.4.4.3 Mécanisme d'entrée du calcium dans les CMLVs	34
1.4.5 Protéine kinase C (PKC)	35
1.4.5.1 PKCs nouvelles	36
1.4.5.2 PKCs conventionnelles	37
1.4.6 Récepteurs des facteurs de croissance	38
1.4.6.1 Récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR)	39
1.4.6.2 Récepteur du facteur de croissance insulino-mimétique (IGF-1R)	40
1.4.6.3 Récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR)	41
1.4.7 Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)	42
1.4.8 Signalisation MAP kinase	43
1.4.9 Stress oxydant	44
1.5 Hypertension	47
1.5.1 Modèle animal d'hypertension essentielle (<i>spontaneously hypertensive rats</i>)	48
1.6 Complications cardiovasculaires liées à l'hypertension	50
1.6.1 Remodelage vasculaire : définitions et mécanismes moléculaires	50
1.6.1.1 Dédifférenciation des CMLVs et dynamique calcique	52
1.6.1.2 Prolifération des CMLVs	54
1.6.1.3 Hypertrophie des CMLVs	55
1.6.1.4 Protéines contractiles et hypertrophie des CMLVs	56
1.6.1.5 Forces de pression et hypertrophie vasculaire	57
1.6.1.6 Rôle d'angiotensine II dans le remodelage vasculaire	58
1.6.1.7 Rôle de l'endothéline-1 dans le remodelage vasculaire	59
1.7.2 Hypertrophie cardiaque : définition et mécanismes moléculaires	60
Hypothèse	63

Objectifs.....	64
Chapitre II: Résultats	65
Article (1): enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins contributes to vascular smooth muscle cell hypertrophy in SHR: role of endogenous angiotensin II and endothelin-1.....	68
Abstract.....	69
Introduction.....	70
Materials and methods	72
Results.....	77
Discussion.....	83
References.....	88
Figures legends	93
Article (2): oxidative stress contributes to the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and hypertrophy of VSMC from SHR: role of growth factor transactivation.	106
Abstract.....	107
Introduction.....	109
Materials and methods	111
Results.....	116
Discussion.....	122
References.....	127
Figures legends	132
Article (3): Role of PKC δ signaling in VSMC hypertrophy in spontaneously hypertensive rats (SHR).....	149
Abstract.....	150
Introduction.....	151
Materials and methods	153
Results.....	157
Discussion.....	162
References.....	166
Figures legends	172

Chapitre III: Discussion générale, conclusion et perspectives.....	185
Discussion générale	186
Conclusion	204
Perspectives.....	206
Bibliographie.....	209

Liste des figures

Chapitre 1 : revue de littérature

Figure 1: Structure simplifiée de la paroi artérielle de l'aorte.....	4
Figure 2: Voies de signalisation liées à la protéine Gq α et Gi2 α couplées au récepteur AT1 de l'Ang II et ET _A de l'ET-1 dans une CMLV.....	13
Figure 3: Différents types d'endothéline.....	18
Figure 4: Biosynthèse d'endothéline-1	20
Figure 5: Structure du récepteur couplé à une protéine G.....	25
Figure 6: Mécanisme intracellulaire de la voie de signalisation de Gq α dans la CMLV.....	31
Figure 7: Structure simplifiée de la phospholipase C β	33
Figure 8: Structure simplifiée de la NADPH oxydase dans une CMLVs.....	45
Figure 9 : Différents aspects du remodelage vasculaire.....	51

Chapitre 2: Résultats

Article scientifique (1)

Figure 1: VSMC from SHR exhibit enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis.....	98
Figure 2: Role of AP-1 and NF- κ B in enhanced expression of Gq α /PLC β 1.....	99
Figure 3 : Knockdown of Gq α decreases protein synthesis in VSMC from SHR.....	100
Figure 4 : Implication of PLC and PLC β 1 protein in enhanced protein synthesis in VSMC from SHR.....	101
Figure 5 : Role of MAPK on enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis in VSMC from SHR.....	102
Figure 6 : Implication of AT1 and ETA receptor in enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis in VSMC from SHR.....	103

Figure 7: Role of MAPK on enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis in VSMC from SHR.....	104
Figure 8: The possible intracellular signaling mechanisms implicated in the enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and VSMC hypertrophy.....	105

Article scientifique (2)

Figure 1: Effect of NAC and DPI on protein synthesis and Gq α /PLC β 1 protein expression in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats.....	138
Figure 2: Effect of NAC and DPI on cell volume of vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats.....	139
Figure 3: Effect of growth factor receptor inhibition on the enhanced protein expression of Gq α /PLC β 1 and enhanced protein synthesis in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats.....	140
Figure 4: Effect of the knockdown of EGFR on enhanced expression Gq α /PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats.....	141
Figure 5: Effect of NAC and DPI on EGFR, IGF-1R and PDGFR phosphorylation and expression in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats.....	142
Figure 6: Effect of c-Src inhibitor (PP2) on enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats.....	143
Figure 7: Effect of the knockdown of c-Src on the expression of Gq α /PLC β 1 proteins and protein synthesis in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats.	144
Figure 8: Effect of NAC and DPI on enhanced c-Src phosphorylation in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats.....	145

Figure 9: Effect of c-Src inhibitor on EGFR, IGF-1R and PDGFR phosphorylation and expression in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats.	146
Figure 10: Effect of ROS inhibition and c-Src inhibition on p42/44MAPK signaling in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats.....	147
Figure 11: The possible intracellular signaling mechanisms implicated in the oxidative stress-induced overexpression of Gq α /PLC β 1 proteins and resultant VSMC hypertrophy.....	148

Article scientifique (3)

Figure 1: Effect of rottlerin on PKC δ phosphorylation at Tyr311 in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats.....	176
Figure 2: Effect of rottlerin on protein synthesis in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats.....	177
Figure 3: Effect of the knockdown of PKC δ on protein synthesis in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats.....	178
Figure 4: Effect of rottlerin on enhanced expression of Gq α /PLC β 1 in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats.....	179
Figure 5: Effect of rottlerin on NADPH activity and ROS production in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats.....	180
Figure 6: Effect of PKC δ inhibition on c-Src activity in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats.....	181
Figure 7: Effect of PKC δ inhibition on p42/44MAPK signaling in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats.....	182

- Figure 8: Effect of rottlerin on EGF-R and IGF-1R phosphorylation and expression in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats.....183
- Figure 9: The possible intracellular signaling mechanisms implicated the endogenous enhanced PKC δ activation associated with enhanced PKC δ phosphorylation at Tyr311 in VSMC hypertrophy and associated signaling.....184

Chapitre 3 : discussion, conclusion et perspectives

- Figure 10: Modèle représentatif du mécanisme moléculaire de l'hypertrophie des CMLVs dans le modèle animal de l'hypertension essentielle (SHR).....205

Liste des abréviations

1K1C	one kidney one clip
AC	adénylate cyclase
ADAM17	<i>ADAM metallopeptidase domain 17</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
PKB (Akt)	protéine kinase B
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
Ang (1-7)	angiotensine (1-7)
Ang II	angiotensine II
Ang III	angiotensine III
Ang IV	angiotensine IV
ANP	<i>atrial natriuretic peptide</i>
AP-1	protéine activateur 1
aPKCs	PKC atypiques
ARN	acide ribonucléique
AT1	récepteur d'angiotensine II type 1
AT2	récepteur d'angiotensine II type 2
ATP	adénosine triphosphate
AVC	accidents vasculaires cérébraux
bFGF	<i>fibroblast growth factor</i>
BNP	<i>brain natriuretic peptide</i>
Ca ²⁺	calcium
CAT	catalase
CE	cellule endothéliale
CMLV	cellule musculaire lisse vasculaire
COX-2	cyclo-oxygénase
cPKCs	PKC conventionnelles
CX43	connexine 43
DAG	diacylglycérol

DOCA	déoxycorticostérone acétate
ECA	enzyme de conversion de l'angiotensine II
ECE	enzyme de conversion de l'endothéline
EDHF	facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium
EET	acides époxyeicosatriénoïques
EGF	facteur de croissance épidermique
EGFR	récepteur de facteur de croissance épidermique
Egr-1	<i>early growth response-1</i>
ENaC	<i>epithelial sodium channel</i>
eNOS	monoxyde d'azote synthase endothéliale
EPI	epinéphrine
ERK1/2	<i>extracellular signal regulated kinases 1 and 2</i>
ERN	espèces réactives nitrosylées
ERO	espèces réactives oxygénées
ET	endothéline
ET-1	endothéline-1
ET _A	récepteur d'endothéline type A
ET _B	récepteur d'endothéline type B
FGF-2	facteur de croissance des fibroblastes
GDP	guanosine diphosphate
Gi	protéines G inhibitrices
Gpx	glutathione peroxidase
GqI	<i>peptide inhibitor of Gq</i>
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GRK2	<i>G protein-coupled receptor kinases</i>
Gs	protéines G stimulatrices
GTP	guanosine triphosphate
GPX	glutathione peroxidase
Grb2	protéine-2 liant un récepteur de facteur de croissance
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
HAP	hypertension artérielle pulmonaire

IGF	facteur de croissance insulino-mimétique
IGF-1R	récepteur de facteur de croissance insulino-mimétique
iNOS	inductible nitric oxide synthase
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
IP3R	récepteur de l'IP3
IRAP	<i>Insuline-regulated aminopeptidase</i>
JNK	kinase N-terminale c-jun
kDa	kilodalton
LEE	limitante élastique externe
LEI	limitante élastique interne
L-NAME	L-NG-Nitroarginine methyl ester
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
MAPKs	<i>mitogen activated protein kinases</i>
MasR	récepteur Mas
MEC	matrice extracellulaire
MHC	<i>myosin heavy chain</i>
MmHg	millimètre de mercure
NA	noradrénaline
NADPH oxydase	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase
NE	norépinephrine
NFκB	facteur nucléaire κB
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NO	monoxyde d'azote
NO ₂	dioxyde d'azote
NOX	NADPH oxydase
nPKCs	PKC nouvelles
O ₂ ⁻	anion superoxyde
OH ⁻	radical hydroxyle
ONOO ⁻	peroxynitrite
p70S6k	protéine ribosomale S6 kinase de 70-kilodaltons
PA	pression artérielle

PAD	pression artérielle diastolique
PAR	<i>protease-activated receptor</i>
PAS	pression artérielle systolique
PDFG	facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDFGR	récepteur de facteur de croissance dérivé des plaquettes
PE	phényléphrine
PG	prostaglandines
PH	domaine d'homologie à la pleckstrin
PI	phosphatidylinositol
PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase
PIP2	phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PKA	protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKB	protéine kinase B
PKC	protéine kinase C
PLC β	phospholipase C de type β
PPARs	<i>peroxisome proliferator-activated receptors</i>
PTK	protéine à activité tyrosine kinase
PTX	toxine pertussique
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RCPG	récepteur couplé à la protéine G
RE	reticulum endoplasmique
RO	radical alkoxy
ROCE	<i>receptor-operated Ca²⁺ entry</i>
ROO	radical hydroxyle
RS	réticulum sarcoplasmique
RTK	récepteur tyrosine kinase
S-1-P	sphingosine-1-phosphate
Shc	<i>Src homology 2 domain containing</i>
SHR	<i>spontaneously hypertensive rats</i>
SM22 α	<i>smooth muscle (SM)22α</i>
SOCE	<i>store-operated Ca²⁺ entry</i>

SOD	superoxyde dismutase
Sos	<i>son of sevenless</i>
SRA	système rénine angiotensine
TGF- β	facteur de croissance transformant beta
TCA	acide trichloroacétique
TRPC	<i>transient receptor potential cation</i>
VEGF	<i>channels vascular endothelial growth factor</i>
VG	ventricule gauche
VSMC	<i>vascular smooth muscle cells</i>
X/OX	xanthine oxydase (X/XO)

À mon père, Larbi, et ma mère, Zinab

*Par la grâce de Dieu et vos soutiens, j'ai pu franchir plusieurs étapes dans
ma vie*

À ma famille

À mes amis

«All of science is nothing more than the refinement of everyday thinking».

Albert Einstein

«From what we get, we can make a living; what we give, however, makes a life».

Arthur Ashe

Remerciements

J'aimerais remercier au premier lieu ma directrice de recherche, Dre. Madhu B. Anand-Srivastava, pour m'avoir donné la chance de travailler dans son laboratoire et poursuivre mes études doctorales. J'aimerais la remercier pour l'encadrement, le soutien et la confiance qu'elle m'a témoignés.

Je voudrais remercier les membres de jury, Dre. Johanne Tremblay et Dr. Ghassan Bkaily, d'avoir accepté d'évaluer ma thèse.

Je tiens à exprimer mes remerciements pour Dr. Rémy Sauvé pour sa disponibilité, son esprit scientifique et pour le temps accordé pour évaluer cette thèse.

Mes remerciements à Dr. Réjean Couture pour sa disponibilité et ses conseils.

Mes remerciements vont aussi à Dre. Michelle Brochu pour ses efforts à amener un nouveau souffle au département.

Je tiens à remercier mes collègues et amis du laboratoire avec lesquelles j'ai partagé des moments agréables. Je cite surtout Dre Magda Descorbeth, Jasmine El-Andalousi, Yessica-Haydee Gomez, Nathan Mbong, Dre Yuan Li et Dr Hussein Ekhtear. Mes remerciements à mes amis, surtout Hamza, Youssef, Bader et Adil Slimani pour leur soutien et amitié.

Également, je tiens à remercier mes professeurs au Maroc pour leur soutien et support, je cite tout spécialement Dr. Hassan Ageunaou, Dre. Najat Mokhtar et Dr. Abdellatif Bour.

Mes remerciements pour tout le personnel de soutien du département de physiologie moléculaire et intégrative de l'Université de Montréal. Je tiens à remercier spécialement Mme. Joanne Payette, Mme. Pierrette Fournel et M. Benoit Lanthier pour leur disponibilité remarquable et pour leurs efforts accordés au département.

Finalement, je tiens à mentionner le support de la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales de l'Université de Montréal (FESP) (bourse d'exemption de frais de scolarité pour étudiants étrangers), du Groupe d'étude des protéines membranaires (GÉPROM) et d'Hypertension Canada (bourse de voyage).

Chapitre I-Introduction

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire est une structure anatomique indispensable pour le fonctionnement de l'organisme par son rôle unique dans le pompage et le transport du sang, entre le cœur et les différents organes de l'organisme. Ce système est constitué du cœur, qui assure le pompage du sang sous haute pression, et des vaisseaux sanguins, qui assurent la conduction et la distribution du sang vers les différentes parties de l'organisme et son réacheminement vers les poumons et les reins.

1.1.1 Système vasculaire

Le système vasculaire correspond à l'ensemble de réseaux vasculaires de l'organisme dont la fonction, la structure et l'origine embryologique sont différentes selon le territoire vasculaire. Le tissu vasculaire est formé de plusieurs types cellulaires qui sont essentiellement les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs), les cellules endothéliales (CEs), les péricytes, les fibroblastes et les macrophages résidents (Chistiakov et al 2015b). Une grande partie de la population de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) est originaire de cellules mésenchymateuses du mésoderme, alors que les CMLVs des artères larges qui se trouvent à proximité du cœur proviennent de crêtes neurales de l'ectoderme (Mikawa & Gourdie 1996). Les CMLVs de vaisseaux coronaires sont issues de l'organe proépicardique (Hirschi & Majesky 2004, Majesky 2007, Waldo et al 2005). Le rôle principal du système vasculaire est de transporter le sang chargé d'oxygène, de nutriments et de substances bioactives vers les différentes parties de l'organisme et d'acheminer le gaz carbonique et les déchets de biodégradation vers essentiellement les poumons et les reins. Les

vaisseaux sont constitués généralement de trois couches superposées (Pugsley & Tabrizchi 2000) qui forment un cylindre dont les couches de l'intérieur à l'extérieur sont :

- Tunica intima (tunique interne) : constituée de cellules endothéliales (CE) formant une couche monocellulaire, qu'on appelle endothélium, dont la partie apicale forme un épithélium pavimenteux simple en contact direct avec le sang. L'endothélium est pourvu d'une membrane basale délimitée par une couche conjonctive plus ou moins épaisse selon le calibre du vaisseau. Une limitante élastique interne (LEI) permet de séparer l'intima de la tunica media (Fisher 2010).
- Tunica media (tunique moyenne) : constituée majoritairement de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs), responsables du tonus vasculaire et de la matrice extracellulaire qui contient généralement de l'élastine et du collagène fibrillaire de type I et III. On note parfois la présence de fibres élastiques constituées d'élastine associée à des microfibrilles (Fisher 2010).
- Adventice (tunique externe) : formée de fibres de collagène structurale (tissu conjonctif) associés à des vaisseaux nourriciers, appelés vasa vasorum dans le cas de vaisseaux de gros calibre (figure 1). Les fibres de collagène adventitielles de grosses artères de conduction jouent un rôle important dans la préservation de l'intégrité structurale lors d'une pression intramurale élevée (Burton 1954). Les veines du moyen calibre sont pourvues d'une adventice épaisse renfermant des CMLVs longitudinales. On note aussi la présence de faisceaux musculaires lisses orientés longitudinalement selon le sens du flux sanguin. L'adventice est pourvue d'une limitante élastique externe (LEE) qui la sépare de la media (Fisher 2010).

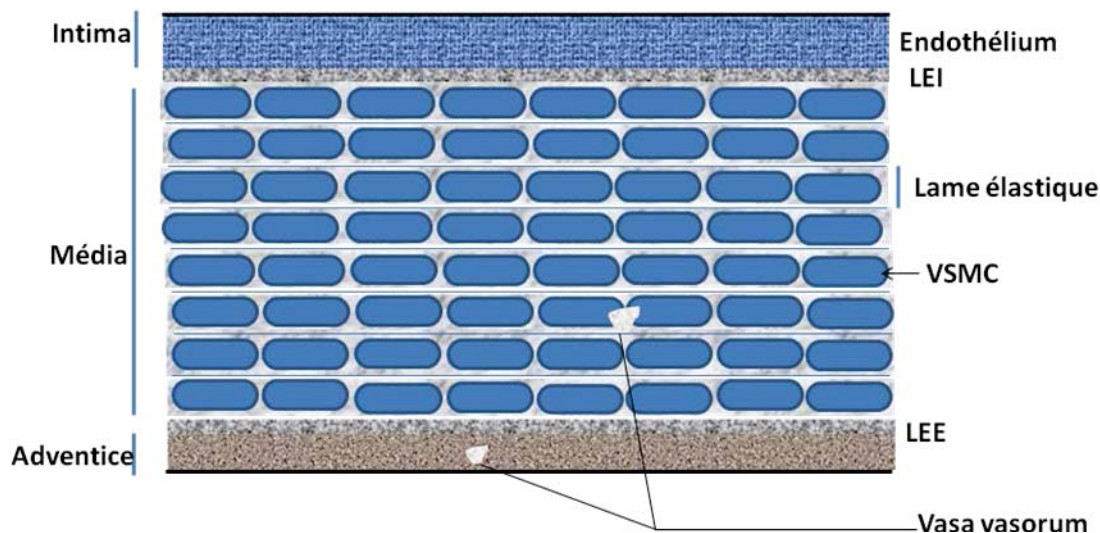


Figure 1 : Structure simplifiée de la paroi artérielle de l'aorte. LEI (limitante élastique externe); LEE (limitante élastique externe). Le nombre des lames élastiques est à titre indicatif.

On distingue principalement deux types de vaisseaux selon leur fonction et leur emplacement anatomique. Les vaisseaux de conduction de gros calibre (ex. : aorte) et les vaisseaux de résistances de petit calibre (ex. : artérioles).

- Les vaisseaux de conduction : ce sont des artères élastiques de gros calibre caractérisées par une paroi musculaire épaisse qui permet d'assurer le tonus vasculaire nécessaire. En effet, sous la pression de l'afflux du sang, ces structures musculaires augmentent leur calibre et permettent ainsi, suite à des cycles périodiques de vasodilatation-vasoconstriction, d'amener le sang vers les artérioles. Ces gros vaisseaux sont caractérisés par une intima pourvue d'une membrane basale et d'une couche conjonctive sous-endothéliale, et par une media constituée de plusieurs couches de lames élastiques et de CMLVs. La couche moyenne de l'aorte contient essentiellement de l'élastine et du collagène (Fisher 2010, Marieb et al 2010).

- Les vaisseaux de résistance : ce sont des vaisseaux qui rentrent en communication directe avec les capillaires. La tunique moyenne se caractérise par une couche mono ou multicellulaire très fine constituée de CMLVs (Marieb et al 2010).

1.1.1.1 Cellule musculaire lisse vasculaire

Les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) constituent la principale unité structurale responsable du tonus vasculaire par son rôle important dans le contrôle local du volume et de la pression du sang suite à une série de vasodilatation/vasoconstriction en transformant l'énergie biochimique en force mécanique. En effet, une augmentation du calcium intracellulaire dans une CMLV induit une phosphorylation de chaînes légères de myosines qui interagissent avec l'actine en induisant une contractilité tonique ou phasique (Fisher 2010). Les artères renferment une quantité importante de CMLVs par rapport aux veines à cause de leur rôle essentiel dans la conduction du sang oxygéné vers les différentes parties de l'organisme (Marieb et al 2010). Les CMLVs sont entourées par une matrice extracellulaire (MEC) formée essentiellement par le collagène et l'élastine (Marchand et al 2012, Nelson et al 1995). Outre son rôle structural et mécanique, la CMLV joue un rôle physiologique très important par sa production des composantes de la MEC au cours du développement. Le tonus musculaire de base est contrôlé à la fois par une autorégulation intrinsèque de la CMLV et des mécanismes extrinsèques impliquant un système neuro-humoral. En effet, les cellules musculaires sont pourvues de plusieurs récepteurs membranaires couplés à des protéines G, dont l'activation par un agoniste induit une augmentation de la concentration cytosolique du calcium. Outre son rôle dans la régulation du tonus vasculaire, les CMLVs, dans les conditions pathologiques, jouent un rôle important dans

l'établissement et le développement de certaines maladies vasculaires telles que la resténose, l'hypertension et l'athérosclérose. À titre d'exemple, la migration des CMLVs de la couche moyenne (media) vers la couche interne (intima) est l'un des facteurs majeurs pour les maladies vasculaires comme l'hypertension, l'athérosclérose et la (re)sténose (Herring et al 2014, Purcell et al 1997). Dans le cas de l'athérosclérose, on assiste à une infiltration des CMLVs de la média vers l'intima, où elles commencent à se proliférer et à s'hypertrophier en changeant ainsi leur phénotype contractile vers un phénotype sécrétoire, caractérisé par une sécrétion exagérée de la matrice extracellulaire (Herring et al 2014). En plus, les CMLVs sont aussi capables de synthétiser d'une manière endogène des agents vasoactifs comme l'Ang II et l'ET-1 (Fukuda et al 1999, Lu et al 2003). Ces agonistes promoteurs de croissance et de prolifération cellulaire agissent d'une manière autocrine et paracrine sur les CMLVs.

1.1.1.2 Cellule endothéliale

La cellule endothéliale (CE) constitue l'un des principaux types cellulaires du tissu vasculaire, et joue un rôle essentiel dans le contrôle du tonus vasculaire (Boegehold 1998) par sa capacité de synthèse des substances vasodilatatrices comme le monoxyde d'azote (NO). Ce second messenger joue un rôle important dans la vasodilatation ainsi que dans l'inhibition de la prolifération et de la migration des CMLVs (Braquet et al 1994). Les CEs sécrètent aussi d'autres facteurs vasodilatateurs appelés facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF). Ces facteurs sont impliqués dans la régulation du tonus vasculaire par leur rôle crucial dans l'hyperpolarisation et la relaxation subséquente des CMLVs (Kause 1989; Nagao et Vanhoutte 1992). En effet, une stimulation des CEs induit une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire (Marrelli 2001) et une hyperpolarisation subséquente

à une activation des canaux calciques sensibles au K^+ ($KCa_{3.1}$) (Marrelli et al 2003). Cette hyperpolarisation se transmet aux CMLVs sous-jacentes par le passage des facteurs paracrines à travers la membrane plasmique ou à travers des jonctions communicantes. Parmi ces facteurs, on distingue surtout les acides époxyeicosatriénoïques (*epoxyeicosatrienoic acids* (*EETs*)) issus de la dégradation de l'acide arachidonique par le cytochrome P450 (Campbell 1996; Miura et Gutterman 1998). Cependant l'identité de ces facteurs hyperpolarisants peut être différente selon le territoire vasculaire (Campbell et al 1996, Fisslthaler et al 1999). Les CEs sont aussi capables de synthétiser des facteurs de croissance, comme le facteur de croissance fibroblastique (bFGF : *fibroblast growth factor*) et le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF : *vascular endothelial growth factor*) (Pai et al 2001, Vlodaysky et al 1987).

Le dysfonctionnement endothélial est caractérisé essentiellement par une diminution de la capacité de synthèse du NO par les CEs. Étant donné le rôle important du NO dans la prolifération des CEs et dans l'inhibition de la prolifération des CMLVs (Braquet et al 1994), le dysfonctionnement endothélial constitue un facteur étiologique important de plusieurs maladies vasculaires, telles que la (re)sténose, l'hypertension artérielle et l'athérosclérose.

1.1.2 Système cardiaque

1.1.2.1 Généralité

Le cœur est un organe musculaire creux qui joue un rôle principalement mécanique, par son éjection du sang dans le système vasculaire. En fait, suite à des contractions rythmiques, le cœur propulse le sang vers les différents organes de l'organisme afin d'approvisionner la cellule en nutriments et oxygène, et d'en ramasser les déchets

métaboliques. Il est constitué d'une superposition de trois couches : le péricarde, le myocarde et l'endocarde. De point de vue fonctionnel, le cœur est constitué d'une partie droite et gauche, séparés par le septum, qui assure une parfaite isolation entre la petite et la grande circulation. Le ventricule joue un rôle de pompage assuré par une paroi musculaire élastique, plus épaisse par rapport à celle de l'oreillette (Marieb et al 2010).

1.1.2.2 Révolution cardiaque

L'ensemble des événements mécaniques survenant dans le cœur entre deux systoles auriculaires se résume dans le terme «révolution cardiaque». Lors d'une systole auriculaire, on assiste à une éjection du sang dans les ventricules, selon un principe de remplissage actif, ce qui induit une élévation de la pression intraventriculaire et une fermeture des valves auriculo-ventriculaires. La systole ventriculaire aura lieu quand la pression intraventriculaire est supérieure à la pression aortique. Elle se traduit par une ouverture des valves sigmoïdes, aortiques et pulmonaires. Le relâchement du ventricule se traduit par une diminution de la pression intraventriculaire et une fermeture des valves sigmoïdes. Lors d'une diastole, on assiste à un remplissage actif de l'oreillette droite qui est alimentée par trois veines : la veine cave supérieure, la veine cave inférieure et le sinus coronaire. D'autre part, selon la loi de Starling, le cœur est capable de s'adapter au volume télédiastolique. En effet, suite à une hausse du volume télédiastolique, on assiste à une augmentation de la pression intraventriculaire et de la pression d'éjection ventriculaire (Marieb et al 2010). Afin de récompenser une augmentation de la pression artérielle et du volume d'éjection télédiastolique, l'hypertrophie cardiaque compensatoire permet l'augmentation de la pression intraventriculaire.

1.2 Pression artérielle

La pression artérielle (PA) reflète la force exercée par le sang sur la paroi des vaisseaux par unité de surface. En effet, suite à une contraction ventriculaire, le sang est expulsé vers l'aorte, à sa sortie du ventricule gauche, créant ainsi une force d'étirement de l'aorte, qui correspond à une pression artérielle systolique s'élevant à des valeurs moyennes, qui peuvent atteindre 120 millimètres de mercure (mmHg). La pression artérielle diastolique aura lieu quand l'aorte prend sa forme initiale. La PA est contrôlée par plusieurs organes qui s'interagissent en parfaite harmonie, pour assurer la circulation organisée du sang dans différentes parties de l'organisme, et permet de réguler la pression artérielle à court et à long terme. Les organes qui assurent ces mécanismes de régulation sont généralement : le cœur, les vaisseaux sanguins et lymphatiques, les reins et le cerveau (Marieb et al 2010).

1.2.1 Mécanisme de régulation de la pression artérielle

1.2.1.1 Mécanisme de régulation à court terme

La pression artérielle moyenne est la résultante du débit cardiaque et des résistances périphériques totales. Les mécanismes de régulation à court terme ont pour objectif principal de limiter les fluctuations régulières de la PA, en agissant sur la résistance périphérique. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la régulation à court terme de la pression artérielle dont on distingue surtout les barorécepteurs. En effet, l'information détectée par ces mécanorécepteurs est transmise par les nerfs afférents (nerfs vagues et nerfs de Hering) au centre cardiovasculaire bulbaire et réacheminée par les nerfs sympathiques et parasympathiques (Marieb et al 2010). La noradrénaline en provenance de neurones sympathiques, via ses récepteurs α 1-adrénergiques, induit un effet vasoconstricteur sur les

CMLVs (diminution du diamètre des vaisseaux) et un effet inotropique et chronotropique sur les cardiomyocytes (augmentation du débit cardiaque). Ces barorécepteurs, sensibles à ces changements de pression, sont situés dans l'aorte, dans les sinus carotidiens ainsi que dans les grosses artères du cou et du thorax (Marieb et al 2010). Une élévation de la pression artérielle est suivie par une inhibition du centre moteur bulbaire via les nerfs crâniens IX et X, ceci induit une vasodilatation des artérioles, suivie d'une diminution de la force de postcharge (retour veineux) et du débit cardiaque. Les chimiorécepteurs, classiquement impliqués dans la régulation de la fréquence respiratoire, participent aussi à la régulation de la pression artérielle à court terme, par leur rôle dans la détection des fluctuations de la concentration d'oxygène et du pH dans le sang (Marieb et al 2010). Plusieurs substances chimiques de la circulation systémique comme l'O₂, le CO₂ et le NO, sont capables d'influencer directement le tonus vasculaire et le centre vasomoteur. Les agonistes vasoactifs issus de la circulation systémique ou synthétisés localement comme l'Ang II et l'ET-1 jouent aussi un rôle important dans la régulation de la pression artérielle.

1.2.1.2 Mécanisme de régulation à long terme

La régulation à long terme de la pression artérielle est surtout assurée par des mécanismes rénaux (Marieb et al 2010). Une augmentation de la volémie induit une augmentation de la pression artérielle et vice-versa. Les reins ont un rôle unique dans la filtration du sang et la réabsorption et l'élimination d'eau et minéraux permettant ainsi d'ajuster l'homéostasie corporelle hydrique et minérale (Na⁺, K⁺, Cl⁻) et conséquemment la volémie; il en résulte ainsi un contrôle rénal efficace des valeurs de la pression artérielle. Par ailleurs, lors d'une diminution de la pression artérielle on assiste à une libération de la rénine,

enzyme essentielle dans le processus de synthèse de l'Ang II, ce qui permet d'augmenter les valeurs de la pression artérielle. À son tour, l'Ang II induit la libération de l'aldostérone, qui favorise la réabsorption du Na^+ , ce qui augmente la volémie et conséquemment la pression artérielle. L'effet synergique de l'Ang II et de l'aldostérone permet ainsi d'augmenter les valeurs de la pression artérielle, suite à une hypotension (Marieb et al 2010).

1.3 Rôle des agonistes vasoactifs dans la régulation de la pression artérielle

Les agonistes vasoactifs sont des molécules capables d'influencer le diamètre des vaisseaux sanguins par leur effet vasodilatateur (Ex. NO et prostacycline) ou vasoconstricteur (Ex. Ang II et ET-1). L'hypertension est associée à une augmentation de la concentration locale et/ou systémique de certains agonistes vasoconstricteurs, tels que l'Ang II et l'ET-1, aboutissant à des changements morphologiques de la paroi vasculaire, au niveau des petites artérioles de résistance et des grosses artères de conduction. En effet, dans le cas d'hypertension, on assiste à une augmentation de la résistance périphérique suite à une augmentation de la concentration des facteurs vasoconstricteurs par rapport aux facteurs vasodilatateurs.

1.3.1 Système rénine angiotensine et angiotensine II

Le système rénine angiotensine (SRA) fut décrit réellement pour la première fois par Goldblatt en 1964 (Goldblatt 1964). La rénine, synthétisée par les cellules myoépithéliales de l'artériole afférente du glomérule rénal, constitue le premier acteur du SRA (Hackenthal et al 1990). Elle permet le clivage de l'angiotensinogène, substrat synthétisé par le foie et libéré dans la circulation générale, en angiotensine I. Sous l'effet de l'enzyme de conversion de

l'angiotensine (ECA) présente dans l'endothélium pulmonaire, l'angiotensine I est rapidement convertie en angiotensine II (Ang II), qui constitue le principal acteur de ce système (Dorer et al 1972, Ng & Vane 1967). En plus d'un SRA systémique, on distingue un SRA local (Campbell & Habener 1986) dans plusieurs tissus, comme le cerveau (Ganten et al 1983), les reins (Celio & Inagami 1981) et les artères (Swales et al 1983). Les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) de rats hypertendus de type SHR produisent de l'Ang II à une quantité beaucoup plus importante comparée à des rats normotendus (Fukuda et al 1999). Cette hormone vasoactive joue un rôle pléiotropique par ses effets multiples sur plusieurs types d'organes, y compris le cerveau, le cœur, les vaisseaux et les reins. Il est connu classiquement par son implication dans l'hypertension et les complications cardiovasculaires liées à l'hypertension (Touyz & Berry 2002).

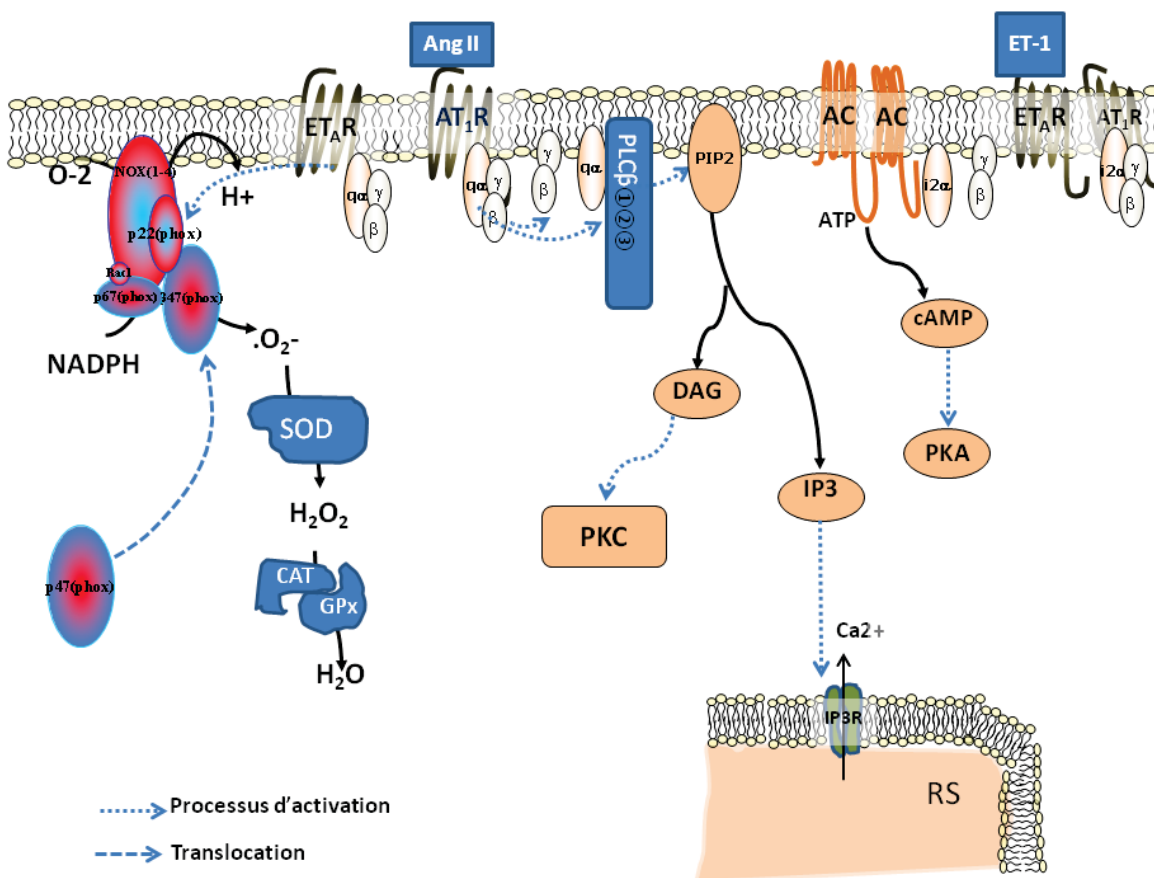


Figure 2 : Voies de signalisation liées à la protéine Gq α et Gi2 α couplées au récepteur AT1 de l'Ang II et ET $_A$ de l'ET-1 dans une CMLV.

Outre son rôle dans la régulation du tonus vasculaire, l'Ang II, même à des concentrations hémodynamiquement négligeables, est capable d'induire la prolifération et l'hypertrophie des CMLVs (Geisterfer et al 1988). La majeure partie des effets de l'Ang II au niveau vasculaire est médiée par son récepteur type 1 (AT1) (Daigle et al 2004) qui est le type le plus abondant au niveau vasculaire (Allen et al 2000, Savoia et al 2011). Il est couplé principalement à la protéine Gq/11 α (Sadoshima & Izumo 1996) et à la protéine Gi α (Anand-Srivastava 2010, Zhai et al 2005) (figure 2).

1.3.1.1 Récepteur type 1 de l'angiotensine II (AT1)

L'Ang II est une hormone potentiellement impliquée dans la régulation de la fonction rénale et cardiovasculaire. Cette hormone vasoactive est aussi impliquée dans la pathologie cardiovasculaire, par son action directe sur les cellules cardiaques et vasculaires. Effectivement, l'activation du récepteur AT1 couplé à la protéine G_i inhibe l'adénylate cyclase et diminue par la suite la biodisponibilité de l'AMPc (Shirai et al 1995)(figure 2). L'activation du récepteur AT1 couplé à la protéine $G_{q\alpha}$ induit, quant à lui, une mobilisation du calcium du RE au cytosol et une activation de la PKC. L'activation de l'AT1 est aussi associée à une stimulation de l'enzyme NADPH oxydase et une augmentation des EROs qui induisent, au moins partiellement, les effets de l'Ang II (Touyz et al 2003b) (figure 2). En effet, l'activation du récepteur AT1 transactive des récepteurs des facteurs de croissance par le biais d'une augmentation de production des EROs (Stouffer et al 2001, Suzuki & Eguchi 2006). L'activation de ces voies de signalisation par le récepteur AT1 affecte une variété de processus physiologiques et pathologiques y compris la contraction vasculaire, le dysfonctionnement endothélial, la survie cellulaire, l'hypertrophie cardio-vasculaire, la fibrose et la thrombose. Les effets intrarénaux de l'Ang II consistent surtout à une vasoconstriction de vaisseaux rénaux et conséquemment une diminution du débit sanguin rénal. L'Ang II est aussi un stimulateur important de la sécrétion de l'aldostérone dont l'effet positif sur la réabsorption du sodium par les tubules rénaux augmente la concentration de cet ion dans le compartiment extracellulaire, entraînant une rétention d'eau et une augmentation de la pression artérielle secondaire à une augmentation du volume extracellulaire (Marieb et al 2010).

1.3.1.2 Récepteur type 2 de l'angiotensine II (AT2)

À l'instar du récepteur AT1, le récepteur AT2 de l'Ang II constitue une structure à sept domaines transmembranaires. Ce récepteur est largement exprimé au cours du développement embryonnaire et joue un rôle crucial dans la vasculo-genèse (Yamada et al 1999) mais son abondance diminue drastiquement après la naissance (Nahmias & Strosberg 1995, Yamada et al 1999). Plusieurs études suggèrent un rôle vasodilatateur du récepteur AT2 dans différents territoires vasculaires (Danyel et al 2013, Dimitropoulou et al 2001, Katada & Majima 2002, Matrougui et al 1999). L'implication du récepteur AT2 dans les complications vasculaires reste controversée. Des rats transgéniques invalides pour le gène codant pour le récepteur AT2 (AT2KO) étaient plus susceptibles de développer de l'inflammation vasculaire neointimale par rapport aux rats contrôles (Akishita et al 2000). D'un autre côté, l'induction de la réexpression du récepteur AT2 a été remarquée dans certaines conditions pathologiques à caractère inflammatoire (Ruiz-Ortega et al 2003).

1.3.1.3 Peptides dérivant de l'angiotensine et leurs récepteurs

Le clivage spécifique de l'Ang II génère des peptides bioactifs qui sont essentiellement l'Ang (1-7), l'Ang III et l'Ang IV. L'Ang (1-7), généré par l'action de l'ECA2 sur l'Ang II (Vickers et al 2002), agit via son récepteur Mas (MasR) qui engendre des réponses antagonistes au récepteur AT1 de l'Ang II (Ingelfinger 2009, Lin et al 2015, Santos & Ferreira 2007), en induisant un effet antiprolifératif, antihypertrophique et vasodilatateur impliquant ainsi un mécanisme de contre-régulation des effets de l'Ang II. Plusieurs recherches ont rapporté un rôle thérapeutique important de ce peptide contre l'hypertension artérielle et les

complications cardiovasculaires liées à cette hypertension (Fontes et al 2015, Lin et al 2015, Silva et al 1993, Zhang et al 2015). De plus, une diminution dans la biodisponibilité de l'Ang (1-7) est remarquée dans le cas de l'hypertension et son administration induit une réduction significative de la pression artérielle systolique chez les rats SHR (Benter et al 2008, Dhaunsi et al 2010). Contrairement à l'Ang II, l'Ang (1-7) a un effet anti-nociceptif impliquant l'inhibition de la voie des MAPKp38 (Costa et al 2012).

L'Ang III (Ang 2 à 8), issu de la dégradation de l'Ang II par l'aminopeptidase A, agit aussi sur les récepteurs AT1 et AT2 de l'Ang II permettant ainsi d'induire des effets vasomoteurs et des réactions nociceptives similaires (Reaux et al 1999, Wright et al 1985), et semble jouer un rôle important dans le contrôle du flux sanguin au niveau cérébral (Marc & Llorens-Cortes 2011). L'action de l'aminopeptidase N sur l'Ang III génère l'Ang IV (Ang 3 à 8) (Chow et al 2015). Pendant longtemps, l'Ang IV a été considérée comme un métabolite non actif de l'Ang II. Cependant, ce peptide a montré des effets positifs en termes d'amélioration des habilités cognitives et de la capacité de mémorisation chez les rats. Cet effet mnémonique de l'Ang IV semble lié à l'IRAP (*Insuline-regulated aminopeptidase*), nommé aussi AT4 (Harding et al 1992, Wright & Harding 1997). Ce récepteur joue un rôle important dans la transduction du signal lié à l'Ang IV au niveau central. Des études ont démontré aussi un rôle important de l'Ang IV dans la prévention de la dégradation des neuropeptides liés à la mémoire. La PKC ζ (zêta) semble jouer un rôle important dans la transduction du signal lié à l'Ang IV. En effet, l'activation de cette PKC atypique, indépendante du calcium et du DAG, génère la PKMzeta. Ce fragment de la PKC (ζ) est impliqué dans la potentialisation de la mémoire et de la cognition (taux d'exploration des nouveaux objets) au niveau de l'hippocampe (Sacktor et al 1993). Indépendamment des récepteurs AT1 et AT2 (Harding et al

1992), l'Ang IV est aussi impliqué dans la régulation du flux sanguin au niveau cérébrale (Braszko et al 1988, Wright et al 1995).

1.3.2 Système endothéline

L'endothéline est un peptide vasoactif synthétisé principalement par l'endothélium. Il est classiquement connu par ces effets vasoconstricteurs très puissants. On compte quatre types d'endothéline (ET-1, ET-2, ET-3 et ET-4) constitués de 21 acides aminés pourvus de deux ponts disulfures (Cys1-Cys15 et Cys3-Cys11) (Rautureau & Schiffrin 2012). L'ET-1 et l'ET-2 partagent une homologie de structure de 90% (Rautureau & Schiffrin 2012) (Figure 3). Chaque type d'endothéline est codé par un seul gène qui donne naissance à un précurseur, le prépro-endothéline, d'environ 200 acides aminés, et qui suite à son clivage par une endopeptidase de type furine, aboutit à la formation de la pro-endothéline. Les pro-ETs sont clivés par la furine et autre types de convertases pour donner naissance à des peptides de 38 à 39 acides aminés. La forme active des ETs est générée par des enzymes de conversion de l'endothéline dont on compte au moins 4 isoformes codées par l'épissage alternatif du même gène (ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c, ECE-1d) (Rautureau & Schiffrin 2012) (Figure 4). Outre les CEs, les CMLVs sont aussi capables de synthétiser l'ET-1 d'une manière endogène (Lu et al 2003). Le type de convertase présent sur la surface des CMLVs est l'enzyme de conversion de l'ET (ECE-2) qui se trouve à proximité des récepteurs d'endothéline (D'Orleans-Juste et al 2003).

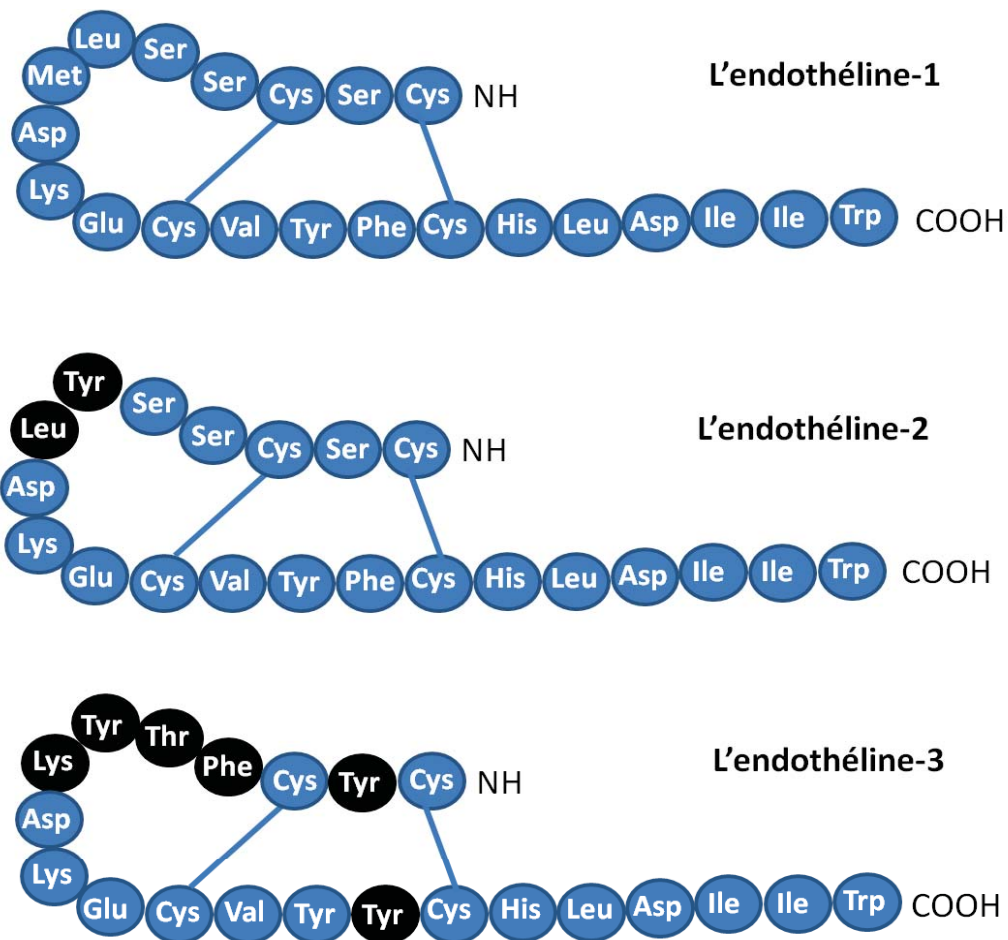


Figure 3: différents types d'endothéline. Source : adapté de Rautureau Y et Schiffrin EL (Rautureau & Schiffrin 2012).

L'ET-1 constitue le type d'endothéline le plus abondant au niveau vasculaire et le mieux caractérisé. Il est sécrété dans la partie abluminale de CEs et agit d'une manière autocrine et paracrine sur les cellules environnantes (Wagner et al 1992a). Il agit sur trois principaux types de récepteur ET_A , ET_{B1} et ET_{B2} , et joue un rôle important dans le contrôle de la pression artérielle systémique. La biosynthèse de l'ET-1 est régulée par plusieurs facteurs, tels que les forces de cisaillement qui constituent un stimulateur de la libération du NO par les CEs, ce qui influence négativement la synthèse de l'ET-1 par l'endothélium (Boulanger et al 1992, Malek & Izumo 1992). On note, entre autres, le rôle important des agonistes vasoactifs

comme l'Ang II, la thrombine, la leptine et l'adrénaline dans la biosynthèse de l'ET-1 (Quehenberger et al 2002). Les EROs constituent aussi un stimulateur potentiel de la synthèse de l'ET-1 (Kahler et al 2000). Des facteurs de transcription comme l'isoforme α et γ du récepteur activé des proliférateurs de peroxyosomes (*Peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs)) jouent un rôle limitant dans la synthèse de la prépro-endothéline (Iglarz et al 2003). Le tissu pulmonaire constitue un lieu de production important de l'ET-1 (Dupuis et al 1996, Wagner et al 1992b), ce qui illustre un rôle important de l'ET-1 dans le développement et l'installation de l'hypertension pulmonaire. Quant à l'ET-3, il constitue l'agoniste qui a le plus d'affinité avec son récepteur ET_B et joue un rôle embryologique important par son activation de la migration des cellules de la crête neuronale (Baynash et al 1994, Inoue et al 1989).

Plusieurs modèles animaux d'hypertension artérielle, y compris le modèle DOCA-sel, le modèle d'hypertension induite par l'Ang II, le modèle d'hypertension rénovasculaire de type Goldblatt (1K1C) et le modèle SHR, montrent une augmentation systémique de l'ET-1 (Kassab et al 1997, Schiffrin et al 1995). Une augmentation de la concentration systémique de l'ET-1 induit un remodelage vasculaire hypertrophique au niveau des artérioles de résistance en augmentant ainsi l'ampleur de la résistance périphérique (Intengan & Schiffrin 2000, Li et al 1994). Cette augmentation de la concentration systémique de l'ET-1 semble aussi liée à l'âge et au dysfonctionnement rénal (Hirai et al 2004).

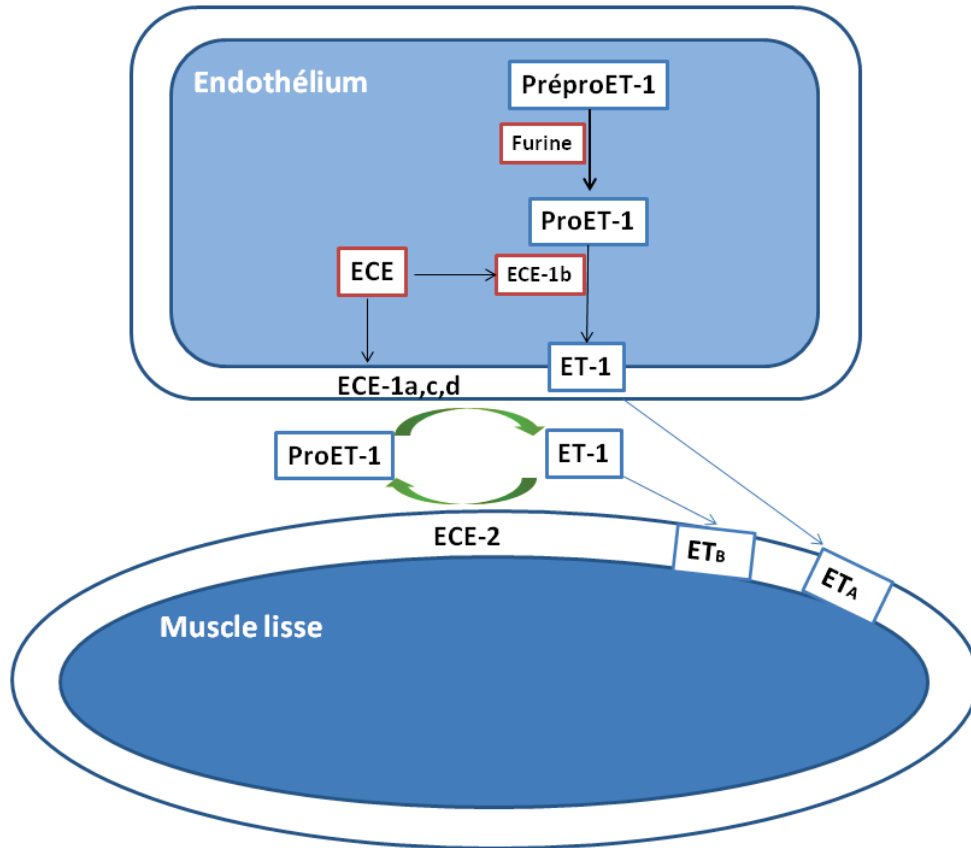


Figure 4: Biosynthèse d'endothéline-1. Source : adapté de Rautureau Y et Schiffrin EL (Rautureau & Schiffrin 2012).

1.3.2.1 Récepteurs de l'endothéline-1

Les récepteurs de l'ET-1 sont des structures protéiques à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G. Les CMLVs sont pourvus de deux types de récepteurs à l'endothéline : ET_A et ET_B (Azuma et al 1995, Davie et al 2002, Russell & Davenport 1995, Sato & Amemiya 1995). Au niveau des artères, les effets vaso-constricteurs sont majoritairement médiés par le récepteur ET_A (Moreland et al 1992). Le sous-type ET_{B2} est exprimé à la surface des CMLVs et induit une vasoconstriction (Arai et al 1990, Cardillo et al

1999, Hynynen & Khalil 2006, Sakurai et al 1990). Le récepteur ET_B est abondamment exprimé dans les cellules endothéliales et joue un rôle important dans les mécanismes moléculaires de la synthèse du NO et d'autres agents vasorelaxants dépendant de l'endothélium tels que la prostacycline (PGI₂) et le facteur endothélial hyperpolarisant (EDHF), selon un mécanisme dépendant d'une augmentation du niveau de calcium intracellulaire (Triggle et al 2012). Une déficience dans l'expression basale du récepteur ET_B de l'ET-1 au niveau pulmonaire contribue à l'installation d'une hypertension pulmonaire (Ivy et al 2001). En effet, la clairance de l'ET-1 est assurée en partie par son récepteur ET_B qui s'internalise après la formation d'un complexe ligand-récepteur et permet la dégradation de l'ET-1 circulant, dont la demi-vie est approximativement une minute (Gasic et al 1992). De plus, le récepteur ET_B stimule aussi la production du NO dans les cellules non endothéliales dans le tube ascendant épais de l'anse de Henle et permet d'avoir des effets natriurétiques suite à son inhibition du flux chlorique et sodique. Le récepteur ET_B de l'ET-1 joue donc un rôle important dans l'homéostasie hydrosodée au niveau des reins et reflète le rôle physiologique de l'endothéline dans la régulation de la pression artérielle selon un mécanisme rénal (Ahn et al 2004, Plato et al 2000).

1.3.2.2 Rôle de l'endothéline-1 dans l'hypertension artérielle pulmonaire

L'hypertension artérielle pulmonaire (HAP) est le résultat d'une augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire et de la pression artérielle (Delcroix & Howard 2015). L'ET-1, synthétisé localement par le tissu vasculaire pulmonaire, joue un rôle incontournable dans la régulation de la pression artérielle au niveau pulmonaire. En effet, l'endothélium pulmonaire

assure la régulation de la pression artérielle pulmonaire par son rôle dans la sécrétion des facteurs vasodilatateurs (NO et prostacycline) et vasoconstricteurs (ET-1). Une augmentation du niveau local d'ET-1 est un facteur important de l'HAP causée essentiellement par une augmentation de la résistance vasculaire au niveau des poumons (Chester & Yacoub 2014). Plusieurs facteurs, entre autres, les cytokines, l'hypoxie, la thrombine et les forces de cisaillement, induisent une augmentation de l'expression de l'ET-1 par les cellules endothéliales. La libération de l'ET-1 dans le milieu interstitiel et son action sur son récepteur ET_A couplé principalement à la protéine Gq α au niveau des CMLVs induit une augmentation du calcium suivie par une activation de plusieurs molécules de signalisation intracellulaire qui sont surtout la PKC, la PI3K/Akt et les MAPKs (Chester & Yacoub 2014). L'activation de ces voies de signalisation est classiquement associée à une augmentation du taux de prolifération des CMLVs et à une stimulation de la synthèse de la MEC. Ces réponses physiopathologiques induites par l'ET-1 constituent le principale responsable de l'installation et du développement de l'HAP.

1.3.2.3 Système endothéline : thérapies et limites

Depuis sa découverte en 1988 par Yanagisawa et collaborateurs (Yanagisawa et al 1988), l'ET-1 a pris une place non négligeable dans l'étiologie de l'hypertension et son rôle dans le développement de l'hypertension pulmonaire est bien établi (Horgan et al 1991, Stelzner et al 1992). De plus, l'ET-1 a un rôle physiopathologique plus ou moins important dans l'étiologie de plusieurs types de maladies y compris la maladie des artères coronaires, le diabète, l'hypertension, la fibrose pulmonaire et surtout un rôle important dans l'établissement

de l'hypertension pulmonaire primaire. Les études précliniques portées sur le rôle du système endothéline dans l'établissement et le développement des maladies cardiovasculaires sont encourageantes et portent un espoir potentiel pour un traitement efficace des complications vasculaires liées à l'hypertension ou pour prévenir le développement de l'hypertension (Schiffrin 1999, Yanagisawa et al 1988). Malgré les effets bénéfiques des antagonistes aux récepteurs de l'ET-1, les données sur les effets à long terme de ces médicaments restent méconnues. En effet, à des concentrations physiologiques, l'ET-1 joue un rôle important dans l'homéostasie hydrosodée rénale, alors qu'un niveau élevé de l'ET-1 induit des effets néfastes sur la fonction rénale par sa rétention du sodium (Rabelink et al 1994) et son rôle stimulateur de la biosynthèse de l'Ang II (Bobik et al 1990). Malgré des recherches prometteuses sur le rôle important de l'endothéline dans les maladies cardiovasculaires, les médicaments à base d'antagonisme des récepteurs de l'endothéline sont autorisés essentiellement dans le cas d'hypertension artérielle pulmonaire. L'antagonisme du récepteur ET_A permet d'améliorer l'état hypertensif chez des sujets humains en induisant une vasodilatation (Cardillo et al 1999). La bosentan (antagoniste mixte) a montré aussi des effets bénéfiques sur l'hypertension pulmonaire et l'hypertrophie du ventricule gauche cardiaque, dans le modèle animal d'hypertension pulmonaire (Eddahibi et al 1995). Cependant, l'antagonisme mixte des récepteurs de l'ET-1 peut ne pas être efficace à normaliser les valeurs de la pression artérielle à long terme, vu le rôle régulateur important du récepteur ET_B au niveau rénal (Goddard et al 2004). Des hypothèses sur le rôle anti-hypertensif important de l'activité du récepteur ET_B ont été avancées dernièrement afin de l'explorer cliniquement. Dans une autre étude faite sur un modèle animal d'hypertension pulmonaire périnatale, un traitement prolongé avec un antagoniste sélectif du récepteur ET_A de l'ET-1, induit une augmentation de la concentration

de l'ET-1 au niveau pulmonaire associée à une hypertension pulmonaire sévère et un remodelage vasculaire local (Ivy et al 2000).

1.4 Mécanismes de signalisation transmembranaire

Les changements des conditions environnantes sont détectables par tout type cellulaire grâce à un ensemble de systèmes de transduction du signal membranaire traitant de l'information provenant du milieu externe (stimuli) (Dostal et al 2014). Chaque signal externe (pression, hormones, odeurs...) déclenche l'activation d'un réseau complexe de voies de signalisation transmembranaires et intracellulaires, ce qui induit des réponses physiologiques et pathologiques variées selon le type et l'intensité du stimulus, ainsi que le contexte cellulaire (Pitulescu & Adams 2014). Les stimuli hydrophiles, appelés premiers messagers, n'arrivent pas à traverser la bicouche lipidique de la membrane plasmique. Pour transmettre leur signal à l'intérieur de la cellule, ces agonistes hydrophiles agissent sur des récepteurs transmembranaires spécifiques, dont les plus connus sont les récepteurs à sept domaines transmembranaires (ex : AT1, ETa, α -ARs). L'activation de ces récepteurs induit une série de réactions transmembranaires initialisées par la dissociation des sous-unités $G\alpha$ et $G\gamma\beta$. Ce processus de signalisation moléculaire est appelé transduction du signal (Furge 2008).

1.4.1 Récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) constituent la famille de récepteurs membranaires la plus abondante. Ils sont caractérisés par une structure à sept domaines transmembranaires en forme d'hélice à trois boucles internes (i1, i2 et i3) et trois boucles externes (e1, e2 et e3) avec une extrémité NH₃-terminale pourvue de plusieurs sites de glycosylation et une extrémité HOOC-terminale (Figure 5). Les boucles intracellulaires i2 et i3 sont les sites d'interaction du RCPG à la protéine G. Des peptides, des hormones, des acides aminés et la lumière constituent, entre autres, des stimuli capables d'activer les RCPGs. Le changement conformationnel du RCPG activé est associé à un changement du positionnement détecté par les boucles intracellulaires (Furge 2008).

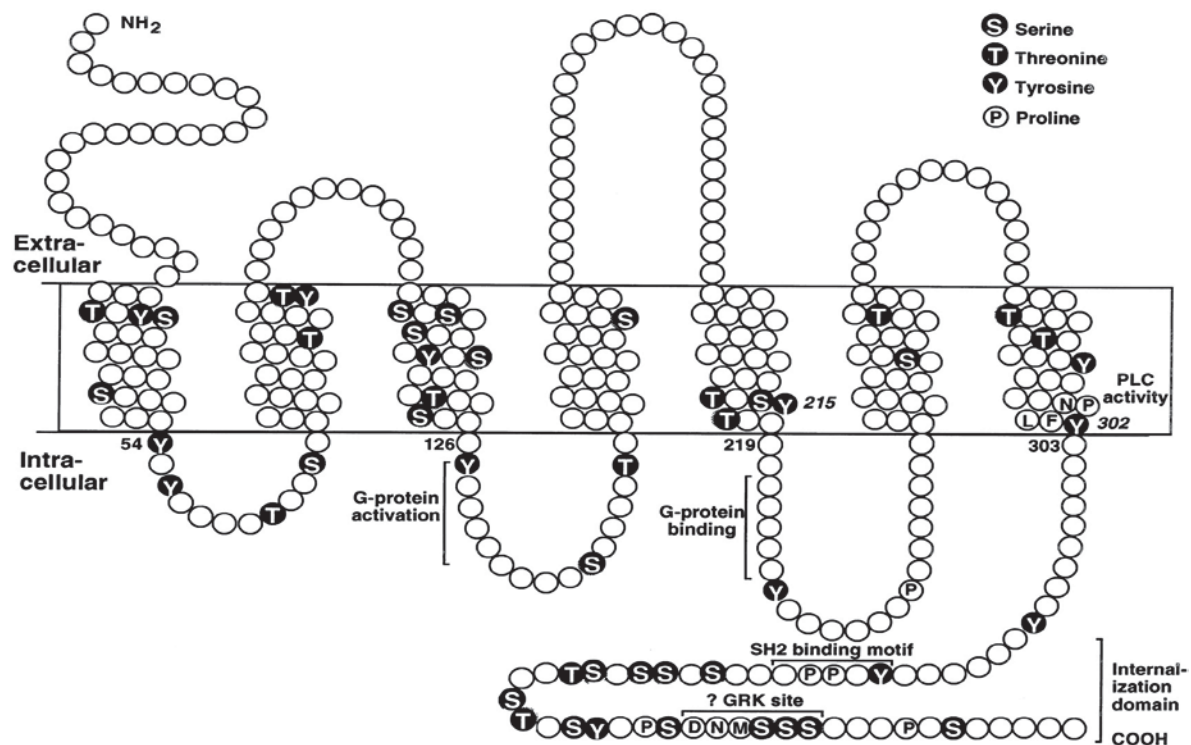


Figure 5. Structure du récepteur couplé à une protéine G. Source : Berk, B. C., et Corson, M. A. (1997). *Circ Res*, 80(5), 607-616.

1.4.2 Protéine G

Il s'agit d'une structure protéique membranaire hétéro-trimérique couplée à des récepteurs transmembranaires tels que les RCPGs. On distingue quatre principales familles de la protéine G : Gi/o, Gq/11, Gs et G12/13 (Kehrl 1998). À son état inactif, la protéine G est composée de trois sous-unités liées entre elles et au RCPG par le domaine N-terminal de la sous-unité α et le domaine C-terminal de la sous-unité γ . La sous-unité alpha est pourvue d'une activité GTPasique régulée par l'hydrolyse d'un GTP en GDP (Neer 1995, Offermanns & Simon 1996). L'activation de cette protéine G transfère le signal à l'intérieur de la cellule, selon un mécanisme, qu'on nomme la transduction du signal, qui consiste à une série d'activation de complexes protéiques (ex : AC, PLC) (Birnbaumer 1992, Neer 1995, Simon et al 1991). L'activation de ces complexes protéiques déclenche une cascade de seconds messagers qui transmettent le signal à des cibles membranaires et intracellulaires comme l'AC, les canaux ioniques et le RE (Meij 1996). À côté de ces protéines G classiques, on distingue aussi des petites protéines G (petites GTPases) à structure monomérique telles que Ras et Raf.

1.4.3 Système adénylate cyclase

1.4.3.1 Système adénylate cyclase et adénosine monophosphate cyclique

L'adénylate cyclase est une enzyme ubiquitaire formée de deux sous-unités transmembranaires. Son activité est régulée par deux types de protéines G : les protéines G inhibitrices (Gi) et les protéines G stimulatrices (Gs). En cas de stimulation, l'AC permet la formation d'une molécule d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) à partir d'une

molécule d'ATP. L'AMPc permet l'activation de plusieurs protéines effectrices en aval, telles que la protéine kinase A (PKA) (figure 2). Cette protéine tétramérique est pourvue de sites de liaisons de l'AMPc sur ces deux sous-unités régulatrices. La liaison de l'AMPc au tétramère PKA permet la libération de sous-unités catalytiques et la phosphorylation des résidus sérine/thréonine de plusieurs cibles intracellulaires (Furge 2008). Après son activation, la PKA induit un effet vasodilatateur suite à une phosphorylation des chaînes légères de myosine au niveau des CMLVs (Lodish 2004). L'AMPc a la capacité de réguler son activité, en activant des phosphodiésterases qui permettent sa propre dégradation (Furge 2008). Autre son rôle primordial dans la régulation du tonus vasculaire, l'AMPc constitue aussi une molécule de signalisation impliquée dans la régulation de la prolifération des CMLVs (Gusan & Anand-Srivastava 2013). L'effet antiprolifératif de l'AMPc semble être lié à l'inhibition de la voie de signalisation EGFR-MAPK, déclenchée classiquement par des agonistes comme l'EGF ou par une transactivation induite par des peptides vasoactifs, dont les récepteurs sont couplés à une protéine Gi (Li & Anand-Srivastava 2002, Wu et al 1993), inhibant ainsi des facteurs de transcription impliqués dans la prolifération cellulaire comme c-Myc. Des agonistes vasoactifs comme l'Ang II et l'ET-1 inhibent l'activité de l'AC après la dissociation de la sous-unité alpha du récepteur couplé à une protéine Gi (les récepteurs AT1 et ET_A) (figure 2). De ce fait, une augmentation de l'activité du SRAA et/ou du système endothéline, remarquée dans plusieurs types d'hypertension artérielle, est associée à une déficience dans la biosynthèse de l'AMPc au niveau vasculaire. En effet, l'activité basale de l'AC se trouve diminuée et associée à une diminution de la sensibilité aux agonistes activateurs de cette enzyme au niveau cardiaque et vasculaire (aorte) dans le modèle animal SHR (Anand-Srivastava 1988). De plus, une altération de l'expression protéique de la protéine G dans le modèle animal d'hypertension

sel-DOCA est associée à une diminution de la sensibilité de l'AC (Anand-Srivastava et al 1993, Anand-Srivastava et al 1991). Le modèle animal L-NAME, caractérisé par une diminution pathologique de la biodisponibilité du NO, montre aussi une altération dans le niveau d'expression de la protéine Gi (Di Fusco & Anand-Srivastava 2000).

1.4.3.2 Protéine Gi α

Les protéines G inhibitrices forment un groupe de cinq membres : Gi α 1, Gi α 2; Gi α 3, Go α A et Go α B (Kehrl 1998). Ces complexes protéiques multimériques sont caractérisés par une sensibilité à la toxine pertussique (PTX) (Kehrl 1998, Li & Anand-Srivastava 2002). Une activation d'une protéine Gi induit une inhibition de l'AC et une diminution subséquente dans la concentration intracellulaire de l'AMPc (Gilman 1995) (figure 2). Plusieurs études suggèrent un rôle important de la protéine Gi dans le développement et l'établissement de l'hypertension artérielle dans plusieurs modèles animaux (Anand-Srivastava 2010, Anand-Srivastava et al 1993, Hashim & Anand-Srivastava 2004, Li & Anand-Srivastava 2002). En effet, une diminution de la biodisponibilité de l'AMPc est associée à une hyperprolifération des CMLVs (Anand-Srivastava 2010, Gusan & Anand-Srivastava 2013) et un dysfonctionnement endothélial (Shah & Singh 2006).

1.4.4 Système de phosphoinositides

Les phosphoinositides sont des molécules membranaires qui jouent un rôle structural et signalétique important (Hokin & Hokin 1953, Hokin & Hokin 1989) et permettent de moduler plusieurs processus biologiques (Rebecchi & Pentylala 2000, Schnabel et al 1996). La

phospholipase C (PLC), dont l'activité est contrôlée principalement par la protéine G et par d'autres composantes membranaires interactives (Drin & Scarlata 2007, Feng et al 2005, Zhou et al 2008, Zhou et al 2005), constitue un effecteur dont le substrat est le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP₂). Ce dernier, donne naissance à deux seconds messagers : l'IP₃ et le DAG, et permet de jouer un rôle incontestable dans la dynamique du calcium (figure 2). Quant au diacylglycérol (DAG), il active préférentiellement les PKC nouvelles (nPKCs) et contribue aussi, avec le calcium, à l'activation des PKC conventionnelles (cPKCs). La translocation différentielle de certaines isoformes de la PKC telles que l'isoforme alpha, epsilon et gamma, semble être dépendante de la voie de signalisation Gq-PLC dans le cas de l'hypertrophie cardiaque (Jalili et al 1999). Les PLC β constituent des effecteurs de préférence dans la voie de signalisation liée à la protéine Gq α (Ross 2011, Taylor et al 1991). Plusieurs récepteurs membranaires couplés à une protéine Gq α tels que le récepteur AT1 de l'Ang II activent préférentiellement la PLC β 1 (Schelling et al 1997). Cette activation induit une augmentation rapide du calcium cytosolique, suivie par une activation calcium-dépendante de la PLC-gamma. Cette isoforme de la PLC joue un rôle crucial dans le contrôle de dynamiques du calcium par son interaction directe avec les canaux ioniques de type TRPC3 (Patterson et al 2005).

1.4.4.1 Protéine Gq/G11 α

Les protéines G de la famille Gq α sont des structures protéiques multimériques caractérisées par leur insensibilité à la toxine pertussique (Exton 1996, Rhee 2001, Strathmann & Simon 1990). On distingue quatre membres : Gq α , G11 α , G α 14 et G α 15/16 (Gilman 1987, Simon et al 1991). Ces protéines ont toutes la capacité d'activer la phospholipase C β . Les

protéines Gq α et G11 α partagent une homologie de structure d'approximativement 88% et sont exprimées d'une manière ubiquitaire (Exton 1996, Rhee 2001, Strathmann & Simon 1990). Ces protéines G ont les mêmes capacités d'activer les différentes isoformes de la phospholipase C (Wettschureck & Offermanns 2005), surtout les isoformes β 1, β 3 et β 4. Les protéines G11 α et Gq α jouent un rôle important dans le développement du système nerveux et cardiaque, dans la coordination motrice (Offermanns et al 1997, Offermanns et al 1998) ainsi que dans d'autres processus biologiques extrêmement variés (Chagin et al 2014, Gangadharan et al 2013, Imamura et al 1999, Ogata et al 2011, Sawaki et al 1993, Tappe-Theodor et al 2012, Wilkie et al 1991). Des études d'inactivations de gènes (souris Knock-out) ont révélé un rôle beaucoup plus important de la protéine Gq α par rapport à la protéine G11 α (Offermanns et al 1998). Des souris invalidées pour le gène codant pour la protéine Gq α (GNAQ) montrent une ataxie (anomalies typiques dans la coordination neuromusculaire) et une discoordination motrice (Offermanns et al 1998), alors que les souris transgéniques invalides pour le gène de la protéine G11 α ne montrent pas d'anomalies comportementales ou morphologiques (Offermanns et al 1998). Le double KO de GNAQ et GNA11 (gène codant pour la protéine G11) avait un effet létal au cours du stade embryonnaire suite à une hypoplasie des cardiomyocytes (Offermanns et al 1998). Les protéines Gq α et G11 α se comportent donc selon un mécanisme complémentaire et synergique pour effectuer des rôles extrêmement importants dans le processus d'organogenèse. Après la naissance, les protéines G11/q α jouent un rôle primordial dans la croissance cardiaque et l'hypertrophie cardiaque pathologique. Une inhibition de l'expression des protéines Gq/11, spécifiquement au niveau des cardiomyocytes, ne permet pas le développement de l'hypertrophie cardiaque pathologique suite à une surcharge de pression (Wettschureck et al 2001).

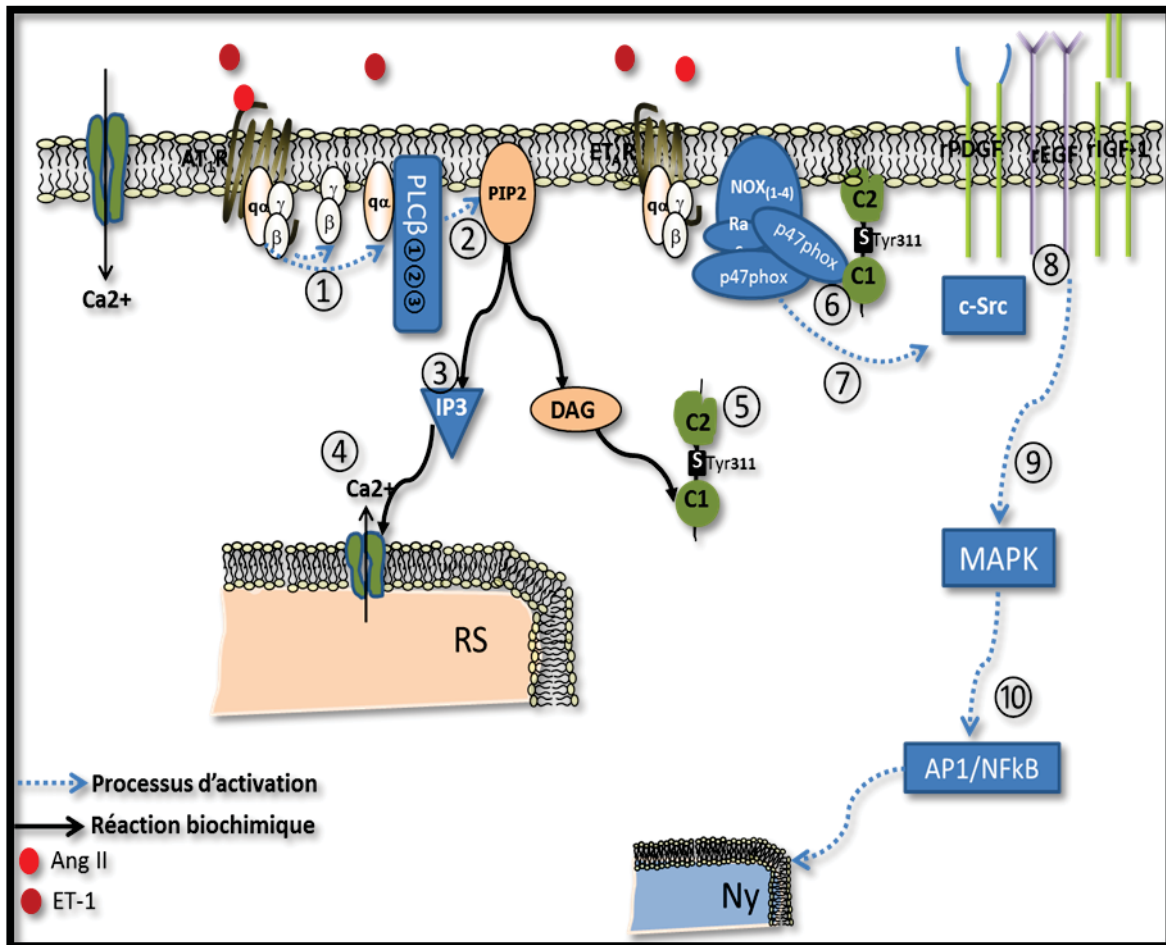


Figure 6 : Mécanisme intracellulaire de la voie de signalisation Gqα dans la CMLV.

1. La signalisation liée à la protéine Gqα est déclenchée suite à une association d'un agoniste, tel que l'Ang II, avec son récepteur couplé à une protéine Gqα. Cette activation mène à une dissociation des sous-unités Gqα et Gβγ après hydrolyse de GTP en GDP. 2. La sous-unité Gqα active des PLCβ suivie par une hydrolyse de la PI2P au niveau de la membrane plasmique. 3. Production de deux molécules de signalisation transmembranaire (DAG et IP3). 4. L'action de l'IP3 sur son récepteur au niveau du réticulum endoplasmique active la libération du calcium dans le cytoplasme. 5. L'activation de la PKCδ, associée à une hyperphosphorylation du résidu Tyr³¹¹, par le DAG. 6. L'assemblage des sous-unités cytoplasmiques et membranaires de la NADPH, après translocation de la sous-unité p47phox à la membrane plasmique induite par des seconds messagers comme la PKCδ. 7. L'activation de la molécule c-Src par une augmentation des EROs produites essentiellement par la NADPH oxydase. 8. La transactivation des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs). 9. L'activation des MAPKs. 10. L'activation des facteurs de transcriptions (AP1/NFκB) suivie par une translocation vers le noyau et une induction de l'expression génique.

La membrane cellulaire des CMLVs renferme plusieurs types de récepteurs membranaires couplés à une protéine Gq α et/ou G11 α permettant ainsi une amplification du signal lié à cette voie de signalisation. La protéine Gq α a un effet régulateur sur certains types de canaux ioniques. Au niveau neuronal, elle inhibe les canaux potassiques type M après son activation par le récepteur M1 de l'acétylcholine (Haley et al 1998, Haley et al 2000), alors que l'effet inhibiteur de la bradykinine sur ces mêmes types de canaux est surtout médié par Gq/11 α (Jones et al 1995, Wilk-Blaszczak et al 1994). Dans certains cas, les protéines Gq α /G11 α peuvent activer sélectivement certains mécanismes de signalisation. En effet, les récepteurs α 1-adrénrgiques au niveau des CMLVs de la veine porte sont couplés à une protéine Gq α qui, une fois activée, induit une augmentation de l'IP3, alors que l'activation de la G11 α est associée à une augmentation du calcium (Macrez-Lepretre et al 1997). Malgré la redondance fonctionnelle de membres de la famille de Gq α concernant l'activation de la voie PLC β /Ca²⁺/PKC, des récepteurs membranaires couplés à une protéine Gq/11 α sont capables d'activer la voie de signalisation de MAPKs indépendamment de l'inositol (Berts et al 1999, Peavy et al 2001). D'autre part, la protéine Gq α est connue aussi par sa régulation du facteur nucléaire de la cellule T activée (NFAT : *nuclear factor of activated T cells*), qui joue un rôle important dans l'expression génique de COX-2 (Robida et al 2000) et dans la réponse prohypertrophique des cardiomyocytes (Liu et al 2012, Molkenin 2004). À l'instar de la protéine G14 α , Gq α est potentiellement impliquée dans la modulation de l'expression de plusieurs gènes d'apoptose (Peavy et al 2005).

1.4.4.2 Phospholipase C- β

Les phospholipases C sont des enzymes d'hydrolyse de liaisons esters des phospholipides. On distingue 13 isoformes de la PLC regroupés en six familles: PLC β , γ , δ , ϵ , ζ et η (Bunney & Katan 2006, Patterson et al 2005, Swann et al 2006, Zhou et al 2008, Zhou et al 2005). Le poids moléculaire des PLCs varie généralement entre 85 et 150 kDa (Rebecchi & Pentylala 2000). Plusieurs isoformes de la PLC sont présents dans les CMLVs, y compris les isoformes β 1, β 2, β 3, β 4, γ 1 et δ 1 (Marrero et al 1994, Schelling et al 1997, Ushio-Fukai et al 1998b). Les PLCs se dotent d'une structure de base formée de domaines catalytiques X/Y conservés, de motifs en mains EF pourvus de sites de liaison du calcium, d'un domaine PH situé à proximité de la partie N-terminale formant des liaisons phospholipides avec la membrane et d'un domaine C2 proche de la région d'extension C-terminale (Suh et al 2008). En plus de cette structure de base, les PLC β se caractérisent par la présence d'un domaine C-terminal qui joue le rôle d'ancrage dans la membrane plasmique, permettant l'interaction avec les protéines de la famille Gq α et joue aussi un rôle dans la localisation nucléaire (Faenza et al 2008, Rebecchi & Pentylala 2000)(figure 7).

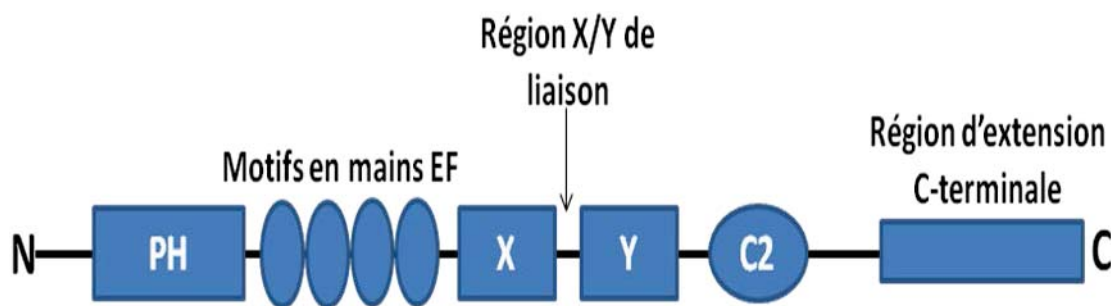


Figure 7 : Structure simplifiée de la phospholipase C β . PH : Pleckstrin homology. Adaptée de Drin G et Scarlata *Cell Signal*. 2007 Jul;19(7):1383-92.

Les isoformes de la PLC β se distinguent principalement par leur rôle incontournable dans la régulation de la dynamique calcique (Ocharan et al 2005). Il existe quatre isoformes de la PLC β (β 1- β 4) activés à la fois par la sous-unité Gq α et G $\beta\gamma$ (Rhee 2001). Lors du déclenchement de la voie de signalisation Gq-PLC, les PLC β activées par Gq et/ou G11 hydrolysent le phosphatidylinositol diphosphate (PI(4,5) P2) et produisent deux seconds messagers intracellulaires, l'inositol 1, 4,5-triphosphates (IP3) et le diacylglycérol (DAG) (Figure 6). L'IP3 active son récepteur au niveau de la membrane endoplasmique, permettant ainsi la libération du calcium dans le cytosol, selon son gradient de concentration. Quant au DAG, il reste piégé dans la membrane plasmique et induit une libération de l'acide arachidonique (AA), un précurseur des eicosanoïdes. D'autre part, DAG active des kinases de type sérine-thréonine, les protéines kinases de type C (PKC). Outre le contrôle du tonus vasculaire, les PLCs sont aussi impliquées dans le processus du remodelage vasculaire (Berridge 1987, Berridge 2005). En effet, la PLC constitue un passage incontournable de plusieurs voies de signalisation activées par des agonistes pro-migratoires et pro-prolifératifs (Chung et al 2009, Homma et al 1993).

1.4.4.3 Mécanisme d'entrée du calcium et voie de signalisation des phosphoinositides

La concentration du calcium intracellulaire constitue le principal régulateur de la contraction musculaire. L'activation des récepteurs membranaires couplés à une protéine Gq α (GqPCRs) est associée à une augmentation rapide du calcium intracellulaire suite à l'activation du système PI-PLC. La mobilisation du calcium intracellulaire à partir des réserves internes est suivie par une entrée du calcium extracellulaire à travers, essentiellement, les canaux calciques dépendant du voltage (Parekh & Penner 1997, Parekh & Putney 2005,

Putney et al 2001, Venkatachalam et al 2002). Dans le cas physiologique, les canaux calciques types L (Cav1.2) sont les principaux régulateurs de l'entrée du calcium à partir du milieu extracellulaire suite à un changement du potentiel de membrane (initiation électromécanique). Les canaux TRPCs (transient receptor potential cation channels), activés essentiellement par le système PI-PLC, sont considérés comme des régulateurs importants des mécanismes d'entrée du calcium extracellulaire dans plusieurs types cellulaires, y compris les CMLVs (Parekh & Putney 2005, Wang et al 2008). Ces canaux répondent premièrement à une activation des récepteurs membranaires couplés à la PLC (initiation pharmacomécanique) (Venkatachalam et al 2003). L'activité des TRPCs est modulée par le récepteur de l'IP3 et le stock du calcium (Wang et al 2008), et jouent un rôle important dans le processus de signalisation du calcium à long terme et dans les mécanismes de réapprovisionnement du RE en calcium (Putney et al 2001, Venkatachalam et al 2002).

1.4.5 Protéine Kinase C (PKC)

Les protéines kinases C (PKC) constituent une famille de sérine/thréonine kinases d'au moins 12 isozymes, dont la subdivision se base sur la structure et le type du cofacteur d'activation (Budhiraja & Singh 2008). La structure de base d'une PKC consiste à une chaîne polypeptidique pourvue d'une région régulatrice N-terminale et d'une région catalytique C-terminale. Le domaine régulateur C1 de certaines PKCs est caractérisé par sa sensibilité au DAG et aux phorbol esters alors que le domaine C2 forme une région structurale sensible au calcium (Ca^{2+}) (Salamanca & Khalil 2005). Le domaine auto-inhibiteur (C3) joue un rôle important dans l'inhibition du domaine catalytique par sa liaison avec le site de liaison des substrats (C4) en cas d'absence d'activateurs ou cofacteurs. Les PKCs nouvelles (nPKCs) (δ , ϵ ,

η , θ) sont activées par le DAG, alors que les PKCs conventionnelles ou classiques (α , $\beta 1$, $\beta 2$, γ) sont activées essentiellement par deux cofacteurs, le DAG et le Ca^{2+} . Les PKCs atypiques (aPKCs (ν , μ , $1/\lambda$, ζ)) se caractérisent par leur insensibilité au DAG et au Ca^{2+} , et elles sont activées par la phosphatidylsérine (Budhiraja & Singh 2008, Salamanca & Khalil 2005).

L'activation de la PKC se traduit par sa translocation du cytosol aux membranes cellulaires associée à un changement conformationnel de sa structure. Parmi les réponses cellulaires diverses de ces tyrosines kinases, on nomme surtout la contraction, la migration, la croissance cellulaire, l'apoptose, la prolifération, l'hypertrophie et la perméabilité membranaire. En plus des mécanismes d'activation caractéristiques à chaque classe, les différents isotypes de la protéine kinase C sont exprimés d'une manière hétérogène selon le type cellulaire et la localisation subcellulaire (Newton 1997). La PKC α , la PKC δ et la PKC γ sont les isoformes les plus abondantes dans les CMLVs en culture et constituent des acteurs importants dans la régulation de la croissance et du cycle cellulaire (Ohanian et al 1996).

1.4.5.1 PKCs nouvelles

La famille des nouvelles PKCs (nPKCs) est classiquement connue par son activation dépendante du DAG et par son insensibilité au calcium. L'activation maximale par le DAG est assurée par un domaine catalytique qui constitue un substrat pour les phorbol esters/DAG (Goel et al 2007). La PKC δ constitue l'isoforme de nPKCs le plus abondant au niveau vasculaire. Depuis la découverte de la PKC en 1977, plusieurs études ont associé un rôle important de la PKC δ dans le processus d'apoptose (rôle pro-apoptotique) et la migration cellulaire (Humphries et al 2006, Touyz et al 2003b). Au niveau des CMLVs, l'inhibition de l'activité de la PKC δ a été associée à une inhibition de différentes étapes clés du processus

d'apoptose y compris l'inhibition de l'activation de la caspase, de la fragmentation de l'ADN et de la perte du potentiel membranaire mitochondrial (Matassa et al 2001, Reyland et al 1999). Communément avec son rôle dans l'apoptose, la PKC δ joue un rôle axial dans la prolifération et la survie cellulaire. Ces mécanismes moléculaires induits par la PKC δ reflètent son rôle important dans l'équilibre physiologique entre l'apoptose et la croissance cellulaire (Leitges et al 2001).

La PKC δ constitue un point de convergence de plusieurs voies de signalisations activées par plusieurs hormones vasoactives comme l'Ang II (Olson et al 2008), l'ET-1 (Barman & Marrero 2005) et la thrombine (Hsieh et al 2008). La translocation et l'activation des PKCs permettent une transactivation des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) (Hsieh et al 2008), une activation des MAPKs (Hsieh et al 2008) et une régulation de la contraction des CMLVs. Les études portées sur les mécanismes d'activation de la PKC δ ont révélé une importance majeure de certains sites de phosphorylation dans le processus d'activation de ces sérine-thréonine kinases comme le site de phosphorylation tyrosine (Tyr)-311 de la PKC δ . La phosphorylation de la PKC δ en Tyr³¹¹ constitue une étape importante dans l'hypertrophie des CMLVs induite par l'Ang II (Nakashima et al 2008).

1.4.5.2 PKCs conventionnelles

La famille des PKCs conventionnelles (cPKCs) se caractérise par son activation dépendante du DAG et du calcium. La PKC α constitue l'isoforme des cPKCs le plus abondant dans les CMLVs. Elle est connue par son rôle critique dans la régulation de la prolifération dans plusieurs types cellulaires y compris les CMLVs (Leszczynski et al 1996). La cartographie des sites phosphorylés de la PKC α indiquent trois sites de phosphorylation, un

site Tyr-497 dans la boucle d'activation ainsi que deux autres sites dans la région carboxy-terminale (Tyr638 équivalent de Tyr-641 de la PKC β II et S657) (Giorgione et al 2003). Lors de la phase initiale d'activation de la PKC α , les sites Tyr497 et Tyr657 sont phosphorylés ce qui permet la stabilisation de la configuration structurale de la forme active (Gallegos & Newton 2008, Newton 2001). La région appelée boucle d'activation joue un rôle extrêmement important dans le processus du gain fonctionnel après la phosphorylation de leur sites tyrosine kinase (Gallegos & Newton 2008). L'activité d'une protéine kinase C est régulée par des interactions entre le domaine catalytique et le domaine régulateur (Newton 2001).

1.4.6 Récepteurs des facteurs de croissance

Les récepteurs des facteurs de croissance sont des structures membranaires monomériques ou dimériques à activité tyrosine kinase (RTKs). La structure de base des RTKs consiste en un domaine N-terminal extracellulaire renfermant la région de liaison au ligand, un domaine C-terminal intracellulaire responsable de l'activité tyrosine kinase et un domaine intermédiaire formé d'une hélice transmembranaire. Les RTKs permettent le transfert d'un groupe phosphate de l'ATP vers le résidu tyrosine d'une protéine. L'activation de ces récepteurs se traduit par une auto-dimérisation suivie par une autophosphorylation des résidus tyrosine. Ceci permet une activation spécifique de certaines enzymes et protéines adaptatrices au domaine SH2 telle que la molécule Src (Alberts et al 2004). Les RTKs sont impliqués dans la régulation de plusieurs processus biologiques tels que la croissance, la différenciation, la motilité et l'apoptose. Une augmentation dans l'expression et/ou l'activité des RTKs est la cause de plusieurs cas pathologiques, y compris les maladies cancéreuses et cardiovasculaires.

1.4.6.1 Récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR)

L'EGFR ou l'ErB1 fait partie de la famille des récepteurs ErB1 à activité tyrosine kinase (RTK) (Prigent & Lemoine 1992). Les ligands endogènes de ce récepteur membranaire constituent une famille appelée facteurs de croissance épidermique (EGF) (Cohen 2008). Cette famille comprend l'EGF, le TGF- α et l'HB-EGF. L'activation d'EGFR est impliquée dans plusieurs processus biologiques essentiels tels que la prolifération, la croissance et la survie cellulaire. L'inactivation du gène de l'EGFR au niveau des CMLVs favorise la mort cellulaire spontanée, diminue la sensibilité d'ERK1/2 à l'effet stimulateur des RCPGs activés et du stress oxydatif et joue un rôle important dans l'homéostasie basale des CMLVs (Schreier et al 2011). L'activation de l'EGFR constitue aussi une étape essentielle dans le processus de vasoconstriction (Griol-Charhbili et al 2011) et du remodelage vasculaire (Takayanagi et al 2015).

Il est maintenant évident que l'activation de plusieurs types de RCPGs aboutit à une activation de p42/44MAPKs et à une induction de c-fos (Luttrell et al 1999). Cette voie de signalisation est classiquement impliquée dans la régulation du taux de synthèse protéique (Eguchi et al 1998). L'activation du récepteur AT1 couplé à une protéine Gq α dans les CMLVs est associée à une transactivation de l'EGFR dépendante du Ca²⁺, suivie par le recrutement des complexes protéiques Grb2/Shc/Sos et l'activation des ras/MAPK (Birukov 2009, Daub et al 1996, van Biesen et al 1995). Les mécanismes moléculaires qui relatent les RCPGs et l'EGFR étaient un sujet de recherche intense au cours des dernières décennies, et plusieurs recherches confirment le rôle physiopathologique important de l'axe RCPG-EGFR dans les mécanismes moléculaires de la croissance et de la prolifération cellulaire dans

différents types cellulaires, y compris les CMLVs. D'autres recherches ont rapporté que cette même transactivation de l'EGFR est aussi impliquée dans la phosphorylation de N70 S6 kinase selon une voie dépendante de la PI3K-Akt (Eguchi et al 1999) et de p42/44MAPKs (Iwasaki et al 1999), ce qui induit une augmentation du taux de prolifération et du taux de synthèse protéique (Bahrami et al 2014).

1.4.6.2 Récepteur du facteur de croissance insulinomimétique (IGF-1R)

L'IGF-1R est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase, formé de deux hétérodimères α/β présents abondamment dans les CMLVs par rapport à son homologue IRs (récepteur à l'insuline) (Arnqvist et al 1995). On assiste aussi à la présence des récepteurs formés des hétérodimères IGF-1R α/β et IR α/β dans les CMLVs (Baillyes et al 1997, Johansson & Arnqvist 2006). Une concentration supra-physiologique de l'insuline induit des effets biologiques importants dans les CMLVs, surtout par son activation du récepteur IGF-1R (Johansson & Arnqvist 2006). En plus d'une activation directe par son ligand, l'IGF-1R est aussi ciblé par le phénomène de transactivation, qui reflète une activation indirecte par une autre voie de signalisation initialisée par d'autres types de récepteurs comme le récepteur AT1 (Zahradka et al 2009). Cette transactivation est assurée par des seconds messagers comme le Ca^{2+} (Tu et al 2010), les EROs (Touyz et al 2003a) et la molécule c-Src (Oligny-Longpre et al 2012). De ce fait, l'IGF-1R constitue un médiateur important du remodelage vasculaire. Dans le même contexte, le stress mécanique induit une hausse dans le taux d'expression du facteur de transcription Egr-1 (early growth response), dont le rôle dans le processus d'activation de l'IGF1-R a été rapporté (Wu et al 2010). Ceci explique au moins partiellement l'implication

potentielle de l'IGF1-R dans la formation de la néointima (Wu et al 2010). Dans le même contexte, les forces d'étirement mécaniques induisent une augmentation du taux d'expression protéique et le taux d'ARNm de l'IGF-1R, ce qui suggère un rôle important de l'IGF-1R dans les mécanismes moléculaires du remodelage vasculaire (Song et al 2007).

1.4.6.3 Récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR)

Le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR) est une structure membranaire hétérodimérique de nature glycoprotéique composée de deux chaînes α et β dont la partie extracellulaire est pourvue de domaines Ig (Ig like domains). On distingue deux types de récepteurs du PDGF : le PDGFR α et le PDGFR β (Andrae et al 2008). Des agonistes tels que le PDGF-A, le PDGF-B et le PDGF-C sont capables d'activer le PDGFR α , alors que le PDGF-R β est surtout activé par le PDGF-AB et le PDGF-BB (Andrae et al 2008, Shaw & Xu 2003). Une activation du PDGFR induit une réponse pro-proliférative dans plusieurs types cellulaires y compris les CMLVs (Kohler & Lipton 1974, Ross et al 1974). Le PDGFR constitue un acteur important du remodelage vasculaire. En effet, à l'instar des autres récepteurs de facteurs de croissance, la transactivation du PDGFR est impliquée dans les mécanismes moléculaires du remodelage vasculaire induit par plusieurs facteurs qui sont entre autres la force du cisaillement (Ma et al 1999), l'Ang II (Higuchi et al 2007, Touyz 2005) et l'ET-1 (Gomez Sandoval & Anand-Srivastava 2011). L'activation ou la transactivation du PDGFR induit le remodelage vasculaire via la voie de signalisation d'ERK1/2 et d'Akt (Andrae et al 2008). L'activation du PDGFR permet aussi la transactivation de l'EGFR selon un mécanisme dépendant d'ADAM17 (Mendelson et al 2010).

1.4.7 Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)

La phosphoinositide 3-kinase (PI3K) est un second messager pour plusieurs facteurs de croissance à activité tyrosine kinase. Elle permet la régulation des fonctions vitales de l'organisme telles que la survie cellulaire, le métabolisme de la cellule et le réarrangement du cytosquelette. La PI3K permet l'hydrolyse des phosphoinositides en phosphatidylinositol 3,4,5 phosphate. La classe I_A PI3Ks est activée par des RTKs et des RCPGs. La classe I_B PI3K (p110 γ /p101) est aussi activée par certains RCPGs par le biais de l'hétérodimère G $\beta\gamma$. L'Akt constitue un effecteur de la PI3K impliquée dans des maladies comme le diabète, l'hypertension et le cancer (Cantley 2002, Vanhaesebroeck et al 2010). La voie de signalisation des PI3Ks est activée par la protéine Gq/11 couplée à plusieurs types de récepteurs membranaires (Graness et al 1998, Hu et al 1996).

Le récepteur α 1-AR couplé à une protéine Gq α induit son effet pro-prolifératif sur les CMLVs selon une voie dépendante des PI3Ks et des MAPKs (Hu et al 1996). Des récepteurs à la thrombine couplés à une protéine Gq n'activent pas la PI3-kinase mais peuvent moduler d'autres voies de signalisation en impliquant la PI3-kinase (Batty & Downes 1996). L'ET-1 joue le rôle du modulateur de la voie de signalisation liée à l'insuline dans les CMLVs, selon une voie de signalisation dépendante de PI3K (Jiang et al 1999). La PI3K joue aussi son rôle dans la réponse hypertrophique induite par l'Ang II (Saward & Zahradka 1997) et constitue aussi un point d'interférence entre la voie de signalisation initialisée par le récepteur AT1 et l'insuline, ce qui reflète en quelque sorte un des mécanismes moléculaires d'association entre diabète, hypertension et maladies cardiovasculaires (Folli et al 1997, Velloso et al 1996).

1.4.8 Signalisation MAP kinase

Les protéines kinases activées par un mitogène (*Mitogen Activated protein kinases* MAPKs) sont des enzymes ubiquitaires hautement conservées (Lewis et al 1998). La signalisation MAP kinase constitue une voie de signalisation intracellulaire impliquée dans plusieurs réponses physiologiques et pathologiques par son rôle incontournable dans, entre autres, la croissance, la prolifération et la survie cellulaire. Plusieurs cas de signalisation allostérique initialisée par la protéine Gq α empruntent la voie de signalisation des MAPKs (Goupil et al 2014). Les récepteurs membranaires à tyrosine kinase sont classiquement impliqués dans l'activation des MAPKs de type ERK1/2 suite à des événements précoces déclenchés surtout par l'activation des RCPG par des agonistes vasoactifs tels que l'Ang II, l'ET-1, la NA et la thrombine ou par une activation directe par des facteurs de croissance. La transduction du signal transmembranaire et intracellulaire entre les RCPGs et les MAPKs constitue un processus signalétique extrêmement complexe impliquant une variété des molécules intermédiaires selon parfois le contexte cellulaire (Caunt et al 2006, Goldsmith & Dhanasekaran 2007).

L'activation des MAPKs constitue une étape importante du remodelage vasculaire. En effet, le processus de dédifférenciation des CMLVs vers un profil sécrétoire implique, au moins partiellement, les MAPKs (Yoshiyama et al 2014). Ces protéines kinases jouent aussi un rôle important dans la phosphorylation des molécules impliquées dans le processus d'athérosclérose comme la connexine 43 (CX43) qui s'interagit avec la cycline E et favorise ainsi la prolifération des CMLVs (Johnstone et al 2012). Des conditions pathologiques comme une hyperglycémie, une résistance à l'insuline ou une hypertension constituent des facteurs

établis du remodelage vasculaire dont les mécanismes moléculaires impliquent des voies de signalisation liées à des MAPKs (Doronzo et al 2011). Dans un autre contexte, les réponses pro-inflammatoires et profibrotiques des CMLVs induites par des substances actives dérivées des adipocytes impliquent aussi des MAPKs (Nguyen Dinh Cat et al 2011).

1.4.9 Stress oxydant

Les réactions chimiques d'oxydoréduction, telles que le processus de respiration aérobie, produisent plusieurs types de molécules hautement réactives appelées espèces réactives oxygénées (ERO) (Fridovich 1999). Ces EROs jouent un rôle physiologique inévitable dans les mécanismes de transduction du signal (Banfi et al 2001, Touyz & Schiffrin 2004). Le stress oxydant est le résultat d'un déséquilibre entre la production et l'élimination des EROs suite à une surproduction et/ou élimination inefficace de ces molécules hautement réactives. Un excès dans l'activité de la signalisation redox joue un rôle important dans l'établissement et le développement de l'hypertension artérielle et des maladies cardiovasculaires (Montezano & Touyz 2014, Touyz 2004, Touyz & Schiffrin 2004). La respiration aérobie constitue la première source endogène de production des EROs identifiée. La NADPH oxydase (NOX), qui fut découverte pour la première fois dans les phagocytes, constitue la source majeure du stress oxydant au niveau vasculaire (Schiffrin & Touyz 2003, Wilkinson-Berka et al 2014). Elle est formée de plusieurs sous-unités fonctionnelles membranaires (p22phox et gp91phox) et cytoplasmiques (p47phox, p67phox, p40phox et Rac) (Griendling et al 2000, Vignais 2002) (figure 8), dont la composition, la distribution tissulaire et le mode d'activation peuvent être différents selon le type d'isoforme. La NOX2 constitue un

prototype des NADPH oxydases formé de plusieurs sous-unités cytosoliques (p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox}), des petites protéines G (Rac1/2 et Rap1A) et d'une protéine membranaire (cytochrome b558). Quant à la NOX4, elle est exprimée dans plusieurs types cellulaires y compris les CMLVs (Hilenski et al 2004, Lyle et al 2009) et les CEs (Ago et al 2004). La NOX4 forme un complexe protéique fonctionnel avec la p22^{phox}, indépendamment des autres facteurs cytosoliques impliqués dans l'activation de NOX1 et NOX2. Cependant, au niveau vasculaire, la sous-unité p22^{phox} s'associe avec Poldip2 afin d'activer la NOX4, ce qui permet de réguler le remodelage du cytosquelette et la migration des CMLVs (Lyle et al 2009). Identifiée pour la première fois en 2001, la NOX5 constitue une protéine membranaire qui ne partage que 27% d'homologie de structure avec le prototype NOX2. Elle est pourvue d'une boucle intracellulaire contenant des sites de liaisons du calcium. Contrairement aux autres NOXs, la NOX5 ne s'associe pas avec p22^{phox} et les autres facteurs cytosoliques pour son activation (Banfi et al 2001, Banfi et al 2004, Cheng et al 2001).

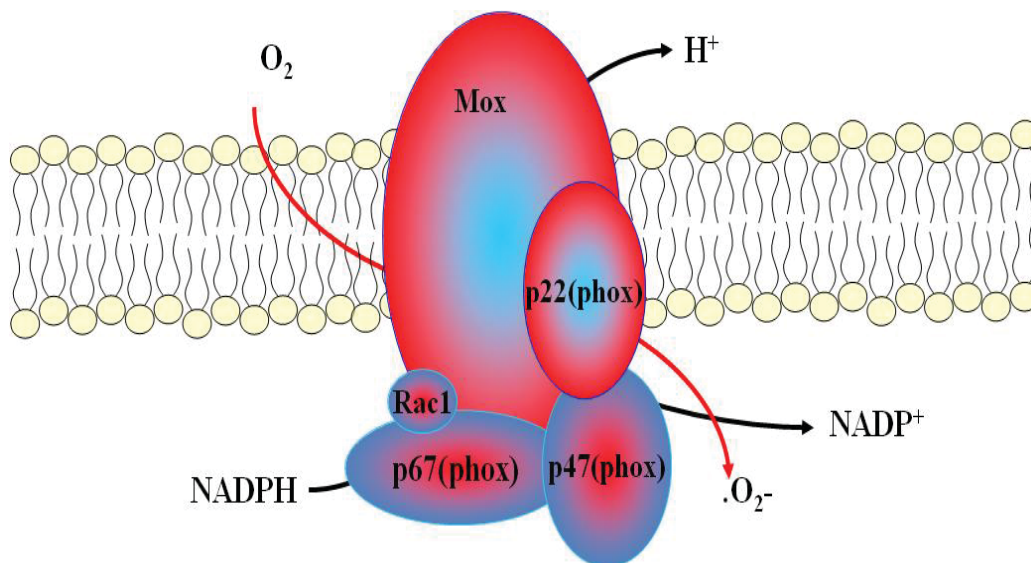
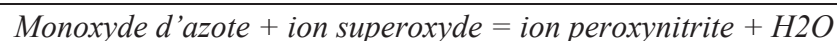


Figure 8 : Structure simplifiée de la NADPH oxydase dans une CMLVs. Source : adaptée de Griendling et al., (2000). Circ Res. 86:494-501.

Les autres sources endogènes du stress oxydatif proviennent surtout du processus de la respiration mitochondriale, des peroxyosomes (Schlezinger et al 2002), des lipoxygénases et du cytochrome P450 (Touyz & Schiffrin 2004). La NADPH oxydase, la xanthine oxydase (X/XO) et le monoxyde d'azote synthase épithéliale (eNOS) sont capables de générer de l'anion superoxyde qui interagit avec le monoxyde d'azote, donnant naissance à un ion peroxydrite (Cohen 2008) dont l'excès peut engendrer des effets pro-nécrotiques et pro-apoptotiques. De ce fait, les espèces réactives oxygénées (ERO) jouent parfaitement le rôle du second messenger par leur implication dans la régulation d'une variété de fonctions cellulaires comme la régulation génique, la croissance et la mort cellulaire (Dimmeler & Zeiher 2007). Effectivement, plusieurs hormones vasoactives induisent leurs effets physiopathologiques, au moins partiellement, par une augmentation de la production des EROs (Banes-Berceli et al 2005, Sanchez et al 2014). Dans le cas d'hypertension, une association entre le stress oxydant et l'augmentation de la pression artérielle a été rapportée dans différents modèles animaux d'hypertension y compris le SHR et le rat traité au sel DOCA (Callera et al 2006, Callera et al 2003, Nabha et al 2005, Welch & Wilcox 2001) .

On distingue plusieurs types des EROs produites par les systèmes biologiques qui sont essentiellement : le radical hydroxyle (ROO[•]), le dioxyde d'azote (NO₂), la peroxydrite (ONOO⁻), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le radical alkoxyde (RO[•]), l'anion superoxyde (O₂^{•-}) et le radical hydroxyle (OH[•]). L'anion superoxyde est la source majeure de production de H₂O₂ (Touyz & Schiffrin 2004).



Chaque cellule est pourvue d'un système de défense antioxydant capable de réduire le niveau des ERO (Fridovich 1999). Ce système est constitué principalement d'une composante enzymatique qui regroupe la catalase (CAT), le superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (Gpx), et d'une composante non enzymatique constituée en grande partie des antioxydants exogènes comme certaines vitamines (vitamine E, C, A).

1.5 Hypertension

L'hypertension artérielle constitue un problème majeur de santé publique concernant à la fois les pays industrialisés et les pays en voie d'industrialisation (Kearney et al 2005, Lawes et al 2008). Cette pathologie vasculaire constitue un facteur de risque essentiel des maladies du cœur et des accidents vasculaires cérébraux (AVC) qui sont les principales causes de mortalité (Rahman & Gilmour 2014). Selon l'organisation mondiale de la santé, 12,8% du taux totale de mortalité est causé par l'hypertension (hypertension. 2013) (Papathanasiou et al 2015). Un traitement de l'hypertension artérielle systolique et diastolique est nécessaire quand les valeurs de la pression artérielle dépassent 140/90 mmHg. Ce traitement est associé à une réduction significative des complications cardiovasculaires. La prévalence de l'hypertension artérielle au Canada concerne 20% de la population canadienne adulte, et le pourcentage du contrôle de la pression artérielle atteint 64,6% de la population (Daskalopoulou et al 2015). Selon l'organisation mondiale de la santé, le pourcentage de la population adulte hypertendue atteint 40% de la population générale mondiale mais seulement 32% parmi cette population reçoit un traitement (hypertension. 2013).

La tension artérielle est, essentiellement, le résultat de deux variables : un débit cardiaque et une résistance vasculaire périphérique. L'hypertension artérielle survient lors

d'une augmentation du débit cardiaque et/ou de la résistance vasculaire périphérique. Cette hypertension peut être primaire (majorité de cas) ou secondaire, souvent liée à une des causes rénales. L'hypertension essentielle idiopathique est un état pathologique complexe et multifactoriel dont les causes précises ne sont pas très bien connues. La pression pulsée, différence entre la pression artérielle systolique (PAS) et la pression artérielle diastolique (PAD), constitue aussi un indicateur clinique prédictif des complications cardio-vasculaires (Domanski et al 2002, Millar & Lever 2000) liées à l'âge et à des états hypertensifs chroniques comme les AVC, l'insuffisance cardiaque et les symptômes du syndrome coronarien aigu. La valeur moyenne de la pression artérielle pulsée se situe entre 50 mmHg et 60 mmHg, et les risques cardiovasculaires augmentent quand cette valeur différentielle de la pression artérielle dépasse 80 mmHg. La fraction d'éjection ventriculaire reflétée par le volume d'éjection systolique et la compliance artérielle (des artères de conduction) constituent les paramètres majeurs qui influencent la pression pulsée (Domanski et al 2002, Millar & Lever 2000).

1.5.1 Modèle animal d'hypertension essentielle (rats spontanément hypertendus)

Les rats spontanément hypertendus (*spontaneously hypertensive rats* : SHR) est le modèle animal le mieux caractérisé pour étudier l'hypertension artérielle chez l'homme. La phase pré-hypertensive survient généralement entre la 4^{ème} et la 6^{ème} semaine (Zimmerman & Frohlich 1990). On note bien évidemment des ressemblances dans la cinétique du développement de l'hypertension et des maladies cardio-vasculaires liées à cette hypertension remarquée chez l'homme qui sont, entre autres, le remodelage vasculaire, l'hypertrophie cardiaque et l'insuffisance cardiaque. En effet, plusieurs complications cardio-vasculaires remarquées dans ce modèle animal ont été rapportées cliniquement chez l'Homme (Trippodo

& Frohlich 1981). Malgré les divergences concernant l'âge de l'établissement, l'hypertension artérielle s'établit généralement entre l'âge de 10 et 12 semaines. Ce développement progressif de l'hypertension peut s'établir plus au moins rapidement selon le background génétique des rats (Engelmann et al 1987).

Le modèle SHR est caractérisé par une altération dans la structure de la membrane vasculaire (Yamori et al 1981). L'aorte des rats SHR nouveau-nés montre une hyperplasie causée essentiellement par l'hyperprolifération des CMLVs de SHR par rapport aux rats WKY (Hamet et al 1985, Walter & Hamet 1986). Indépendamment de leurs effets hémodynamiques, les agonistes vasoactifs synthétisés localement jouent un rôle important dans le processus du remodelage vasculaire dans le modèle SHR. Une corrélation entre un niveau élevé en rénine et en Ang II dans la paroi vasculaire et une augmentation de la pression artérielle a été déjà rapporté (Miyazaki et al 1986). En disposant de la machinerie enzymatique nécessaire à la synthèse de l'Ang II tels que la rénine, l'angiotensinogène et l'ACE (Dzau 1984), les CMLVs de SHR synthétisent localement de l'Ang II (Fukuda et al 1999). L'Ang II endogène induit une augmentation de l'expression des facteurs de croissance par les CMLVs de SHR (Majack et al 1990, Stouffer & Owens 1992) et joue un rôle important dans le remodelage vasculaire indépendamment de l'Ang II circulant. Les CMLVs de SHR ont aussi une activité synthétique beaucoup plus importante en termes de certains facteurs de croissance tels que le PDGF-A, le TGF β 1 et bFGF (Fukuda et al 1997, Fukuda et al 1999, Hu et al 1998, Satoh et al 2001). Les CMLVs de SHR sont aussi capables de synthétiser de l'ET-1 d'une manière endogène (Lu et al 2003).

1.6 Complications cardiovasculaires liées à l'hypertension

1.6.1 Remodelage vasculaire : définitions et mécanismes moléculaires

Le remodelage vasculaire hypertrophique est une réponse compensatoire suite essentiellement à des contraintes biochimiques et mécaniques appliquées sur la paroi vasculaire. Ce processus compensatoire implique plusieurs réponses cellulaires y compris la prolifération, l'hypertrophie et la migration des CMLVs (Erami et al 2002, Rzucidlo et al 2007). Effectivement, les CMLVs se dotent d'une plasticité qui leur permet de changer leur profil majoritairement contractile vers un profil sécrétoire (Chistiakov et al 2015a). Cette dédifférenciation survient dans des cas pathologiques comme l'hypertension et l'athérosclérose (Rzucidlo et al 2007). La couche moyenne (la media) des artères est formée majoritairement de CMLVs qui constituent l'unité structurale responsable du tonus vasculaire (Ammit & Panettieri 2001). En effet, dans le cas physiologique, les CMLVs adultes gardent une activité proliférative et synthétique faible avec la présence d'un profil contractile caractérisé par l'abondance de protéines impliquées dans la contraction vasculaire comme l'alpha-SMA (alpha-actin), SM22 α et la calponine (Owens 1995, Owens et al 2004). Une pression intraluminale élevée due à une hypertension artérielle est associée à une augmentation de l'hypertrophie et de la prolifération des CMLVs et à une hausse du taux de synthèse de la MEC (Negoro et al 1995, Skalak & Price 1996). Ceci permet le maintien d'une contrainte circonférentielle constante et compense une augmentation de la pression intraluminale (Hayashi & Naiki 2009). En plus, des hormones vasoactives comme l'Ang II, l'ET-1 et la thrombine (Hsieh et al 2009), des facteurs de croissance comme le TGF- β , l'EGF, le FGF-2 et le PDGF causent la prolifération des CMLVs (Dempsey et al 1991, Hayashi et al

1998, Stouffer & Owens 1994, Suwanabol et al 2012) et constituent donc des acteurs importants du remodelage vasculaire.

Des facteurs de risques athérogéniques y compris le diabète et l'hypercholestérolémie influencent négativement la biodisponibilité du mono-oxyde d'azote (NO) et constitue un cofacteur important du remodelage vasculaire y compris la prolifération des CMLVs (Son et al 2008, Zampetaki & Xu 2009). D'autre part, on assiste à une augmentation de la production du NO par iNOS (*inductible nitric oxide synthase*) dans les CMLVs en cas d'hypertension. Ces monoxydes d'azote produisent des peroxynitrites (ONOO^-) à pouvoir pro-oxydant élevé capable de potentialiser les facteurs du remodelage vasculaire (Fortuno et al 2005, Milstien & Katusic 1999, Ronson et al 1999).

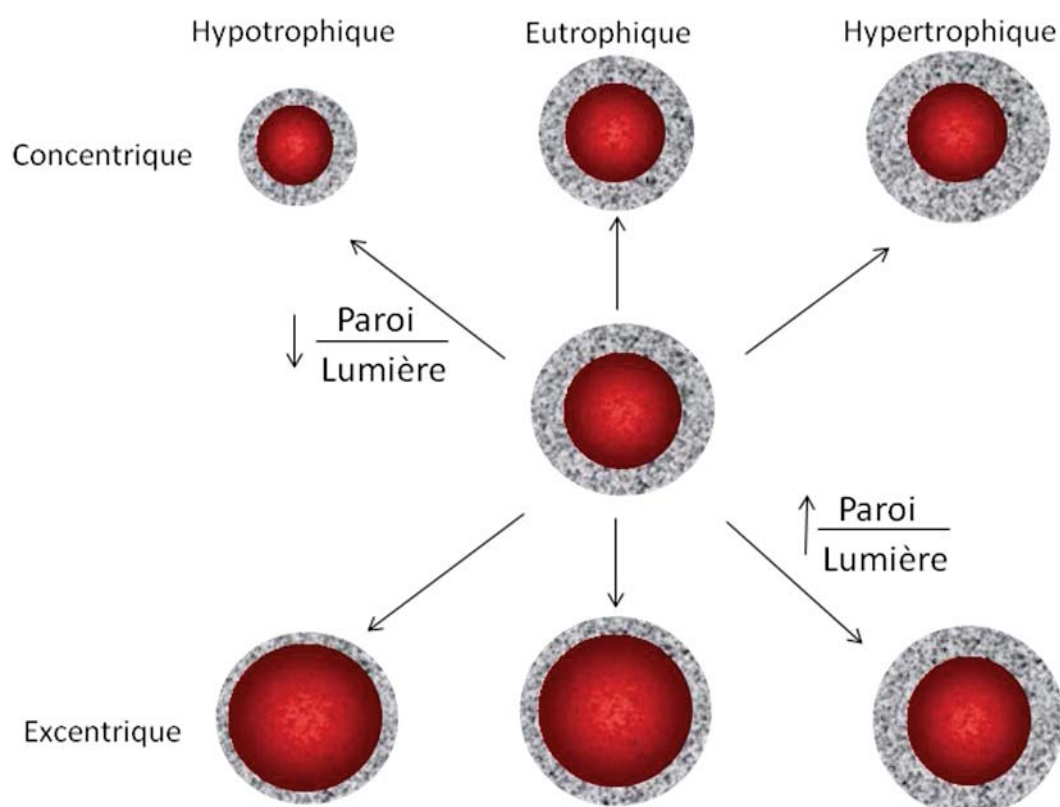


Figure 9 : différents aspects du remodelage vasculaire. Source : adapté de Mulvany M.J. (Mulvany 1999).

1.6.1.1 Dédifférenciation des CMLVs et dynamique calcique

Les CMLVs constituent une structure fonctionnelle excitable responsable de la perfusion tissulaire (artères) et du drainage vasculaire (veines), permettant ainsi un contrôle important de la pression artérielle (Yoshida T et Owens GK; 2005). Ces CMLVs s'adaptent à plusieurs changements physiologiques et pathologiques, et montrent une plasticité remarquable (Owens GK; 2004). En effet, la CMLV est dotée d'une plasticité phénotypique caractérisée par une dédifférenciation d'un phénotype contractile vers un phénotype majoritairement sécrétoire et prolifératif (Matchkov et al 2012, Rzucidlo et al 2007, Song & Li 2010). Le changement phénotypique des CMLVs est associé à un certain nombre de maladies telles que l'hypertension, l'athérosclérose, la (re)sténose (Heeneman et al 2007, Owens et al 2004). Les CMLVs qui ont désormais un profil synthétique gardent tout de même la capacité d'interagir à des stimuli et d'augmenter le taux du calcium intracellulaire, mais selon un mécanisme de dynamique calcique différent concernant l'entrée du calcium extracellulaire (Wamhoff et al 2006). En fait, la porte d'entrée majeure du calcium extracellulaire pour une CMLV à profil contractile est le canal calcique dépendant du voltage (*Voltage-gated L-type Ca^{2+} channels* (LTCCs)) qui s'ouvre lorsque le potentiel de la membrane est hyperpolarisant. Dans le cas d'hypertension, on assiste à une élévation du niveau du calcium intracellulaire des CMLVs et une augmentation de la sensibilité aux stimuli vasoactifs (Bohr & Webb 1988, Noon et al 1978, Orlov et al 1993, Thompson et al 1987). L'entrée du calcium extracellulaire, dans le cas d'une CMLV dédifférenciée, est assurée par deux types de canaux calciques indépendants du voltage, qui sont SOCE (*store-operated Ca^{2+} entry*) et ROCE (*receptor-operated Ca^{2+} entry*) (Baryshnikov et al 2009, Berra-Romani et al 2008). Ce changement dans la dynamique du calcium est associé à une disparition des événements calciques

spatiotemporels qui caractérisent une CMLV contractile (Bobe et al 2011, Lipskaia et al 2005). Cette dynamique spatiotemporelle du calcium appelé Ca^{2+} *sparks* a un feed-back négatif sur la contraction de la CMLV par son activation des canaux potassiques sensibles au Ca^{2+} (KCa) (Gollasch et al 2000, Nelson et al 1995).

Malgré que les canaux calciques dépendant du voltage (CCVDs), tels que le canal Cav1.2, sont ciblés par des médicaments anti-hypertensifs, leur niveau d'expression diminue dans les CMLVs à profil synthétique (Gollasch et al 1998, Neylon et al 1999, Richard et al 1992). La perte de la fonction du canal Cav1.2 diminue considérablement l'entrée du calcium en réponse à une dépolarisation ce qui engendre des anomalies dans la dynamique d'entrée du calcium après excitation. Contrairement aux CCVDs, les canaux TRP sont considérés comme des canaux calciques indépendants de la dépolarisation membranaire et peuvent entrer en jeu dans le cas du remodelage vasculaire associé à un taux d'expression élevé des composantes SOCE qui sont essentiellement les TRPCs, STIM1 et Orail1 (Nilius et al 2007, Zhu et al 1996). Lors de la perte des CCVDs, l'entrée du calcium est assurée par des canaux TRPs non sélectifs perméables à la fois aux ions Ca^{2+} , K^{+} et Na^{+} . Ces canaux, décrits comme des canaux SOCs (store-operated channels), sont impliqués dans le processus de prolifération des CMLVs (Golovina 1999, Lin et al 2004, Sweeney et al 2002). Les canaux TRPs sont aussi des senseurs chimiques activés directement par plusieurs types de molécules. Les lipides sont des activateurs préférentiels de différents types de canaux TRPs. Parmi les molécules lipidiques activatrices des canaux TRPs, on distingue surtout la LPC (lysophosphatidylcholine) (Flemming et al 2006) qui constituent approximativement 40% du complexe LDL-oxydée. La sphingosine-1-phosphate (S1P) est aussi capable d'activer le canal TRPC1/5 (Xu et al 2006). Ces mécanismes moléculaires d'activation lipidique des canaux TRPs révèlent un rôle

important de la dyslipidémie (hypercholestérolémie) dans les mécanismes du remodelage vasculaire. Les espèces réactives oxygénées (EROs) et les espèces réactives nitrosylées (ERNs) sont aussi capables d'activer directement ces canaux indépendants du voltage (Yoshida et al 2006), alors que ces facteurs inhibent les canaux type Cav1.2 (Xu et al 2006). La voie des MAPKs semble jouer un rôle important dans la diminution de l'expression des canaux Cav1.2 (Ihara et al 2002). Le $TNF\alpha$, agent pro-inflammatoire, est aussi impliqué dans l'expression des canaux TRPs selon un mécanisme dépendant du NF-kB (Paria et al 2003, Shi et al 2005, Takahashi et al 2007).

1.6.1.2 Prolifération des CMLVs

On peut définir la prolifération cellulaire comme étant l'augmentation du nombre de division cellulaire associée parfois à une hyperplasie et/ou polyploïdie. La prolifération des CMLVs constitue l'un des facteurs majeurs du remodelage vasculaire. En effet, une prolifération des CMLVs est l'une des principales causes de l'épaississement de la paroi vasculaire et des anomalies athérogéniques. Un état hypertensif chronique stimule la prolifération et le taux de synthèse de l'ADN dans les CMLVs et favorise la formation de la néointima. Plusieurs hormones vasoactives d'origine nerveuse, systémique ou locale, comme l'Ang II, l'ET-1 (Gomez Sandoval et al 2013) et les catécholamines (Parenti et al 2001, Yu et al 1996), ont des effets pro-prolifératifs et pro-migratoires (Barman & Marrero 2005). D'autre part, une augmentation de l'activité du système nerveux adrénergique constitue un cofacteur important du remodelage vasculaire par son rôle dans l'induction de la synthèse du PDGF-A, qui a un rôle efficace dans la croissance exagérée des CMLVs (Fukuda et al 1997).

1.6.1.3 Hypertrophie des CMLVs

L'hypertrophie cellulaire est le résultat d'une augmentation de la masse (taux de synthèse protéique) et/ou de la taille d'une cellule. La voie de signalisation liée à la protéine $Gq\alpha$ constitue une voie classique de la réponse hypertrophique des cardiomyocytes, et plusieurs recherches ont démontré un rôle important de cette voie de signalisation dans l'hypertrophie des CMLVs (Atef & Anand-Srivastava 2014, Keys et al 2002, Ohtsu et al 2008). Des agonistes vasoactifs comme la norepinephrine (NE), l'épinéphrine (EPI), l'angiotensin II (Ang II), l'endothéline-1 et la sérotonine, activent leurs propres récepteurs couplés à une protéine G (essentiellement $Gq\alpha$) en induisant une augmentation du calcium intracellulaire et une activation de MAPKs. Ces événements signalétiques induisent une réponse prohypertrophique à long terme dans les CMLVs. D'autres études ont aussi rapporté une implication de petites protéines G dans la réponse hypertrophique des CMLVs (Yamakawa et al 2000). Le SRA joue un rôle très important dans l'hypertrophie des CMLVs de la media dans plusieurs modèles d'hypertension artérielle y compris le modèle SHR (Berk et al 1989, Griffin et al 1991, Owens & Schwartz 1982). Cet effet hypertrophique de l'Ang II peut être indépendant de son effet hémodynamique. Les mécanismes moléculaires de cette hypertrophie vasculaire sont extrêmement complexes et impliquent plusieurs facteurs clés dont le récepteur AT1 de l'Ang II (Geisterfer et al 1988).

1.6.1.4 Protéines contractiles et hypertrophie des CMLVs

Les mécanismes moléculaires de la dédifférentiation des CMLVs sont extrêmement complexes et interconnectés. Parmi les changements qui accompagnent cette conversion

phénotypique, on note une diminution de l'expression de certaines protéines impliquées dans la régulation de la contraction des CMLVs et dans le remodelage du cytosquelette. Parmi ces molécules, on note surtout la protéine α -actine, la MHC et la SM22 α . Une diminution de l'expression de la SM22 α (Kawai-Kowase & Owens 2007), protéine de la famille calponine associée à l'actine, induit une réponse inflammatoire associée à un remodelage du cytosquelette au niveau vasculaire selon un mécanisme dépendant du stress oxydatif et de la voie NF- κ B (Shen et al 2010). En effet, l'inhibition de l'expression protéique de la SM22 α ainsi que la phosphorylation du résidu sérine 181 de la SM22 α par l'Ang II, active la PKC δ qui induit une translocation de la molécule p47phox à la membrane et augmente par la suite le niveau du stress oxydatif (Lv et al 2012). Ceci induit une augmentation de l'hypertrophie et de la prolifération des CMLVs. D'autres part, la SM22 α permet la stabilisation des filaments d'actine (Han et al 2009, Zhang et al 2001) et une augmentation de l'expression de SM22 α inhibe la prolifération des CMLVs selon un mécanisme dépendant du RAS-ERK1/2 (Dong et al 2010).

La myocardine a été identifiée dernièrement comme un régulateur important de la différenciation des CMLVs. Ce facteur de transcription constitue un cofacteur d'activation du SRF (*Serum Response Factor*). L'effet synergique de la myocardine et du SRF permet l'induction de l'expression génique en activant plusieurs promoteurs dans les CMLVs (Chen et al 2002, Du et al 2003, Wang et al 2002, Yoshida et al 2003). Une diminution de l'activité de la myocardine est associée au profil synthétique des CMLVs. En effet, ce facteur de transcription joue un rôle important dans l'expression génique de certaines molécules impliquées dans la contraction vasculaire et dans la stabilité du cytosquelette tels que la SM α -actine, la SM-MHC, la SM22 α et la calponine (Yoshida et al 2004, Yoshida et al 2003).

1.6.1.5 Forces de pression et hypertrophie vasculaire

Une hypertrophie de CMLVs est une adaptation cellulaire face à la force de pression qui constitue le signal déclencheur de la croissance cellulaire adaptative. L'hypertrophie vasculaire (médiale) au niveau de grosses artères de conduction est causée essentiellement par l'hypertrophie des CMLVs de la tunica media. Effectivement, l'hypertension induit des effets biomécaniques diverses sur la paroi artérielle et favorise l'installation de la rigidité artérielle et la résistance vasculaire périphérique. En 1989, Baumbach et Heistad ont démontré pour la première fois une association entre les changements dans la structure des vaisseaux de résistance et l'hypertension artérielle (Baumbach & Heistad 1989). Ces changements sont surtout caractérisés par une diminution dans le diamètre de la lumière vasculaire avec une augmentation du rapport media/lumière sans changement dans le volume de la media (media cross-sectional area) (Short 1966).

Les forces mécaniques appliquées sur la paroi vasculaire englobent essentiellement la contrainte circonférentielle générée par la pression artérielle, la contrainte de cisaillement de la paroi causée par le flux sanguin et le stress axial de l'élongation (Hayashi & Naiki 2009). Un état hypertensif chronique est associé à une réduction dans la compliance de grosses artères de conduction (ex. : l'aorte) (Mourad et al 1998), une augmentation de l'hypertrophie vasculaire et un épaississement de la paroi artérielle (Girerd et al 1994a, Girerd et al 1994b). En effet, une hausse de la pression artérielle constitue un facteur important de la diminution de l'élasticité vasculaire (compliance). Une diminution de la compliance artérielle des artères larges de conduction lors d'une hypertension est un facteur déterminant de la hausse de la pression pulsatile (Riley et al 1992, Roman et al 1992). Contrairement au remodelage

vasculaire, un profil hypertrophique est associé à une augmentation de la compliance isobarique (Mourad et al 1998).

1.6.1.6 Rôle d'angiotensine II dans le remodelage vasculaire

Un état hypertensif chronique est associé à une augmentation systémique et/ou locale du niveau d'Ang II. Cette hormone vasoactive est capable de stimuler le taux de synthèse protéique, même à de faibles concentrations hémodynamiquement négligeables, par son activation de plusieurs voies de signalisation prohypertrophique surtout la voie de phosphoinositides déclenchés par le récepteur AT1 couplé à une protéine Gq α (Azuma et al 1992, Griffin et al 1991). L'activation d'un RCPGq α est classiquement médiée par la voie des phosphoinositides (Bourne et al 1990, Hamm 1998). En effet, contrairement à plusieurs agonistes vasoconstricteurs, l'inhibition d'Ang II n'atténue pas seulement l'hypertension artérielle mais aussi l'hypertrophie vasculaire.

La voie Gq α semble jouer un rôle beaucoup plus complexe dans la signalisation intracellulaire de la réponse hypertrophique dont on ne connaît pas complètement les mécanismes (Hubbard & Hepler 2006). Le calcium, un des principaux produits de la voie Gq α , inhibe à son tour l'activité de l'adénylate cyclase et diminue la biodisponibilité de l'AMPc (Caldwell et al 1992, Cooper et al 1995, von Hayn et al 2010) ce qui aggrave l'état hypertensif et le taux de remodelage vasculaire. Ces mécanismes reflètent une interconnexion entre la voie de l'adénylate cyclase et la voie des phosphoinositides. Ceci reflète partiellement la complexité des mécanismes de signalisation moléculaire liés au remodelage vasculaire.

L'Ang II induit une action complexe sur les CMLVs des artérioles de résistance d'une manière endocrine, paracrine ou autocrine. A long terme, l'action de l'Ang II consiste à une régulation de l'expression génique de plusieurs molécules impliquées dans le remodelage vasculaire. Des études suggèrent un rôle plutôt indirect de l'Ang II dans le remodelage vasculaire par sa stimulation de la synthèse de plusieurs facteurs de croissance qui agissent d'une manière autocrine sur les CMLVs tels que le PDGF-A, le TGF- β 1 et le bFGF (Gibbons et al 1992, Itoh et al 1993, Koibuchi et al 1993, Naftilan et al 1989, Stouffer & Owens 1992). De plus, les modèles animaux d'hypertension artérielle dépendants de l'Ang II, en l'occurrence les rats traités à l'Ang II et le modèle animal rénovasculaire, présentent une hypertrophie de CMLVs (Korsgaard & Mulvany 1988, Mulvany 1993).

1.6.1.7 Rôle de l'endothéline-1 dans le remodelage vasculaire

En plus de ses effets hémodynamiques puissants (Hirata et al 1989), l'ET-1 a des effets pro-mitotiques (Hirata et al 1989) et pro-hypertrophique (Chua et al 1992) sur les CMLVs. En effet, l'ET-1 constitue un facteur contributif important du remodelage vasculaire (eutrophique) caractérisé par une réorganisation de fibre du collagène et par un dysfonctionnement endothélial (Deng et al 1995, Intengan & Schiffrin 2000, Li et al 1994, Schiffrin 1995). L'effet prohypertrophique de l'ET-1 implique, entre autres, une transactivation de l'EGFR et une activation de la voie de signalisation de MAPKs. À l'instar de l'Ang II, l'ET-1 constitue un puissant activateur du NADPH oxidase qui est la source majeur du stress oxydant au niveau vasculaire. Effectivement, dans le modèle animal d'hypertension artérielle Sel-DOCA, où l'endothéline joue un rôle important dans son étiologie, on assiste à une augmentation du

stress oxydatif au niveau vasculaire (Callera et al 2006, Callera et al 2003, Li et al 2003b, Li et al 2003c).

1.6.2 Hypertrophie cardiaque : définition et mécanismes moléculaires

L'hypertrophie cardiaque constitue un facteur de risque majeur de la morbidité cardiovasculaire (Levy et al 1990, Savage et al 1990). Elle est le résultat de modifications structurales, morphologiques et fonctionnelles du cœur surtout au niveau du ventricule gauche (VG). Ce remodelage cardiaque est la réponse compensatoire naturelle des cardiomyocytes face à un stress physiologique (Ex : sport intense, croissance) ou pathologique (Ex : hypertension, diabète) (Lips et al 2003, Swynghedauw 1999). L'hypertrophie cardiaque non-pathologique est caractérisée par une structure ventriculaire excentrique sans fibrose avec une angiogenèse équilibrée. Quant à l'hypertrophie cardiaque pathologique, elle est surtout caractérisée par un remodelage de nature concentrique compensatoire à son début (Frohlich 1987) et qui devient par la suite décompensatoire secondaire à un état hypertensif chronique (Vasan & Levy 1996). Des facteurs hémodynamiques, neuro-hormonaux et génétiques sont responsables de l'étiologie de l'hypertrophie cardiaque. Lors d'une hypertension artérielle chronique, d'une augmentation de la postcharge cardiaque ou d'une sténose de la valve aortique on assiste à une augmentation des forces mécaniques appliquées sur la paroi du cœur. D'autres facteurs comme des anomalies congénitales peuvent aussi être la cause d'une hypertrophie cardiaque secondaire (Dorn & Hahn 2004). En plus du stress mécanique résultant surtout d'une postcharge cardiaque élevée (Akhter et al 1998, Esposito et al 2001), des

agonistes vasoactifs comme l'Ang II, l'ET-1, la thrombine, la noradrenaline, les facteurs de croissances et les cytokines constituent des stimuli biochimiques de l'hypertrophie cardiaque.

Le stress mécanique constitue, en quelque sorte, le stimulus déclencheur d'une réponse hypertrophique des cardiomyocytes qui s'amplifie par l'implication synergique des autres facteurs neurobiochimiques. Cette réponse physiopathologique est caractérisée à son début par une réactivation de l'expression de certains gènes néonataux impliqués classiquement dans la croissance néonatale du cœur, comme ceux des gènes de l'ANP et de la BNP (Horio et al 2000, London 2006). Les récepteurs transmembranaires couplés à une protéine Gq α jouent un rôle critique dans l'initiation et l'établissement de l'hypertrophie cardiaque (Akhter et al 1998, Esposito et al 2001). Le récepteur AT1 de l'Ang II couplé essentiellement à une protéine Gq α est connu aussi par son rôle primordial dans la transduction du signal prohypertrophique après son activation par son agoniste. En plus, AT1 et Gq α ont aussi un rôle important à jouer dans la transduction du signal mécanique prohypertrophique dépendamment ou indépendamment de l'Ang II (Barauna et al 2013).

La voie de signalisation de Gq α est essentielle dans la prolifération et la croissance physiologique des cardiomyocytes au cours du stade de développement embryonnaire (Offermanns et al 1998). Elle joue un rôle crucial dans la réponse physiologique et pathophysiologique du cœur (Adams et al 1998, D'Angelo et al 1997, Mende et al 1999). Indépendamment de type du signal prohypertrophique, les mécanismes de l'hypertrophie cardiaque semblent orchestrés, en grande partie, par la protéine Gq α qui constitue par son association avec plusieurs récepteurs à sept domaines transmembranaires un point de convergence de différents stimuli chimio-mécaniques de l'hypertrophie cardiaque. Après son

activation, la protéine Gq α stimulent plusieurs acteurs clés de l'hypertrophie comme les PKCs, et la Ca²⁺-calmoduline.

La PKC α constitue l'isoforme des PKC conventionnelles le plus exprimé au niveau cardiaque (Bowling et al 1999, Palaniyandi et al 2009). Elle est activée par le Ca²⁺ et le DAG, deux seconds messagers de la voie de signalisation Gq α , et constitue une molécule de signalisation qui joue un rôle important dans la modulation de la contractilité (Belin et al 2007, El-Armouche et al 2007) et de l'hypertrophie cardiaque (Liu et al 2009). En plus, PKC α constitue, entre autres, un isoforme capable de phosphoryler les kinases couplées à la protéine G (GRK2 de l'anglais *G protein-coupled receptor kinases*), dont le rôle dans la régulation de la fonction cardiaque est bien rapporté (Koch et al 1995, Rockman et al 1998). En effet, la GRK2 phosphorylée permet la phosphorylation et le recrutement de la β -arrestin ce qui permet la désensibilisation des RCPGs même en présence de son agoniste. Ces mécanismes de régulation donnent à la GRK2 un pouvoir régulateur important de la fonction cardiaque (Bristow et al 1982, Bristow et al 1986, Lohse et al 1990, Ungerer et al 1993).

Hypothèse

Une élévation de la pression artérielle est le résultat d'une augmentation des résistances périphériques vasculaires totales et/ou du débit cardiaque. Une augmentation de la résistance vasculaire périphérique est le résultat d'un déséquilibre dans la production des substances vasoconstrictrices (ET-1, Ang II) et des substances vasodilatatrices (NO; prostacycline). Le SRA et le système endothéline sont impliqués dans la régulation de la pression artérielle par leurs effets rénaux, vasculaires et cardiaques. En cas d'hypertension, on assiste à une augmentation dans le niveau local et/ou systémique de l'Ang II et de l'ET-1. L'effet de ces agonistes vasoactifs au niveau vasculaire se traduit par une augmentation de la contractilité et un remodelage vasculaire avec ou sans hypertrophie vasculaire. L'hypertrophie de la cellule musculaire lisse vasculaire (CMLV) joue un rôle clé dans le processus du remodelage vasculaire au niveau des grosses artères de conduction et des petites artères de résistance. Malgré plusieurs efforts de recherche, les mécanismes moléculaires de l'hypertrophie vasculaire ne sont pas encore complètement élucidés. La voie de signalisation moléculaire liée à la protéine $Gq\alpha$ joue un rôle important dans les mécanismes moléculaires de l'hypertrophie cardiaque. De plus, l'hypertrophie des CMLVs induite par l'Ang II se fait selon un mécanisme dépendant de la $Gq\alpha$. Cependant, à notre connaissance, le rôle de l'axe $Gq\alpha$ -PLC β au niveau vasculaire n'était pas le sujet d'une intense investigation et aucune étude n'a élucidé l'implication de l'axe $Gq\alpha$ /PLC β dans les mécanismes moléculaires de l'hypertrophie vasculaire dans le modèle animal SHR.

Objectifs

Ce travail de doctorat a pour objectif principal d'étudier les mécanismes moléculaires de l'hypertrophie des CMLVs dans le modèle animal d'hypertension artérielle essentielle (spontaneously hypertensive rat : SHR).

Les objectifs spécifiques de ce travail consistent surtout à :

- Examiner le niveau d'expression protéique de Gq/11 α et de PLC β dans les CMLVs de SHR de différents âges, ainsi que le rôle des peptides vasoactifs (Ang II et ET-1) dans l'expression de Gq/PLC β .
- Examiner le rôle des protéines Gq α et PLC β 1 dans l'hypertrophie des CMLVs de SHR.
- Examiner le rôle du stress oxydatif et de la transactivation des récepteurs des facteurs de croissance dans les mécanismes moléculaires du comportement prohypertrophique des CMLVs de SHR.
- Examiner le rôle de la PKC δ dans les mécanismes moléculaires de l' hypertrophie des CMLVs de SHR.

Chapitre II: Résultats

Contribution des auteurs :

Article 1 (AJP-Cell Physiology): Mohammed Emehdi Atef (MEA) et Madhu B. Anand-Srivastava (MBAS) ont élaboré le design expérimental, MEA a réalisé les expériences, a analysé les données et a écrit le manuscrit (première version). MEA et MBAS ont réalisé l'interprétation des données. MBAS a participé dans l'interprétation des résultats et à l'écriture de la version finale du manuscrit.

Article 2 (AJP-Heart and Circulatory Physiology): MEA et MBAS ont élaboré le design expérimental, MEA a réalisé les expériences, a analysé les données et a écrit le manuscrit (première version). MEA et MBAS ont réalisé l'interprétation des données. MBAS a participé dans l'interprétation des résultats et à l'écriture de la version finale du manuscrit.

Article 3 (PLOS One : article soumis pour publication): MEA et MBAS ont élaboré le design expérimental, MEA a réalisé les expériences, a analysé les données et a écrit le manuscrit (première version). MEA et MBAS ont réalisé l'interprétation des données. MBAS a participé dans l'interprétation des résultats et à l'écriture de la version finale du manuscrit.

The American Physiological Society

9650 ROCKVILLE PIKE
BETHESDA, MARYLAND
20814-3991

June 9, 2015

The American Physiological Society grants to Mohammed Emehdi Atef, and University of Montreal, permission to include the following article in a doctoral thesis:

Atef ME, Anand-Srivastava MB. Enhanced expression of Gq α and PLC- β 1 proteins contributes to vascular smooth muscle cell hypertrophy in SHR: role of endogenous angiotensin II and endothelin-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014 307: C97-C106, 2014. doi: 10.1152/ajpcell.00337.2013.

The American Physiological Society, by policy, allows original authors to republish their article(s) within a thesis document without charge and without requesting permission, provided that full acknowledgement of the source is given in the thesis. Please see our website for the full policy <http://www.the-aps.org/mm/Publications/Copyright-and-Permissions>.

The permission allows the article to be reproduced in the thesis document only and posted on the University's repository for theses.

Permission is granted without charge provided a full citation of the original published source is in the reference list.

Permission is granted for use of the material specified above provided the publication is credited as the source using the above citation.

Date: June 9, 2015

Rita Scheman

Director of Publications,
American Physiological Society

JOURNALS

AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-CELL PHYSIOLOGY*AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM * AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-GASTROINTESTINAL AND LIVER PHYSIOLOGY * AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY X * AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LUNG CELLULAR AND MOLECULAR PHYSIOLOGY * AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-REGULATORY, INTEGRATIVE AND COMPARATIVE PHYSIOLOGY * AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-RENAL PHYSIOLOGY *ADVANCES IN PHYSIOLOGY * AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY (CONSOLIDATED)*JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY *JOURNAL OF NEUROPHYSIOLOGY * PHYSIOLOGICAL REVIEWS
NEWS IN PHYSIOLOGICAL SCIENCES (WITH IUPS) THE **PHYSIOLOGIST** * PHYSIOLOGICAL GENOMICS.

BOOKS

HANDBOOK OF PHYSIOLOGY * CLINICAL PHYSIOLOGY SERIES * SPECIAL PUBLICATIONS

Enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins contribute to vascular smooth muscle cell Hypertrophy in SHR: Role of endogenous angiotensin II and endothelin-1

Mohammed Emehdi Atef and Madhu B. Anand-Srivastava*

Department of Molecular and Integrative Physiology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Running Head: Gq α /PLC β 1 proteins and VSMC hypertrophy

*Address correspondence to:

Dr. Madhu B. Anand-Srivastava,
Department of Physiology, Faculty of Medicine,
University of Montreal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville,
Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7,
Tel : (514)343-2091
Fax: (514)343-2111

American Journal of Physiology-Cell physiology: **Published**

ABSTRACT

Vascular Gq α signaling has been shown to contribute to cardiac hypertrophy. In addition, angiotensin II (Ang II) was shown to induce VSMC hypertrophy through Gq α signaling, however, the studies on the role of Gq α and PLC β 1 proteins in VSMC hypertrophy in animal model are lacking. The present study was therefore undertaken to examine the role of Gq α /PLC β 1 proteins and the signaling pathways in VSMC hypertrophy using spontaneously hypertensive rats (SHR). VSMC from 16 week-old SHR and not from 12 week-old SHR exhibited enhanced levels of Gq α /PLC β 1 proteins as compared to age-matched Wistar-Kyoto (WKY) rats as determined by Western blotting. However, protein synthesis as determined by [³H]-leucine incorporation was significantly enhanced in VSMC from both 12 and 16 week-old SHR as compared to VSMC from age-matched WKY rats. Furthermore, the knockdown of Gq α /PLC β 1 in VSMC from 16 week-old SHR by antisense and siRNA resulted in attenuation of protein synthesis. In addition, the enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins, enhanced phosphorylation of ERK1/2 and enhanced protein synthesis in VSMC from SHR were attenuated by Ang II AT1 and endothelin-1 (ET-1) ET_A receptor antagonists, Losartan and BQ123 respectively but not by ET_B receptor antagonist, BQ788. In addition, PD98059 decreased the enhanced expression of Gq α /PLC β 1 and protein synthesis in VSMC from SHR. These results suggest that the enhanced levels of endogenous Ang II and ET-1 through the activation of AT1 and ET_A receptors respectively and MAP kinase signaling, enhanced the expression of Gq α /PLC β 1 proteins in VSMC from 16 week-old SHR and result in VSMC hypertrophy.

Key Words: Gq α protein; PLC β 1 protein; SHR; VSMC; hypertrophy.

INTRODUCTION

The heterotrimeric guanine nucleotide regulatory protein (G protein), composed of three subunits (α , β and γ), plays a crucial role in the regulation of cardiovascular functions through the activation of several signal transduction systems including adenylyl cyclase and phosphatidyl inositide system (39). Based on α subunit sequence similarity, G α proteins are divided into four families Gs, Gi/o, Gq/11 and G12/13. Gs and Gi proteins regulate the activity of adenylyl cyclase whereas the activation of Gq α by a G-protein-coupled receptor (GPCR) stimulates phospholipase C β (PLC β), which hydrolyses inositol bi-phosphate (PIP2) and produce inositol 1,4,5-trisphosphate [Ins (1,4,5)P3] (IP3) and diacylglycerol (DAG) (23) and activates protein kinase C (PKC) (7, 43).

Alterations in the levels of Gq α protein and associated signaling pathways appear to contribute to the impaired cellular functions in several pathological states including diabetes, hyperglycaemia and cardiac hypertrophy (1, 12, 17, 46). The Gq α protein and associated signaling pathway activated by several hormones such as angiotensin II (Ang II), endothelin-1 (ET-1), and phenylephrine has also been implicated in the development and progression of cardiac hypertrophy and heart failure (2, 8, 13, 20, 24, 38). Cardiac overexpression of Gq α in transgenic mice has also been reported to result in hypertrophy and induction of classic hypertrophy gene expression profile (41). In addition, the transgenic overexpression of a Gq α dominant negative minigene that resulted in the lack of hypertrophy response to transverse aortic constriction (TAC) (1) further supports the implication of Gq α in hypertrophy. In addition, the Gq α signaling components including IP₃-Ca²⁺ and DAG-PKC have also been shown to play an important role in the development of cardiac hypertrophy in stroke-prone spontaneously hypertensive rat SHRSP (27). Furthermore, the contribution of vascular Gq-

coupled signaling in the development of cardiac hypertrophy has also been reported by using transgenic mice with vascular specific Gq inhibitor expression (28). We have earlier shown the implication of Gq and MAP kinase/PI3Kinase signaling in VSMC hypertrophy induced by vasoactive peptides in A10 VSMC (34). However, whether the expression of Gq α and PLC β 1 is enhanced and contributes to VSMC hypertrophy in rat models of hypertension such as SHR has not yet been examined.

The present study was therefore undertaken to investigate if VSMC from SHR of 12 week-old that do not express cardiac hypertrophy and 16 week-old that express cardiac hypertrophy exhibit enhanced expression of Gq/11 α and PLC β 1 proteins and if this up-regulation is associated with VSMC hypertrophy and is attributed to the increased levels of endogenous vasoactive peptides. We provided the first evidence that the levels of Gq α as well as PLC β 1 proteins were enhanced in VSMC from 16 week-old SHR exhibiting cardiac hypertrophy and not from 12 week-old SHR and that the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 may be attributed to the increased levels of endogenous Ang II and ET-1 which through the activation of AT1 and ET_A receptors respectively and MAP kinase signaling contribute to VSMC hypertrophy.

MATERIALS AND METHODS

Materials

ET_A receptor antagonist BQ123, ET_B receptor antagonist BQ788, AT1 receptor antagonist losartan, MAPK/ERK kinase inhibitor PD98059 and PLC inhibitor U73122 were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (St-Louis, Missouri, USA). Curcumin was purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA) and helenalin was from Sigma-Aldrich Chemical. Leucine, L-[4,5-³H(N)] was purchased from Perkin Elmer (Boston, MA). Monoclonal Gq α antibody (10), polyclonal G11 α antibody (D-17), monoclonal PLC- β 1 antibody (D-8), monoclonal p-ERK1/2 (phosphospecific-tyrosine204) antibody, polyclonal ERK1/2 antibody (C-14), monoclonal dynein IC1/2 antibody (74-1), Western blotting reagents, Gq α and PLC β 1 small interfering (si)RNA(r), siRNA transfection medium, and control siRNA were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). All other chemicals used in these experiments were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Gq α antisense oligodeoxynucleotide (AS-ODN) sequence was obtained from Alpha DNA (Montreal, Canada). Lipofectamine 2000 was purchased from Invitrogen (CA, USA).

Cell culture and incubation

Aortic VSMC from 12 week-old and 16 week-old SHR and age-matched WKY were cultured as described previously (3). The purity of the cells was checked by immunofluorescence technique using α -actin as described previously (35). These cells were found to contain high levels of smooth muscle-specific actin. VSMC were plated in 75-cm² flasks and incubated at 37°C in 95% air-5% CO₂ humidified atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (with glucose, L-glutamine, and sodium bicarbonate)

containing 1% antibiotics (containing penicillin, streptomycin, and amphotrecin B) and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). Cells were passaged upon reaching confluence with 0.5% trypsin and utilized between passages 2 and 8. Confluent cells were starved by incubation for 24 h in DMEM without FBS at 37°C to have cell quiescence. For the receptor antagonist studies, VSMC from SHR and WKY were incubated for 16 h in the absence or presence of BQ123 (1 μ M), BQ788 (1 μ M), or losartan (10 μ M). For RNA interference studies, cells were incubated with Gq α and PLC β 1 siRNA (for 12 h) and Gq α AS-ODN (for 24 h). After incubation, the cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in a 200 μ l buffer containing 25 mM Tris·HCl (pH 7.5), 25 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml aprotinin, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate, and 0.5 μ g/ml leupeptin on ice. The cell lysates were centrifuged at 12,000 g for 15 min at 4°C, and the supernatants were used for Western blot analysis. All the animal procedures used in the present study were approved by the Comité de Déontologie de l'Expérimentation sur les Animaux (CDEA) of the University of Montreal (#99050). The investigation conforms with the 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No.85-23, revised 1996).

Transfection of VSMC with siRNA

For optimal siRNA transfection efficiency, the manufacturer's protocol was followed. Briefly, VSMC were seeded in a 12-well plate or petri dishes and cultured in antibiotic free normal growth medium supplemented with 10% FBS until the cells were 50-60% confluent. On the day of transfection, cells were washed and incubated with transfection medium (sc-

36868) containing 60 pmoles of either MOCK (scrambled, sc-37007) or rat specific Gq α siRNA (sc-45998) or PLC β 1 siRNA (sc-270424) complexed with Lipofectamine 2000 reagent for 12 h. After transfection, the medium was replaced with normal DMEM (containing 10 % FBS and 1% antibiotics) for an additional 24 h (80-90% confluence). To examine the effect of PLC inhibitor U73122 on protein synthesis in PLC β 1 silenced VSMC, the cells were starved with FBS free DMEM supplemented with 1% antibiotics for 6 h and treated for an additional 24 h with PLC inhibitor, U73122.

Transfection of VSMC with Antisense Oligonucleotides

The sequence of Gq α oligonucleotides used in this study was: Gq α anti-sense oligodeoxynucleotide (Gq α AS-ODN) (485), 5'-CTA-CAC-GGT-CCA-AGT-CAT-3' and Gq α -sense (Gq α S-ODN): 5'-ATG-ACT-TGG-ACC-GTG-TAG-3'. Confluent VSMC (60%) were transfected with antisense oligonucleotides (5 μ M) complexed with Lipofectamine 2000 reagent and incubated for 24 h in the DMEM medium without antibiotics and FBS. The cells were washed three times with pre-warmed 1X PBS and incubated for an additional 24 h with normal DMEM containing 10 % FBS and 1% antibiotics.

Western blotting

The levels of Gq α , G11 α and PLC β 1 proteins and ERK1/2 phosphorylation were determined by western blotting as described previously (31). After SDS-PAGE, separated proteins were electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane with a semi-dry transblot apparatus at 15 V for 45 min (Gq α , G11 α , p-ERK1/2) or a liquid transfer apparatus

at 100 V for 1 h (PLC β 1). Membranes were blocked with 5 % dry milk and incubated overnight with specific antibodies. Dynein was used as loading control. The antibody-antigen complexes were detected by incubating the membranes with horseradish peroxidase-conjugated antibodies for 1 h at room temperature. The blots were washed three times with PBS before reaction with enhanced chemiluminescence (ECL) Western-blotting detection reagents from Santa Cruz Biotechnology. Quantitative analysis of the proteins was performed by densitometric scanning of the autoradiographs employing the Enhanced Laser Densitometer, LKB Ultrosan XL, # 2000 and quantified using the gel-scan XL evaluation software (version 2.1) from Pharmacia (Baie d'Urfe, Quebec, Canada).

Determination of protein synthesis

VSMC from 12 and 16 week-old SHR and age-matched WKY were grown to confluence in 12-well culture plates. Protein synthesis (Cell hypertrophy) was evaluated by [3 H]-leucine incorporation into cells as described previously (34). Confluent cells were serum deprived for 24 h to induce cell quiescence and were incubated in the absence or presence of losartan (10 μ M), BQ123 (1 μ M), BQ 788 (1 μ M), PD98059 (10 μ M and 20 μ M) and U73122 (5 μ for 24 h. [3 H]-leucine (2 μ Ci per well) was added at the same time as that of antagonists and inhibitors.

For RNA interference studies, the cells were incubated in the absence or presence of siRNA or AS-ODN against Gq α and PLC β 1. [3 H]-leucine (2 μ Ci) was added and further incubated for 24 h before the cells were harvested. The cells were rinsed twice with ice-cold 1X PBS and incubated with 5% TCA for 1 h at 4°C. After being washed twice with ice-cold 1X PBS, the cells were incubated with 0.4 N sodium hydroxide solution for 30 min at room

temperature, and radioactivity was determined by liquid scintillation counter.

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SEM. Comparisons between groups were made with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post-hoc test. Unpaired t test was used to compare HW/BW ratio between SHR and WKY age matched rats. A difference between groups was significant at $P < 0.05$.

RESULTS

The heart weight to body weight ratio (HW/BW) was used as an index of cardiac hypertrophy. HW/BW (mg/g) in 12 week-old SHR was not different from age-matched WKY rats (SHR: $4,02 \pm 0,18$ mg/g, WKY: $3,91 \pm 0,29$; (n=6)), however, 16 week-old SHR exhibit cardiac hypertrophy as compared to age-matched WKY rats (SHR: $5,20 \pm 0,13$ mg/g, WKY: $3,98 \pm 0,22$ mg/g; $P < 0.05$ (n=6)).

VSMC from SHR exhibit enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis

In order to investigate if VSMC from 16 week-old SHR that exhibit cardiac hypertrophy also exhibit enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins, we determined the levels of Gq/11 α as well as PLC β 1, a downstream signaling molecule of Gq α , in VSMC from 16 week-old SHR. The results shown in Fig.1A, indicate that the expression of Gq α protein was significantly increased by about 60% in VSMC from 16 week-old SHR whereas the expression of Gq α was not altered in VSMC from 12 week-old SHR that do not exhibit cardiac hypertrophy compared with age-matched WKY rats. On the other hand, the expression of G11 α protein, which shares 88% homology with Gq α , was not significantly different in both the groups (Fig.1B). In addition, the expression of PLC β 1 protein was significantly ($\approx 85\%$) increased in VSMC from 16 week-old and not in 12 week-old SHR compared with VSMC from age matched WKY rats (Fig.1C). However, the expression of PLC β 2 was not altered (data not shown). The protein synthesis as determined by [3 H]-leucine incorporation was significantly enhanced in both VSMC from 12 week-old (60%) and 16 week-old (85%) SHR compared with VSMC from age-matched WKY rats (Fig.1D).

To investigate if the enhanced levels of Gq α /PLC β 1 proteins were due to increased RNA synthesis, the effect of actinomycin D (AD), an inhibitor of RNA synthesis, was examined on the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins in VSMC from SHR. Results shown in Fig.2A and Fig.2B indicate that treatment of cells with AD attenuated the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins respectively to WKY control levels.

Role of AP-1 and NF- κ B in enhanced expression of Gq α /PLC β 1

AP-1 and NF- κ B are important transcription factors that play a crucial role in cardiovascular pathophysiology (16, 21). In order to investigate the implication of AP-1 and NF- κ B in enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins in VSMC from 16 week-old SHR, we examined the effects of curcumin and helenalin, inhibitors of AP-1 and NF- κ B respectively(5, 22, 36) on the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 in VSMC from 16 week-old SHR. Results shown in Fig 2C,D indicate that curcumin and helenalin attenuated significantly the enhanced expression of Gq α (Fig 2C) by about 90 % and 80% respectively and the enhanced expression of PLC β 1(Fig.2D) by about 90 % and 85 % respectively. These inhibitors had no effect on the expression of Gq α and PLC β 1 proteins in VSMC from WKY rats. These results suggest that the overexpression of Gq α and PLC β 1 occurs via the activation of AP-1 and NF- κ B.

Knockdown of Gq α decreases protein synthesis in VSMC from SHR

To investigate if the increased expression of Gq α contributes to the increased protein synthesis in VSMC from SHR, the effect of the knockdown of Gq α was examined on the protein synthesis in VSMC from SHR and WKY. Results shown in Figure 3, indicate that the treatment of VSMC with 5 μ M of Gq α antisense oligodeoxynucleotides (AS-ODN) for 24 h

that completely attenuated the enhanced expression of Gq α protein (Fig.3A) also attenuated the enhanced protein synthesis by about 80% in VSMC from SHR (Fig.3B). On the other hand, a small but insignificant decrease in the expression of Gq α and protein synthesis was observed in VSMC from WKY rats by antisense treatment. In addition, silencing of Gq α by siRNA also inhibited the expression of Gq α by about 80% (Fig.3C) and protein synthesis by about 80% in VSMC from SHR but not in VSMC from WKY (Fig.3D).

Implication of PLC and PLC β 1 protein in enhanced protein synthesis in VSMC from SHR

To investigate if PLC is also implicated in the enhanced protein synthesis in VSMC from SHR, the effect of U73122 (5 μ M), an inhibitor of PLC, was examined on the enhanced protein synthesis in VSMC from SHR. Results shown in Fig.4A indicate that PLC inhibitor significantly attenuated the enhanced protein synthesis by \approx 70 % in VSMC from SHR. To further confirm the role of enhanced expression of PLC β 1 in enhanced protein synthesis in VSMC from SHR, we examined the effect of the knockdown of PLC β 1 by PLC β 1siRNA on the enhanced protein synthesis in VSMC from SHR. Results shown in Fig.4B, C indicate that the treatment of VSMC from SHR with PLC β 1siRNA attenuated the enhanced expression of PLC β 1 protein by \approx 70% (Fig.4B) and enhanced protein synthesis by \approx 60% (Fig.4C). However, PLC inhibitor and PLC β 1siRNA did not have any significant effect on the expression of PLC β 1 protein and protein synthesis in control cells. In addition, the attenuation of protein synthesis by knocking down of PLC β 1 by PLC β 1siRNA was not further potentiated by PLC inhibitor, U73122 (Fig . 4D).

Implication of AT₁ and ET_A receptor in enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis in VSMC from SHR

Since VSMC from SHR have been shown to exhibit increased levels of vasoactive peptides such as Ang II and ET-1 (18,37), it was of interest to investigate whether the enhanced levels of endogenous ET-1 and Ang II contribute to the increased expression of Gq α /PLC β 1 proteins in VSMC from SHR. To test this, we examined the effects of the antagonists of ET_A and ET_B receptor, BQ123, and BQ788, respectively, as well as losartan, an AT₁ receptor antagonist, on the increased expression of Gq α /PLC β 1 proteins in VSMC from SHR. The results shown in Fig.5A indicate that the treatment of VSMC from SHR for 16 h with BQ123 significantly ($\approx 60\%$) attenuated the enhanced expression of Gq α whereas it was completely inhibited by losartan. In addition, the increased protein expression of PLC β 1 proteins in VSMC from SHR was also significantly inhibited by $\approx 60\%$ and $\approx 70\%$ respectively by 16 h treatment with BQ123 and losartan (Fig.5B). On the other hand, BQ788 had no significant effect on the expression of Gq α and PLC β 1 proteins. In addition, shorter period of treatment (45 min) with antagonists did not have any significant effect on the enhanced expression of Gq α (Fig.6A) or PLC β 1 (Fig.6B) in VSMC from SHR. Furthermore, these antagonists did not have any significant effect on the levels of Gq α /PLC β 1 proteins in VSMC from WKY rats.

To further investigate if the enhanced protein synthesis in VSMC from SHR is also attributed to the enhanced levels of endogenous Ang II and ET-1, the effects of losartan, BQ123 and BQ788 were examined on protein synthesis in VSMC from SHR and WKY rats. Results shown in (Fig.5C) indicate that the enhanced protein synthesis exhibited by VSMC

from SHR was attenuated to control level by losartan and BQ123 whereas BQ788 did not have any significant effect on protein synthesis. On the other hand, these antagonists were ineffective in attenuating the protein synthesis in VSMC from WKY rats.

Role of MAPK on enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis in VSMC from SHR

Since MAP kinase pathway has been implicated in the regulation of protein synthesis (14), it was desirable to investigate the role of MAPK signaling in the enhanced protein synthesis in VSMC from SHR. To test this, the effect of PD98059 (MAPK/ERK kinase inhibitor) on the protein synthesis was examined in VSMC from SHR. Results shown in Fig.7A indicate that the treatment of VSMC from SHR with PD98059 at 10 μ M and 20 μ M significantly inhibited the enhanced protein synthesis in VSMC from SHR by about 30 % and 80 % respectively. On the other hand, PD98059 did not have any significant effect on the protein synthesis in VSMC from WKY rats.

We further examined the role of MAPK signaling in the enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins in VSMC from SHR. To test this, the effect of PD98059 (MAPK/ERK kinase inhibitor) on the expression of Gq α /PLC β 1 proteins was examined in VSMC from SHR. Results shown in Fig.7B indicate that the treatment of VSMC from SHR with PD98059 at 10 μ M and 20 μ M significantly inhibited the enhanced expression of Gq α proteins by about 60 % and 80 % respectively. In addition, the increased protein expression of PLC β 1 proteins was also significantly inhibited by PD98059 at 10 μ M and 20 μ M by \approx 70% and \approx 85 % respectively (Fig.7C). On the other hand, PD98059 did not have any significant effect on the expression of Gq α and PLC β 1 protein in VSMC from WKY rats.

To further investigate if the ERK1/2 phosphorylation is also augmented in VSMC from SHR and whether this augmented phosphorylation of ERK1/2 is attributed to the enhanced levels of endogenous Ang II and ET-1, the effects of losartan, BQ123 and BQ788 were examined on ERK1/2 phosphorylation in VSMC from SHR and the results are shown in Fig.7D. The phosphorylation of ERK1/2 was significantly augmented by $\approx 80\%$ in VSMC from SHR as compared to WKY and was restored to control levels by losartan and BQ123, but not by BQ788. However, these treatments did not have any significant effect on ERK1/2 phosphorylation in VSMC from WKY rats.

DISCUSSION

The role of Gq α signaling in Ang II-induced VSMC hypertrophy has been demonstrated (40). We have earlier shown the implication of Gq α and MAP kinase/PI3Kinase signaling in A10 VSMC hypertrophy induced by vasoactive peptides (34). However, in the present study using animal model of pressure overload hypertrophy, we report for the first time that aortic VSMC from 16 week-old SHR that express cardiac hypertrophy, exhibit enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins. On the other hand, the expression of Gq α /PLC β 1 was not altered in VSMC from 12 week-old SHR that do not express cardiac hypertrophy. These results suggest that overexpression of vascular Gq α /PLC β 1 proteins may play a role in cardiac hypertrophy in SHR. In this regard, Keys et.al by using transgenic mice with vascular specific Gq inhibitor peptide (GqI) have shown the contribution of vascular Gq α -coupled signaling in the development of cardiac hypertrophy in response to chronic administration of GqPCR agonists (28).

We also show that the enhanced expression of Gq α protein in VSMC from 16 week-old SHR contribute to increased protein synthesis (vascular hypertrophy) as compared to WKY rats because the silencing of Gq α protein by specific siRNA or antisense attenuated the enhanced protein synthesis in VSMC from SHR. However, Gq α is not implicated in hyperproliferation (hyperplasia) of VSMC from SHR because knocking down of Gq α by antisense treatment did not attenuate the hyperproliferation of VSMC(4). Since knocking down of Gq α inhibited the protein synthesis by about 70-80%, it further suggests that other additional mechanisms may also contribute to the enhanced protein synthesis in 16 week-old SHR. We earlier reported that VSMC from SHR exhibit enhanced expression of Gi α protein which was implicated in protein synthesis (33). Taken together, it may be possible that the

enhanced expression of $G_{i\alpha}$ protein may be the other mechanism contributing to the enhanced protein synthesis in 16 week-old SHR. This notion is further supported by our study showing that pertussis toxin treatment that inactivates $G_{i\alpha}$ proteins attenuated the enhanced protein synthesis in VSMC from 16 week-old SHR (unpublished data). On the other hand, the increased protein synthesis in VSMC from 12 week-old SHR may not be attributed to $G_{q\alpha}$ protein because the expression of $G_{q\alpha}$ was not altered in VSMC from 12 week-old-SHR and may be due to the enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins in 12 week-old SHR (31).

A role of PLC in norepinephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy has been shown (42). In the present study, we also report that U73122, an inhibitor of PLC, significantly attenuated the enhanced protein synthesis in VSMC from 16 week-old SHR and provide the first evidence that PLC activation may be directly involved in VSMC hypertrophy. Furthermore, we report for the first time that VSMC from 16 week-old SHR exhibit enhanced expression of $PLC\beta_1$ protein and the fact that silencing the $PLC\beta_1$ isoform with specific siRNA resulted in a significant reduction of protein synthesis in VSMC from SHR suggests its implication in protein synthesis. Our results showing that the inhibition of protein synthesis by silencing $PLC\beta_1$ by $PLC\beta_1$ siRNA was not further potentiated by PLC inhibitor, U73122 further suggests that $PLC\beta_1$ may be the major isoform implicated in protein synthesis. On the other hand, $PLC\beta_1$ does not appear to contribute to enhanced protein synthesis in VSMC from 12 week-old SHR because the expression of $PLC\beta_1$ did not augment in VSMC from 12 week-old SHR. To our knowledge, a direct role of $PLC\beta_1$ in VSMC hypertrophy has not been demonstrated previously. Thus, taken together, it may be suggested that $PLC\beta_1$ isoform is a mediator of VSMC hypertrophy after the establishment of hypertension in 16 week-old SHR.

Our results are in accordance with the other studies showing the upregulation of PLC β 1 in viable and scar heart tissue after myocardial infarction(26) and in hearts from volume overload induced cardiac hypertrophy(11). In addition, Filtz et.al have also reported the role of PLC β 1b in Gq-induced cardiomyocyte hypertrophy(15). The over-expression of Gq α and PLC β 1 proteins in VSMC from 16 week-old SHR appears to be at the transcriptional level because actinomycin D, an inhibitor of RNA synthesis, inhibited the enhanced expression level of Gq α /PLC β 1 proteins in VSMC from SHR. Furthermore, we showed for the first time the implication of transcription factors AP1 and NF κ B in enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins in SHR because curcumin and helenalin, selective inhibitors of AP1 and NF κ B attenuated the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 in VSMC from SHR.

We also examined the possible mechanism by which the expression of Gq α and PLC β 1 proteins is upregulated in VSMC from SHR. We showed that endogenous Ang II and ET-1, important factors of vascular hypertrophy (6, 10, 19, 32) and whose levels are augmented in VSMC from SHR (18, 37), contribute to the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and hypertrophy of VSMC from 16 week-old SHR. This is supported by our results showing that AT1 receptor antagonist, losartan, and ET_A receptor antagonist, BQ123, attenuated the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and hypertrophy of VSMC from SHR to WKY levels and suggest that these effects may be mediated by an autocrine production of Ang II and ET-1. On the other hand, the ET_B receptor may not be implicated in the enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and associated cell hypertrophy in VSMC from SHR induced by endogenous ET-1 because the blockade of ET_B receptor with BQ788 did not attenuate significantly the enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and the

enhanced protein synthesis in VSMC from SHR. Thus, taken together, it may be suggested that endogenous ET-1 and Ang II through the activation of ET_A and AT1 receptor respectively induce the hypertrophic response by increasing the expression of Gq α and PLC β 1 proteins.

The role of MAPK signaling in hypertension and vascular hypertrophy has been well established (29, 44, 45). Furthermore, treatment of various cell types including VSMC with Ang II and ET-1 has been reported to activate ERK1/2 phosphorylation (9, 25, 44). In this study, we also report that the enhanced levels of endogenous ET-1 and Ang II augmented the phosphorylation of ERK1/2 in VSMC from SHR, because AT1 and ET_A receptors blockade by losartan and BQ123, respectively, attenuated the enhanced phosphorylation of ERK1/2 in VSMC from SHR but not in VSMC from WKY. Our results are in agreement with other investigators, who have shown that MAPK activity is inhibited by losartan and BQ123 in rat aorta (30). The fact that the inhibitor of MAP Kinase, PD98059, attenuated the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and VSMC hypertrophy further suggests a role of MAP kinase in the enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins in VSMC from SHR.

In conclusion, we provide the first evidence showing that the expression of Gq α and PLC β 1 proteins is enhanced in VSMC from 16 week-old SHR and not from 12 week-old SHR and result in VSMC hypertrophy. The enhanced levels of endogenous Ang II and ET-1 in VSMC from SHR, through the activation of AT1 and ET_A receptor respectively and MAPK signaling contribute to the overexpression of Gq α and PLC β 1 proteins and resultant enhanced protein synthesis (Fig.8). From these studies, it may be suggested that Gq α and PLC β 1 proteins may be used as the potential targets for the development of new therapies for the treatment of cardiovascular diseases.

FUNDING

This study was supported by a grant from Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP -53074).

DISCLOSURES

None declared.

REFERENCES

1. **Akhter SA, Luttrell LM, Rockman HA, Iaccarino G, Lefkowitz RJ, and Koch WJ.** Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science* 280: 574-577, 1998.
2. **Akhter SA, Milano CA, Shotwell KF, Cho MC, Rockman HA, Lefkowitz RJ, and Koch WJ.** Transgenic mice with cardiac overexpression of alpha1B-adrenergic receptors. In vivo alpha1-adrenergic receptor-mediated regulation of beta-adrenergic signaling. *J Biol Chem* 272: 21253-21259, 1997.
3. **Anand-Srivastava MB, Franks DJ, Cantin M, and Genest J.** Presence of "Ra" and "P"-site receptors for adenosine coupled to adenylate cyclase in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 108: 213-219, 1982.
4. **Atef ME, and Anand-Srivastava MB.** Enhanced Expression of G(alpha)q and PLC{beta}1 in Aortic Vascular Smooth Muscle Cells from Spontaneously Hypertensive Rats: Role of Endogenous Angiotensine II and Endothelin-1 (Abstract). *FASEB J* 25: 1009.1009, 2011.
5. **Balasubramanian S, and Eckert RL.** Curcumin suppresses API transcription factor-dependent differentiation and activates apoptosis in human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 282: 6707-6715, 2007.
6. **Berk BC, Vekshtein V, Gordon HM, and Tsuda T.** Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 13: 305-314, 1989.
7. **Berridge MJ.** Inositol trisphosphate as a second messenger in signal transduction. *Ann N Y Acad Sci* 494: 39-51, 1987.
8. **Bogoyevitch MA, Andersson MB, Gillespie-Brown J, Clerk A, Glennon PE, Fuller SJ, and Sugden PH.** Adrenergic receptor stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade and cardiac hypertrophy. *Biochem J* 314 (Pt 1): 115-121, 1996.
9. **Chen QW, Edvinsson L, and Xu CB.** Role of ERK/MAPK in endothelin receptor signaling in human aortic smooth muscle cells. *BMC Cell Biol* 10: 52, 2009.
10. **Dao HH, Bouvet C, Moreau S, Beaucage P, Lariviere R, Servant MJ, de Champlain J, and Moreau P.** Endothelin is a dose-dependent trophic factor and a mitogen in small arteries in vivo. *Cardiovasc Res* 71: 61-68, 2006.

11. **Dent MR, Dhalla NS, and Tappia PS.** *Phospholipase C gene expression, protein content, and activities in cardiac hypertrophy and heart failure due to volume overload. Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H719-727, 2004.
12. **Descorbeth M, and Anand-Srivastava MB.** *High glucose increases the expression of Gq/11alpha and PLC-beta proteins and associated signaling in vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H2135-2142, 2008.
13. **Dorn GW, 2nd, Tepe NM, Wu G, Yatani A, and Liggett SB.** *Mechanisms of impaired beta-adrenergic receptor signaling in G(alphaq)-mediated cardiac hypertrophy and ventricular dysfunction. Mol Pharmacol* 57: 278-287, 2000.
14. **Duff JL, Berk BC, and Corson MA.** *Angiotensin II stimulates the pp44 and pp42 mitogen-activated protein kinases in cultured rat aortic smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun* 188: 257-264, 1992.
15. **Filtz TM, Grubb DR, McLeod-Dryden TJ, Luo J, and Woodcock EA.** *Gq-initiated cardiomyocyte hypertrophy is mediated by phospholipase Cbeta1b. Faseb J* 23: 3564-3570, 2009.
16. **Frantz S, Fraccarollo D, Wagner H, Behr TM, Jung P, Angermann CE, Ertl G, and Bauersachs J.** *Sustained activation of nuclear factor kappa B and activator protein 1 in chronic heart failure. Cardiovasc Res* 57: 749-756, 2003.
17. **Frey UH, Lieb W, Erdmann J, Savidou D, Heusch G, Leineweber K, Jakob H, Hense HW, Lowel H, Brockmeyer NH, Schunkert H, and Siffert W.** *Characterization of the GNAQ promoter and association of increased Gq expression with cardiac hypertrophy in humans. Eur Heart J* 29: 888-897, 2008.
18. **Fukuda N, Satoh C, Hu WY, Soma M, Kubo A, Kishioka H, Watanabe Y, Izumi Y, and Kanmatsuse K.** *Production of angiotensin II by homogeneous cultures of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1210-1217, 1999.
19. **Geisterfer AA, Peach MJ, and Owens GK.** *Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. Circ Res* 62: 749-756, 1988.
20. **Hein L, Stevens ME, Barsh GS, Pratt RE, Kobilka BK, and Dzau VJ.** *Overexpression of angiotensin AT1 receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype*

associated with myocyte hyperplasia and heart block. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6391-6396, 1997.

21. **Hernandez-Presa M, Bustos C, Ortego M, Tunon J, Renedo G, Ruiz-Ortega M, and Egido J.** Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* 95: 1532-1541, 1997.
22. **Hsieh HL, Sun CC, Wu CB, Wu CY, Tung WH, Wang HH, and Yang CM.** Sphingosine 1-phosphate induces EGFR expression via Akt/NF-kappaB and ERK/AP-1 pathways in rat vascular smooth muscle cells. *J Cell Biochem* 103: 1732-1746, 2008.
23. **Hubbard KB, and Hepler JR.** Cell signalling diversity of the Gqalpha family of heterotrimeric G proteins. *Cell Signal* 18: 135-150, 2006.
24. **Ichikawa KI, Hidai C, Okuda C, Kimata SI, Matsuoka R, Hosoda S, Quertermous T, and Kawana M.** Endogenous endothelin-1 mediates cardiac hypertrophy and switching of myosin heavy chain gene expression in rat ventricular myocardium. *J Am Coll Cardiol* 27: 1286-1291, 1996.
25. **Izawa Y, Yoshizumi M, Fujita Y, Ali N, Kanematsu Y, Ishizawa K, Tsuchiya K, Obata T, Ebina Y, Tomita S, and Tamaki T.** ERK1/2 activation by angiotensin II inhibits insulin-induced glucose uptake in vascular smooth muscle cells. *Exp Cell Res* 308: 291-299, 2005.
26. **Ju H, Zhao S, Tappia PS, Panagia V, and Dixon IM.** Expression of Gq alpha and PLC-beta in scar and border tissue in heart failure due to myocardial infarction. *Circulation* 97: 892-899, 1998.
27. **Kawaguchi H, Sano H, Iizuka K, Okada H, Kudo T, Kageyama K, Muramoto S, Murakami T, Okamoto H, Mochizuki N, and et al.** Phosphatidylinositol metabolism in hypertrophic rat heart. *Circ Res* 72: 966-972, 1993.
28. **Keys JR, Greene EA, Koch WJ, and Eckhart AD.** Gq-coupled receptor agonists mediate cardiac hypertrophy via the vasculature. *Hypertension* 40: 660-666, 2002.
29. **Kubo T, Ibusuki T, Chiba S, Kambe T, and Fukumori R.** Mitogen-activated protein kinase activity regulation role of angiotensin and endothelin systems in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 411: 27-34, 2001.

30. **Kubo T, Saito E, Hanada M, Kambe T, and Hagiwara Y.** Evidence that angiotensin II, endothelins and nitric oxide regulate mitogen-activated protein kinase activity in rat aorta. *Eur J Pharmacol* 347: 337-346, 1998.
31. **Lappas G, Daou GB, and Anand-Srivastava MB.** Oxidative stress contributes to the enhanced expression of Gialpha proteins and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 23: 2251-2261, 2005.
32. **Li JS, Lariviere R, and Schiffrin EL.** Effect of a nonselective endothelin antagonist on vascular remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Evidence for a role of endothelin in vascular hypertrophy. *Hypertension* 24: 183-188, 1994.
33. **Li Y, Boudaou G, and Anand-Srivastava MB.** Enhanced expression of G α proteins in SHR contributes to the enhanced proliferation of vascular smooth muscle cells: implication of MAPK/PI3K signalling pathway (Abstract). *Can J Cardiol* 21: 155C, 2005.
34. **Li Y, Hashim S, and Anand-Srivastava MB.** Intracellular peptides of natriuretic peptide receptor-C inhibit vascular hypertrophy via Gqalpha/MAP kinase signaling pathways. *Cardiovasc Res* 72: 464-472, 2006.
35. **Liau G, and Chan LM.** Regulation of extracellular matrix RNA levels in cultured smooth muscle cells. Relationship to cellular quiescence. *J Biol Chem* 264: 10315-10320, 1989.
36. **Lin CC, Lin WN, Wang WJ, Sun CC, Tung WH, Wang HH, and Yang CM.** Functional coupling expression of COX-2 and cPLA2 induced by ATP in rat vascular smooth muscle cells: role of ERK1/2, p38 MAPK, and NF-kappaB. *Cardiovasc Res* 82: 522-531, 2009.
37. **Lu MH, Chao CF, Huang CG, and Chang LT.** Coculture of vascular endothelial cells and smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 25: 413-425, 2003.
38. **Milano CA, Dolber PC, Rockman HA, Bond RA, Venable ME, Allen LF, and Lefkowitz RJ.** Myocardial expression of a constitutively active alpha 1B-adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10109-10113, 1994.
39. **Neves SR, Ram PT, and Iyengar R.** G protein pathways. *Science* 296: 1636-1639, 2002.

40. **Ohtsu H, Higuchi S, Shirai H, Eguchi K, Suzuki H, Hinoki A, Brailoiu E, Eckhart AD, Frank GD, and Eguchi S.** Central role of Gq in the hypertrophic signal transduction of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 149: 3569-3575, 2008.
41. **Sakata Y, Hoit BD, Liggett SB, Walsh RA, and Dorn GW, 2nd.** Decomensation of pressure-overload hypertrophy in G alpha q-overexpressing mice. *Circulation* 97: 1488-1495, 1998.
42. **Singal T, Dhalla NS, and Tappia PS.** Phospholipase C may be involved in norepinephrine-induced cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 320: 1015-1019, 2004.
43. **Smrcka AV, Hepler JR, Brown KO, and Sternweis PC.** Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science* 251: 804-807, 1991.
44. **Touyz RM, He G, El Mabrouk M, Diep Q, Mardigyan V, and Schiffrin EL.** Differential activation of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 and p38 mitogen activated-protein kinase by AT1 receptors in vascular smooth muscle cells from Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 19: 553-559, 2001.
45. **Xu Q, Liu Y, Gorospe M, Udelsman R, and Holbrook NJ.** Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall. *J Clin Invest* 97: 508-514, 1996.
46. **Yang JM, Cho CH, Kong KA, Jang IS, Kim HW, and Juhnn YS.** Increased expression of Galphaq protein in the heart of streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Mol Med* 31: 179-184, 1999.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. The expression of Gq α , G11 α and PLC β 1 proteins and protein synthesis in aortic VSMC from 12 and 16 week-old SHR and age-matched WKY rats. Cell lysates were subjected to Western blot analysis using specific antibodies against Gq α (A, top panel), G11 α (B, top panel) and PLC β 1(C, top panel) as described in "Methods". The protein bands were quantified by densitometric scanning (A, B, C, bottom panels). The values are means \pm SEM of 3 separate experiments. ** P < 0.01. D, Protein synthesis was determined by [3 H]-leucine incorporation to the cells as described in "Methods". Results are expressed as percentage of control, taken as 100%. Values are means \pm SEM of 5 separate experiments. * < 0.05 vs. 12 week-old WKY rats; ## P < 0.01 vs. 16 week-old WKY.

Figure 2. (A,B). Effect of actinomycin D on the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins in aortic VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY rats. Confluent VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY rats were incubated in the presence or absence of actinomycin D (5 μ M) for 16 h. The cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against Gq α (A) and PLC β 1 (B) (upper panels) as described in "Methods". The protein bands were quantified by densitometric scanning (A and B, lower panels). Results are expressed as a percentage of control taken as 100%. Values are means \pm SEM of 3 separate experiments. **P < 0.01 vs. WKY rats; ## P < 0.01 vs. SHR.

(C,D). Effect of curcumin and helenalin on the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins in aortic VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY rats. Confluent VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY rats were incubated in the absence or presence of curcumin (1 μ M) and helenalin (1 μ M) for 16 hours. Cell lysates were prepared

and subjected to Western blot analysis using specific antibodies against Gq α (C) and PLC β 1 (D). Results are expressed as 100% of WKY control. Values are means \pm SEM of 3 separate experiments. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. WKY rats; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. SHR.

Figure 3. Effect of the knockdown of Gq α on protein synthesis in VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY rats. Confluent VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY rats were incubated in the absence or presence of Gq α AS-ODN (5 μ M) for 24 h and Gq α -siRNA for 12 h. Cell lysates were prepared and subjected to Western blot analysis as described in "Methods" (A and C, top panels). The protein bands were quantified by densitometric scanning (A and C, bottom panels) and protein synthesis was determined by 3 H-leucine incorporation (B and D) as described in "Methods". Results are expressed as a percentage of control taken as 100%. Values are means \pm SE of 4 separate experiments. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. WKY rats; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. SHR.

Figure 4. (A) Effect of the inhibition of PLC on protein synthesis in VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY rats. Confluent VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY rats were incubated in the absence or presence of U73122 (5 μ M) for 24 h. 3 H-leucine incorporation was measured as described in "Methods". Results are expressed as % of WKY control (CTL; taken as 100%); Values are means \pm SE of 4 separate experiments. ** $P < 0.01$ vs. WKY rats; ## $P < 0.01$ vs. SHR. **(B, C) Effect of the knockdown of PLC β 1 on the expression of PLC β 1 protein and protein synthesis in VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY rats.** Confluent VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY rats were incubated in the absence or presence of PLC β 1-siRNA for 12 h. A scramble siRNA was used as a negative control. Cell lysates were

prepared and subjected to Western blot analysis using specific antibody against PLC β 1(B). Protein synthesis was determined by [3 H]-leucine incorporation (C). Results are expressed as a percentage of control taken as 100%; Values are means \pm SE of 4 separate experiments. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. WKY rats; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. SHR. **(D) Effect of PLC inhibitor on protein synthesis in PLC β 1-silenced VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY rats.** Confluent PLC β 1-silenced VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY rats were further incubated in the absence or presence of U73122 (5 μ M) for 24 h. Protein synthesis was determined by 3 H-leucine incorporation as described in "Methods". Results are expressed as % of WKY control (CTL; taken as 100%); Values are means \pm SE of 3 separate experiments. *** $P < 0.001$ vs. WKY rats; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.01$ vs. SHR.

Figure 5. Effect of antagonists of ET $_A$, ET $_B$ and AT1 on the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and protein synthesis in VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY. Confluent VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY rats were incubated in the absence or presence of BQ123 (1 μ M), BQ788 (1 μ M) and Losartan (10 μ M) for 16 h. Cell lysates were prepared and subjected to Western blot analysis using specific antibodies against Gq α (A) and PLC β 1 (B) and protein synthesis in VSMC (control and treated) was determined by 3 H-leucine incorporation (C). Results are expressed as 100% of WKY control. Values are means \pm SEM of 4 separate experiments. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. WKY rats; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. SHR.

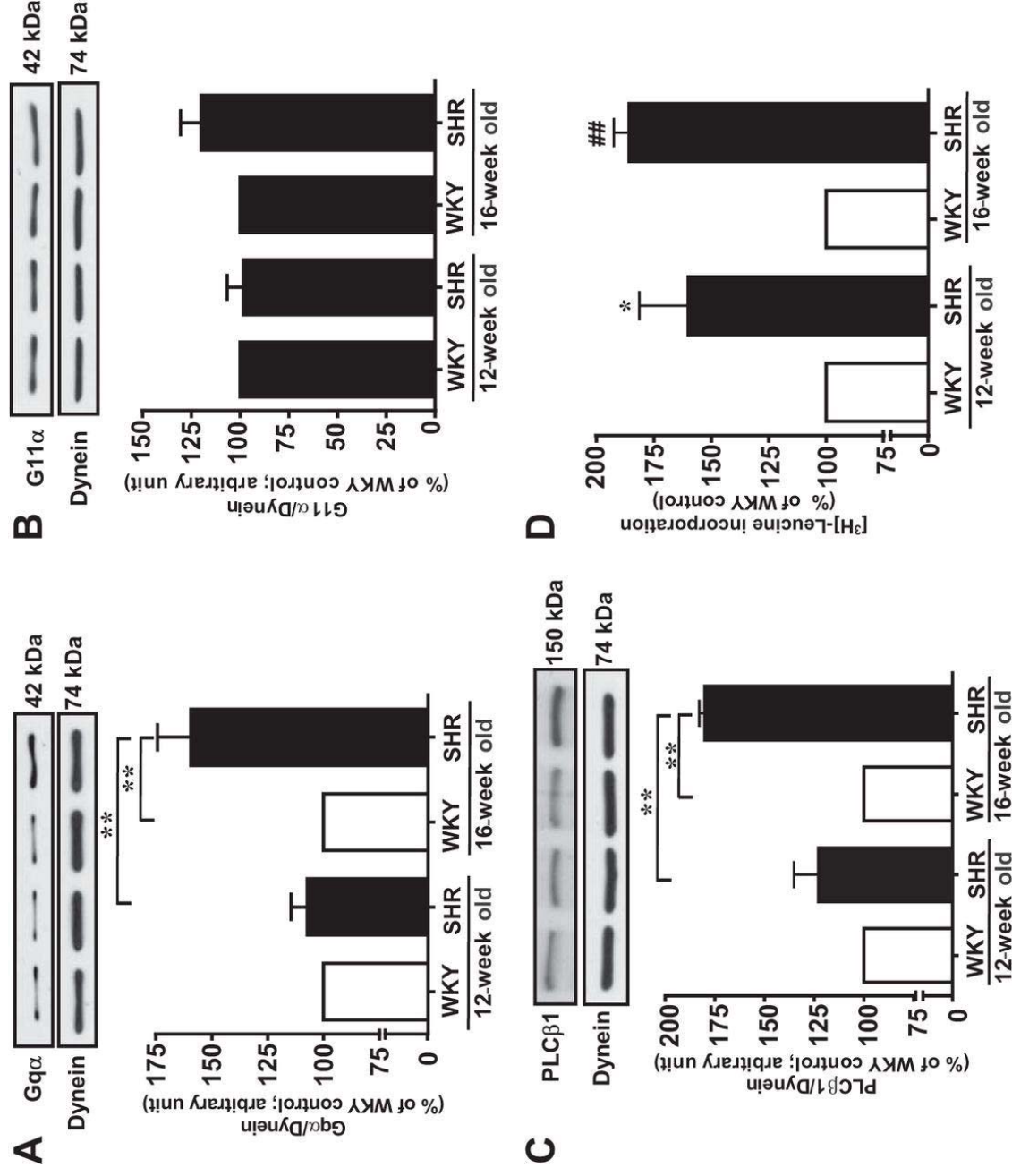
Figure 6. Effect of shorter period of treatment with antagonists of ET_A, ET_B and AT1 on the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins in VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY Confluent VSMC from 16 week-old SHR and WKY rats were incubated in the absence or presence of BQ123 (1 μ M), BQ788 (1 μ M) and Losartan (10 μ M) for 45 min. Cell lysates were prepared and subjected to Western blot analysis using specific antibodies against Gq α (A) and PLC β 1 (B). Results are expressed as 100% of WKY control. Values are means \pm SEM of 3 separate experiments. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. WKY rats.

Figure 7. Effect of MAPK inhibitor on the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins proteins and protein synthesis in VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY rats. Confluent VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY rats were incubated in the absence or presence of PD98059 (10 μ M; 20 μ M) for 16 hours. Protein synthesis was determined by ³H-leucine incorporation (A). Cell lysates were prepared and subjected to Western blot analysis using specific antibodies against Gq α (B) and PLC β 1 (C). Results are expressed as 100% of WKY control. Values are means \pm SEM of 5 separate experiments. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. WKY rats; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. SHR. **Effect of antagonists of ET_A, ET_B and AT1 on ERK1/2 phosphorylation (p) in VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY.** Confluent VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY rats were incubated in the absence or presence of BQ123 (1 μ M), BQ788 (1 μ M) and Losartan (10 μ M) for 16 h. Cell lysates were prepared and subjected to Western blot analysis using specific antibodies against pERK and total ERK (D) as described in "Methods". Results are expressed as a percentage of control taken as 100%.

Values are means \pm SEM of 4 separate experiments. ** $P < 0.01$ vs. WKY rats; ## $P < 0.01$ vs. SHR.

Figure 8. The possible intracellular signaling mechanisms implicated in the enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and VSMC hypertrophy. The enhanced levels of endogenous Ang II and ET-1 in VSMC from 16 week-old SHR, through the activation of AT1 and ET_A receptor respectively activate MAPK signaling which increase the expression of Gq α and PLC β 1 proteins and result in enhanced protein synthesis.

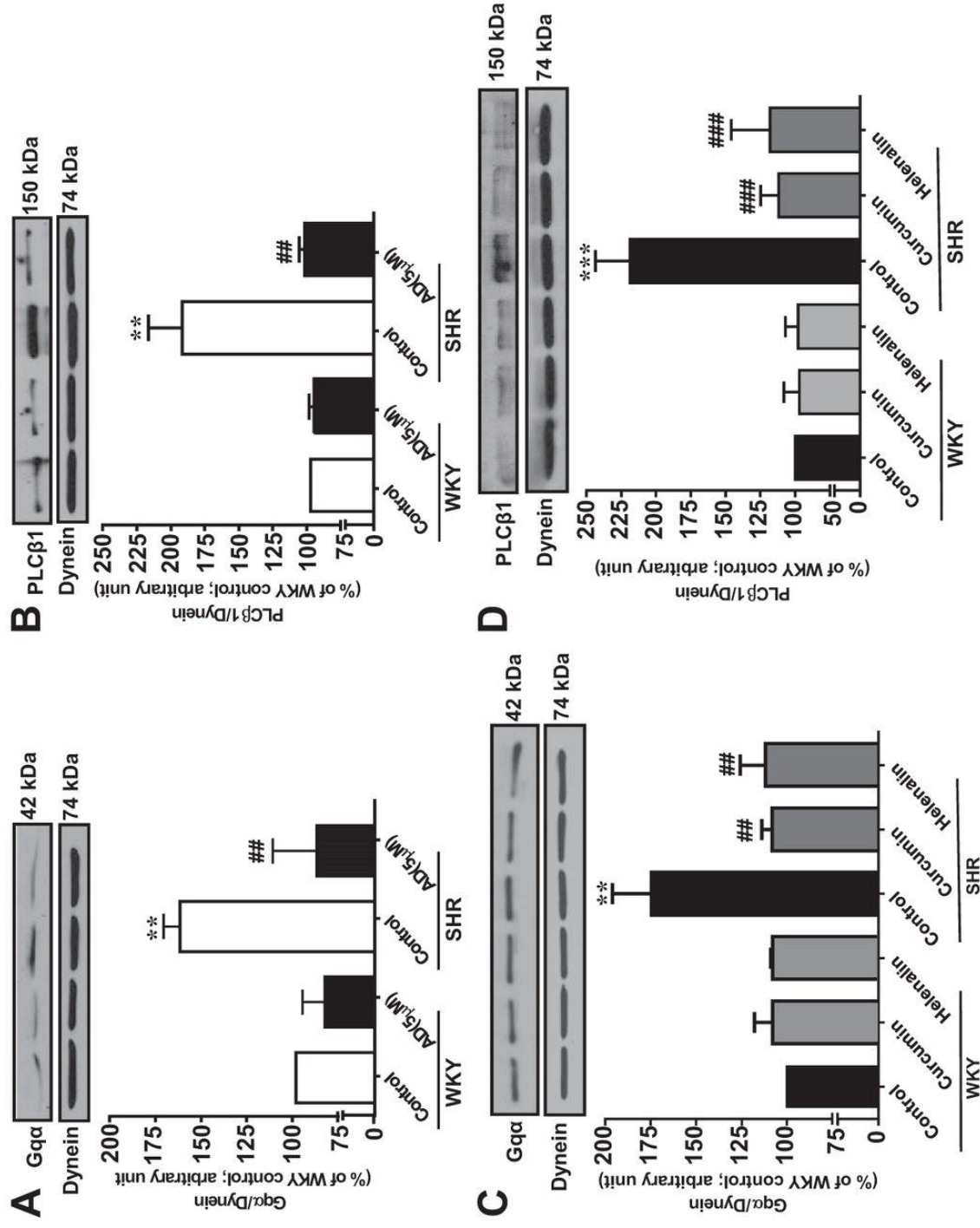
The expression of Gq α , G11 α , and PLC- β 1 proteins and protein synthesis in aortic vascular smooth muscle cells (VSMC) from 12- and 16-wk-old spontaneously hypertensive rats (SHR) and age-matched Wistar-Kyoto (WKY) rats.



Mohammed Emehdi Atef, and Madhu B. Anand-Srivastava
Am J Physiol Cell Physiol 2014;307:C97-C106

AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY
Cell Physiology

A and B: effect of actinomycin D (AD) on the enhanced expression of G α and PLC- β 1 proteins in aortic VSMC from 16-wk-old SHR and age-matched WKY rats.



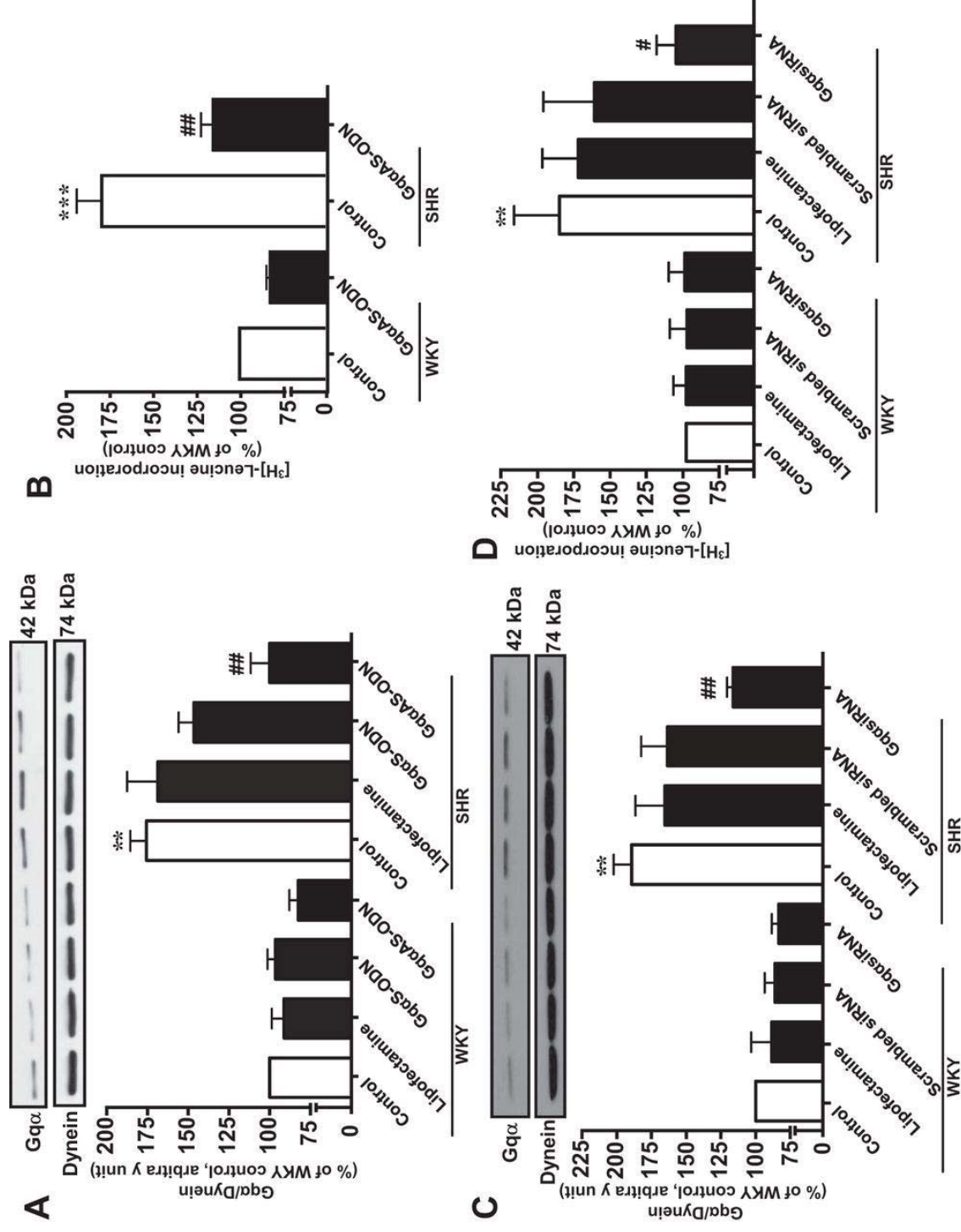
Mohammed Emehdi Atef, and Madhu B. Anand-Srivastava

Am J Physiol Cell Physiol 2014;307:C97-C106

AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY

Cell Physiology

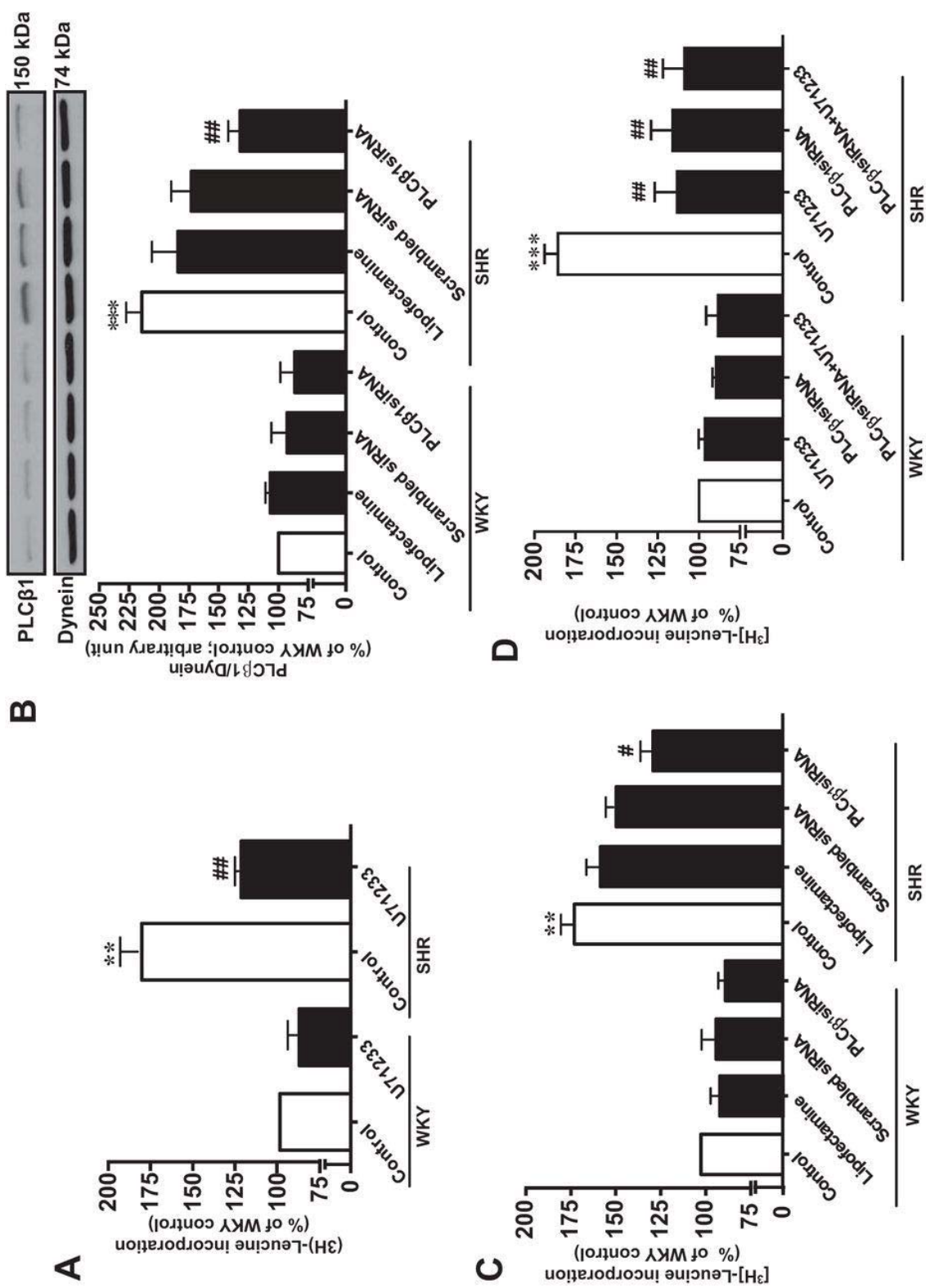
Effect of the knockdown of Gq α on protein synthesis in VSMC from 16-wk-old SHR and age-matched WKY rats.



Mohammed Emehdi Atef, and Madhu B. Anand-Srivastava
Am J Physiol Cell Physiol 2014;307:C97-C106

AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY
Cell Physiology

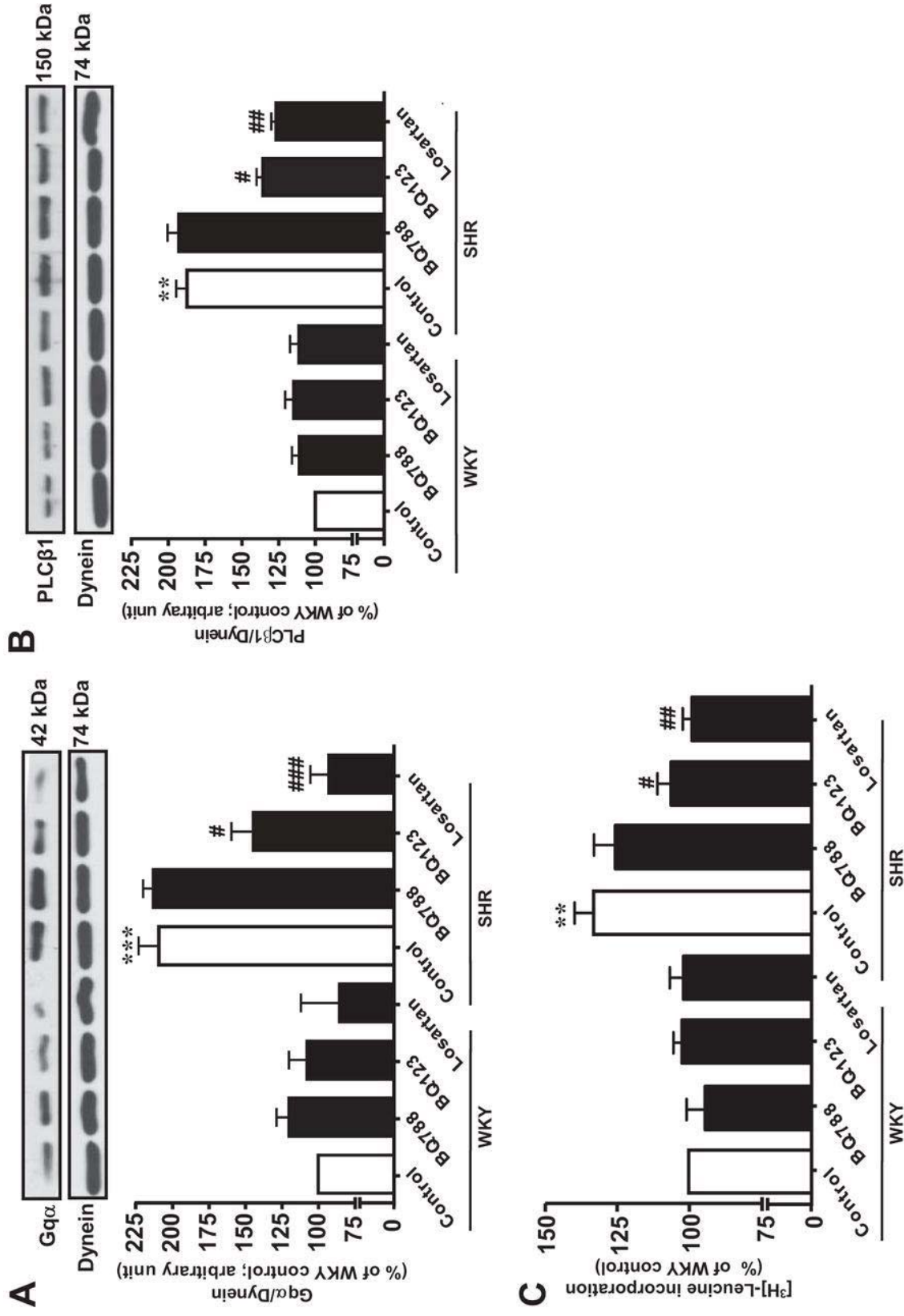
A: effect of the inhibition of PLC on protein synthesis in VSMC from 16-wk-old SHR and age-matched WKY rats.



Mohammed Emehdi Atef, and Madhu B. Anand-Srivastava
Am J Physiol Cell Physiol 2014;307:C97-C106

AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY
Cell Physiology

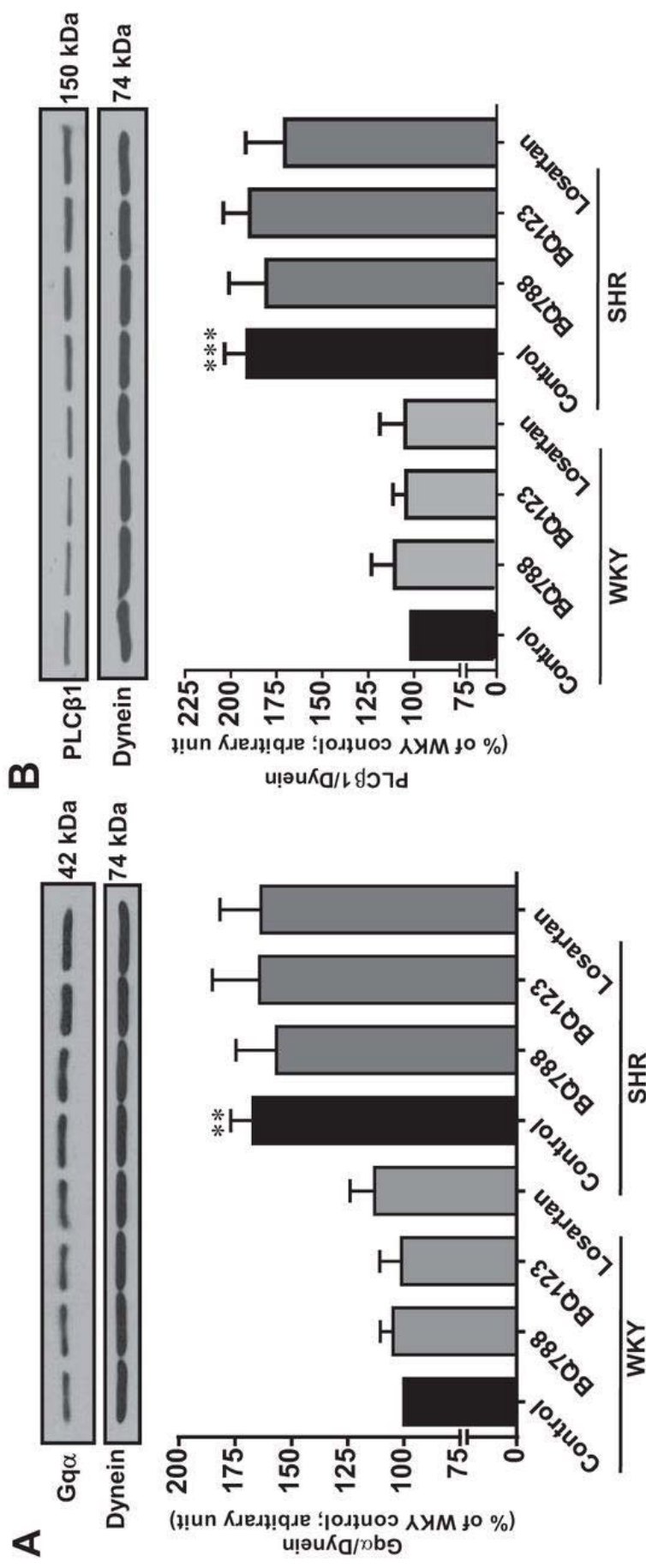
Effect of antagonists of endothelin (ET) receptors ETA and ETB and AT1 on the enhanced expression of Gq α and PLC- β 1 proteins and protein synthesis in VSMC from 16-wk-old SHR and age-matched WKY. Confluent VSMC from 16-wk-old SHR and age-matched WKY rats wer...



Mohammed Emehdi Atef, and Madhu B. Anand-Srivastava
Am J Physiol Cell Physiol 2014;307:C97-C106

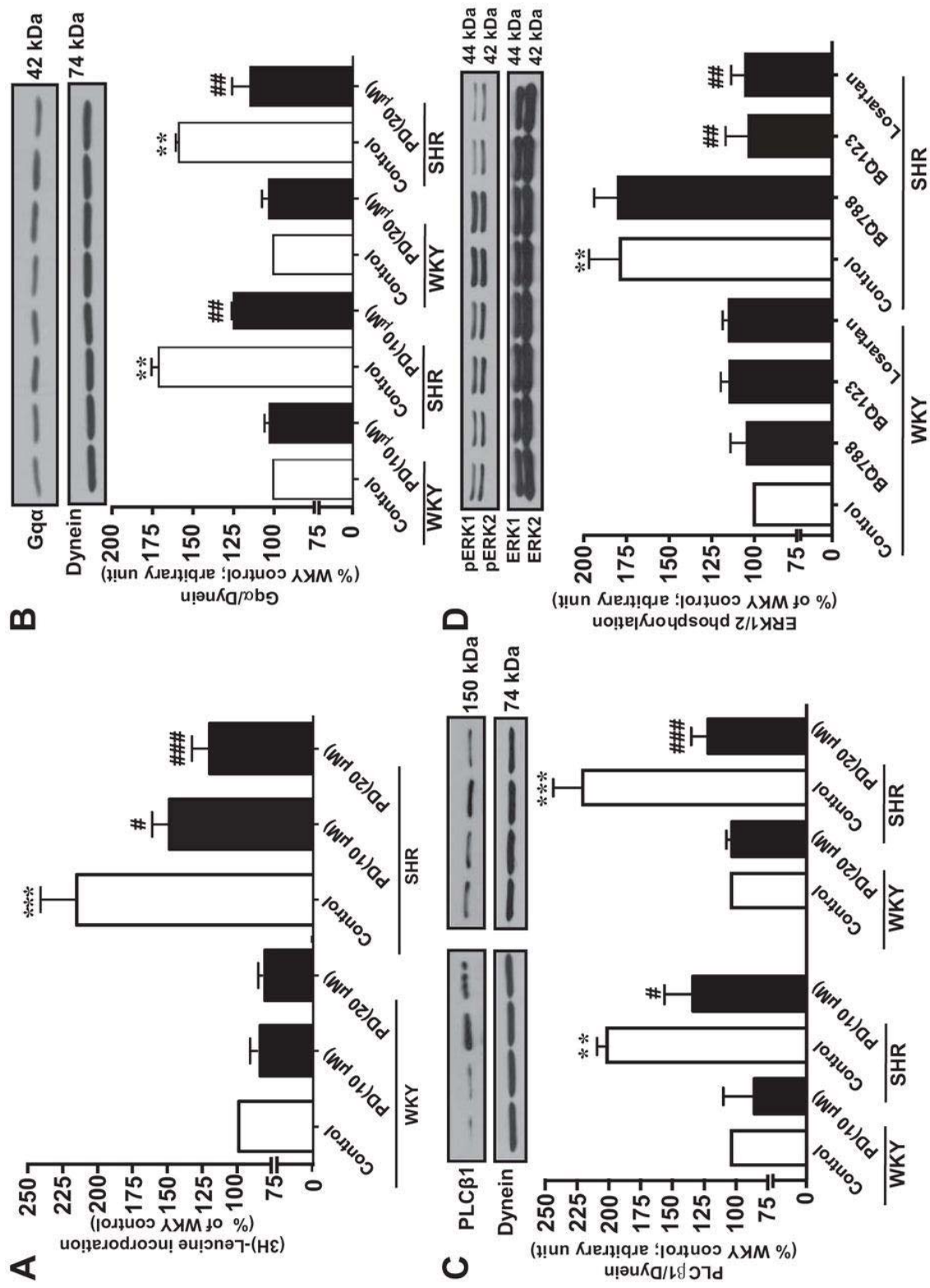
AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY
Cell Physiology

Effect of shorter period of treatment with antagonists of ETA, ETB, and AT1 on the enhanced expression of G α and PLC- β 1 proteins in VSMC from 16-wk-old SHR and age-matched WKY Confluent VSMC from 16-wk-old SHR and WKY rats were incubated in the absence or ...



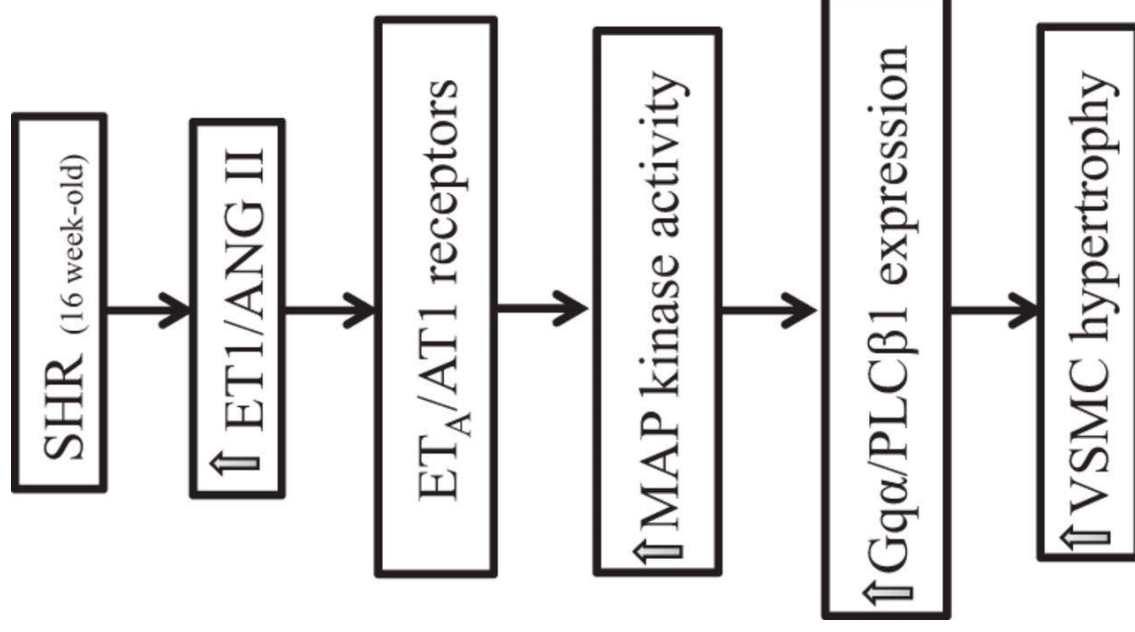
Mohammed Emehdi Atef, and Madhu B. Anand-Srivastava
 Am J Physiol Cell Physiol 2014;307:C97-C106

Effect of MAPK inhibitor on the enhanced expression of Gαq and PLC-β1 proteins and protein synthesis in VSMC from 16-wk-old SHR and age-matched WKY rats.



Mohammed Emehdi Atef, and Madhu B. Anand-Srivastava
 Am J Physiol Cell Physiol 2014;307:C97-C106

The possible intracellular signaling mechanisms implicated in the enhanced expression of Gq α /PLC- β 1 proteins and VSMC hypertrophy.



Mohammed Emehdi Atef, and Madhu B. Anand-Srivastava
Am J Physiol Cell Physiol 2014;307:C97-C106

AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY

Cell Physiology

Oxidative stress contributes to the enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and hypertrophy of VSMC from SHR: role of growth factor receptors transactivation

*Mohammed Emehdi Atef and Madhu B. Anand-Srivastava**

Department of Molecular and Integrative Physiology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Running Head: Oxidative stress and VSMC hypertrophy

*Address correspondence to:

Dr. Madhu B. Anand-Srivastava,
Department of Molecular and Integrative Physiology,
Faculty of Medicine,
University of Montreal,
C.P. 6128, Succ. Centre-ville,
Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7,
Tel : (514)343-2091
Fax: (514)343-2111

American Journal of Physiology-Heart and circulatory physiology: Published

Abstract

We showed previously that vascular smooth muscle cells (VSMC) from spontaneously hypertensive rats (SHR) exhibit enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins which contribute to increased protein synthesis through the activation of MAP kinase signalling. Since oxidative stress has been shown to be increased in hypertension, we undertook the present study to examine the role of oxidative stress in enhanced expression of Gq α / PLC β 1 proteins and VSMC hypertrophy and explored the underlying mechanisms responsible for this response. Protein expression was determined by Western blotting whereas protein synthesis and cell volume, markers for VSMC hypertrophy were determined by [³H]-leucine incorporation and 3D confocal imaging respectively. The increased expression of Gq α /PLC β 1 proteins, increased protein synthesis and augmented cell volume exhibited by VSMC from SHR were significantly attenuated by antioxidants N-acetylcysteine (NAC), a scavenger of superoxide anion, DPI, an inhibitor of NAD(P)H oxidase. In addition, PP2, AG1024, AG1478 and AG1295, inhibitors of c-Src, IGFR, EGFR and PDGFR respectively also attenuated the enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis in VSMC from SHR towards control levels.. Furthermore, the levels of IGF-1R and EGFR proteins and not of PDGFR were also enhanced in VSMC from SHR which were attenuated significantly by NAC, DPI and PP2. In addition, NAC, DPI and PP2 also attenuated the enhanced phosphorylation of IGF-1R, PDGFR, EGFR, c-Src and EKR1/2 in VSMC from SHR. These data suggest that enhanced oxidative stress in VSMC from SHR activates c-Src which through the transactivation of growth factor receptors and MAPK signaling contributes to enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and resultant VSMC hypertrophy.

Key Words: Oxidative stress, Gq α /PLC β 1, VSMC, hypertrophy, SHR.

New and Noteworthy:

The present study reports for the first time that enhanced oxidative stress exhibited by VSMC from SHR through the activation of c-Src and growth factor receptors increase the activity of MAP kinase and contributes to enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and resultant VSMC hypertrophy.

Introduction

Hypertension is associated with vascular remodeling characterized by enhanced media to lumen ratio in arteries (29) and is attributed to hyperproliferation and hypertrophy of vascular smooth muscle cells (VSMC) (43). Several hormones including Ang II that increase blood pressure are also implicated in vascular remodeling by promoting VSMC proliferation and hypertrophy (4, 7, 10) through the activation of several signaling mechanisms including adenylyl cyclase/cAMP, phosphatidyl inositide, MAP kinase and tyrosine kinase pathways (17, 19, 38). These signaling mechanisms are regulated by guanine nucleotide regulatory proteins (G proteins). The G proteins are heterotrimeric proteins composed of three subunits (α , β , and γ). Two G proteins, stimulatory ($G_s\alpha$) and inhibitory ($G_i\alpha$) regulate adenylyl cyclase activity and cAMP levels whereas $G_q\alpha$ family of G proteins is subdivided into $G_q\alpha$, $G_{11\alpha}$, $G_{14\alpha}$, and $G_{16\alpha}$. The activation of $G_q\alpha$ by a G protein-coupled receptor (GPCR) stimulates phospholipase C- β (PLC- β), which hydrolyzes inositol biphosphate (PIP₂) and produces inositol 1,4,5-trisphosphate [Ins(1,4,5)P₃] (IP₃) and diacylglycerol (DAG) (22) and activates protein kinase C (PKC) (8, 42).

The implication of $G_q\alpha$ and MAPK/phosphatidylinositol 3-kinase signaling has been shown in vascular smooth muscle cell (VSMC) hypertrophy induced by vasoactive peptides in A10 VSMC (32). $G_q\alpha$ protein and associated signaling has also been shown to be involved in Ang II-induced VSMC hypertrophy (38). We have further shown that VSMC from 16 week-old and not from 12 week-old SHR exhibit enhanced expression of $G_q\alpha$ and PLC β 1 proteins which contribute to VSMC hypertrophy through the activation of MAP kinase signaling

pathway (4). The enhanced levels of Gq α and PLC β 1 proteins in VSMC from SHR were shown to be attributed to the enhanced levels of endogenous Ang II and ET-1 (4).

The generation of reactive oxygen species (ROS) that increases oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of many vascular diseases, such as hypertension, diabetes, atherosclerosis and vascular remodeling (6, 16, 23). The contribution of oxidative stress in hyperglycemia-induced enhanced expression of Gq α protein in VSMC has been reported (14). VSMC from SHR have been shown to exhibit enhanced oxidative stress due to the overproduction of superoxide anion (O₂⁻) and enhanced activity of NADPH oxidase as well as the enhanced expression of Nox1/Nox2/Nox4 and p47^{phox} subunits of NADPH oxidase (19, 34). We previously showed the implication of enhanced oxidative stress in enhanced expression of G α proteins in VSMC from SHR (2). Taken together, it may be possible that the increased oxidative stress exhibited by VSMC from SHR may also be a contributing factor in enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and resultant hypertrophy. The present study is therefore undertaken to examine the role of oxidative stress in enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and hypertrophy in VSMC from SHR and to further explore the underlying mechanisms responsible for this response.

We showed that enhanced oxidative stress exhibited by VSMC from SHR activates c-Src which through the transactivation of growth factor receptors and MAPK signaling contributes to enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and resultant enhanced protein synthesis.

MATERIALS AND METHODS

Materials

EGFR inhibitor AG1478, PDGFR inhibitor AG1295, IGF-1R inhibitor AG1028, free radicals scavenger N-acetyl-L-cysteine (NAC), c-Src inhibitor PP2, inactive analog for Src inhibitor PP3 and inhibitor of NADPH oxidase DPI were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (St-Louis, Missouri, USA). Leucine, L-[4,5-3H(N)] was purchased from Perkin Elmer (Boston, MA). Monoclonal Gq α antibody (10), monoclonal PLC- β 1 antibody (D-8), monoclonal (phospho)-ERK1/2 (phosphospecific-tyrosine204) antibody, polyclonal ERK1/2 antibody (C-14), monoclonal dynein IC1/2 antibody (74-1), and Western blotting reagents were from St Cruz biotech (Santa Cruz, CA, USA). Polyclonal (phospho)-EGFR antibody (phosphospecific-tyrosine1173), polyclonal (phospho)-PDGFR (phosphospecific-tyrosine 857) were from Calbiochem. Polyclonal EGFR, IGF-1R, (phospho)-c-Src (phosphospecific-tyrosine-419), PDGFR and (phospho)-IGF-1R (phosphospecific-tyrosine1165/1166) antibodies were from St Cruz biotech. Monoclonal anti- β -actin antibody (A5441) and all other chemicals used in these experiments were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Thermo Scientific™ Cellomics™ Whole Cell Stains was from fisher scientific.

Animals, cell culture and incubation

VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY rats were cultured as described previously (3). These cells were plated in 75-cm² flasks and incubated at 37°C in 95% air-5% CO₂ humidified atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (with glucose, L-glutamine, and sodium bicarbonate) containing 1% antibiotics (containing penicillin, streptomycin, and amphotrecin B) and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). Cells

were passaged upon reaching confluence with 0.5% trypsin and utilized between passages 2 and 8. Confluent cells were starved by incubation for 24 hours in DMEM without FBS at 37°C to have cell quiescence. For the receptor antagonist and antioxidant studies, VSMC from SHR and WKY were incubated for 16 hours in the absence or presence of NAC (10 mM), DPI (5 µM), AG1478 (5 µM), AG1295 (5 µM), AG1028 (5 µM), PP2 (1 µM) and PP3 (1 µM). After incubation, the cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in a 200 µl buffer containing 25 mM Tris·HCl (pH 7.5), 25 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/ml aprotinin, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate, and 0.5 µg/ml leupeptin on ice. The cell lysates were centrifuged at 12,000 g for 15 min at 4°C, and the supernatants were used for Western blot analysis. Cell viability was checked by the trypan blue exclusion technique and indicated that >90~95 % cells were viable. All the animal procedures used in the present study were approved by the Comité de Déontologie de l'Expérimentation sur les Animaux (CDEA) of the University of Montreal (#99050). The investigation conforms to the 'Guide for the Care and Use of Laboratory

Western blotting

The levels of protein expression and phosphorylation were determined by western blotting as described previously (4). After SDS-PAGE, the separated proteins were transferred to a nitrocellulose membrane with a semi-dry transblot apparatus (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario) at 15 V for 45 min (Gqα, c-Src and ERK1/2) or a liquid transfer apparatus (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario) at 100 V for 1h (PLCβ1, EGFR, IGF-1R and PDGFR). Membranes were blocked for 1 hour at room temperature with 5% dry milk and incubated overnight with specific antibodies against different proteins: (10) against Gqα,

(D-8) against PLC- β 1, E-4 against (phospho)-ERK1/2 (phosphospecific-tyrosine204) antibody, C-14 against ERK 1/2, phosphospecific Tyr¹¹⁷³ against p-EGFR, 1005 against EGFR, phosphospecific Tyr⁸⁵⁷ against pPDGFR, 958 against PDGFR, phosphospecific-tyrosine1165/1166 against pIGF-1R, C-20 against IGF-1R, phosphospecific-tyrosine-419 against pc-Src and 74-1 against dynein in PBS containing 0,1% Tween-20 overnight at 4°C. β -actin or dynein were used as loading controls. The antibody-antigen complexes were detected by incubating the membranes with horseradish peroxidase-conjugated antibodies for 1h at room temperature. The blots were then washed three times with PBS before reaction with enhanced chemiluminescence (ECL). Quantitative analysis of the proteins was performed by densitometric scanning of the autoradiographs using the enhanced laser densitometer LKB Ultrosan XL and quantified using the gel-scan XL evaluation software (version 2.1) from Pharmacia (Baie d'Urfé, Québec, Canada).

Transfection of VSMC with siRNA

For siRNA transfection efficiency, the manufacturer's protocol was followed. Briefly, VSMCs were seeded in a 12 well plate or petri dishes and cultured in antibiotic free normal growth medium supplemented with 10% FBS until the cells were 60% confluent (~48 hours). On the day of transfection, cells were washed with transfection medium (sc-36868) and incubated with 1ml of transfection reagent (sc-29528) containing 80 pmoles of either scrambled siRNA (sc-37007) or siRNA specific for c-Src or EGFR oligonucleotides for 12 hours. The medium was replaced with normal DMEM (containing 10 % FBS and 1% antibiotics) for an additional 24 h (90% confluence).

EGFR siRNA (r) sc-108050 is a pool of 3 different siRNA duplexes according to the following sequences: Sc-108050A: Sense: GCUGUGCGAUUUAGCAACAtt; Antisense: UGUUGCUAAAUCGCACAGCtt. Sc-108050B: Sense: CAAGCCCA CUUGAGGAUAUtt; Antisense: AUAUCCUCAAGUGGGCUUGtt. Sc-108050C: Sense: GAAGAGACCUGCAUUAUCAtt; Antisense: UGAUAAUGCAGGUCUCUU Ctt). c-Src siRNA (r) sc- 270199 is a pool of 2 different siRNA duplexes according to the following sequences: sc-270199A: Sense: GAUCACUAGACGGGAAUCAtt; Antisense: UGAUCCCCGUCUAGUGAUCtt. Sc-270199B: Sense: GCUUACUACUCCAAAC AUGtt; Antisense: CAUGUUUGGAGUAGUAAGCtt. All sequences are provided in 5'-3' orientation.

Determination of protein synthesis

VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY were grown to confluence in 12-well culture plates. Protein synthesis (Cell hypertrophy) was evaluated by [³H]-leucine incorporation into cells as described previously (32). Confluent cells were serum deprived for 24 hours to induce cell quiescence and were further incubated for 24 hours in the absence or presence of NAC (10 mM), DPI (5 μ M), AG1478 (5 μ M), AG1295 (5 μ M), AG1028 (5 μ M), PP2 (1 μ M) and PP3 (1 μ M). [³H]-leucine (2 μ Ci per well) was added at the same time as the inhibitors. For RNA interference studies, the cells were incubated in the absence or presence of siRNA against c-Src and EGFR. [³H]-leucine was added and further incubated for 24 h before the cells were harvested. The cells were rinsed twice with ice-cold 1X PBS and incubated with 5% TCA for 1 h at 4°C. After being washed twice with ice-cold 1X PBS, the cells were incubated with 0.4 N sodium hydroxide solution for 30 min at room temperature, and radioactivity was determined by liquid scintillation counter and adjusted by protein

concentration.

Cell volume measurement

VSMC from 16-week-old SHR and age-matched WKY were grown to 50% confluence in cell imaging dish (35 X 10 mm). Cells were serum deprived for 24 h to induce cell quiescence and were incubated for 16 h in the absence or presence of NAC (10 mM) and DPI (5 μ M). The cells were then washed twice and fixed with 10% formalin for 1 hour in 4°C and further incubated for 45 min at room temperature with whole cell stains reagent using Thermo Scientific™ Cellomics™ Whole Cell Stains (green). The volume of VSMC was evaluated by 3D live cell microscopy imaging by using Zeiss LSM-T-PMT 700 (Zen 2012), Objective Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC and 40x/1.40 Oil DIC. The 3D microscopy datasets interpretation was performed with the software Imaris (Bitplane).

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SEM. Comparisons between groups were made with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post-hoc test. A difference between groups was significant at $P < 0.05$.

Results

Implication of oxidative stress in enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis.

We have earlier shown that VSMC from SHR exhibit enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins that contribute to VSMC hypertrophy (4). Since VSMC from SHR have been shown to exhibit enhanced oxidative stress due to the enhanced levels of superoxide anion (O₂⁻) and NADPH oxidase activity (40), it was of interest to examine if the enhanced oxidative stress contributes to the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis in VSMC from SHR. To test this, the effect of antioxidant DPI, an inhibitor of NADPH oxidase and N-acetyl-L-cysteine (NAC), free radical scavenger, on the expression of Gq α and PLC β 1 proteins and protein synthesis was examined. Results shown in Figure 1 indicate that DPI (5 μ M) and NAC (10mM) decreased significantly the enhanced expression of Gq α by about 45% (A) and the enhanced expression of PLC β 1 protein by 30% and 40% respectively (B). In addition, the enhanced protein synthesis was almost completely abolished by these treatments in VSMC from SHR (C). Furthermore, DPI was effective in reducing significantly the protein synthesis in VSMC from WKY by about 45% (C).

We also determined the effect of NAC and DPI on cell volume, another marker of VSMC hypertrophy and the results are shown in Figure 2. VSMC from SHR exhibit enhanced cell volume as compared to VSMC from WKY and this enhanced cell volume was significantly attenuated by about 40% and 45% by NAC and DPI respectively.

Implication of growth factor receptors in enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis in VSMC from 16 wk-old SHR

Since the levels of growth factors have been shown to be enhanced in SHR, it was of interest to examine the contribution of growth factor receptor in enhanced protein synthesis and enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins. To investigate this, the effects of AG1478, an inhibitor of EGFR, AG1295, an inhibitor of PDGFR and AG1028, an inhibitor of IGF-1R were assessed on the expression of Gq α and PLC β 1 proteins in VSMC from SHR and WKY rats and the results are shown in Figure 3. The enhanced expression of Gq α proteins (A) in VSMC from SHR was completely restored to the control WKY levels by AG1478, AG1295 and AG1028 whereas these inhibitors attenuated the enhanced expression of PLC β 1 by about 70%, 75% and 90% respectively (B). On the other hand, these inhibitors did not have any significant effect on the expression of Gq α or PLC β 1 proteins in VSMC from WKY rats. In addition, AG1478, AG1295 and AG1028 also attenuated significantly the enhanced protein synthesis by about 45%, 60% and 75% respectively in VSMC from SHR whereas these inhibitors did not have any significant effect on the protein synthesis in VSMC from WKY (C).

We also used siRNA of EGFR to confirm its role in enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and associated enhanced protein synthesis in VSMC from SHR, and the results are shown in Figure 4. Treatment of VSMC with EGFR-siRNA that attenuated the expression of EGFR in VSMC from SHR by about 85% (A) also resulted in a significant attenuation of enhanced expression of Gq α (B) and PLC β 1 proteins (C) by about 60% and 65% respectively and enhanced protein synthesis by about 45% in VSMC from SHR (D). In

addition, EGFR-siRNA also attenuated the expression of Gq α by about 45% in VSMC from WKY rats (B).

Implication of oxidative stress in enhanced phosphorylation of growth factor receptors in VSMC from SHR.

Since growth factor receptors and enhanced oxidative stress contribute to the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins in VSMC from SHR, it was desirable to examine if the growth factor receptor activation is attributed to the increased oxidative stress. To test this, the effects of NAC and DPI were evaluated on the phosphorylation of growth factor receptors in VSMC from SHR and WKY rats. As shown in Figure 5, the increased phosphorylation of EGFR (A), IGF-1R (C) and PDGFR (E) was diminished by NAC and DPI towards WKY levels. Furthermore, the phosphorylation levels of IGF-1R and PDGFR were also significantly decreased by these antioxidants in VSMC from WKY rats. In addition, the expression of EGFR (B) and IGF-1R (D) but not PDGFR was increased in VSMC from 16 weeks-old SHR as compared to WKY rats by about 200% and 150% respectively and both these antioxidants NAC and DPI attenuated the enhanced expression of EGFR by about 65% and 80% respectively whereas the enhanced expression of IGF-1R was completely abolished by these antioxidants. Furthermore, the protein expression of IGF-1R in VSMC from WKY rats was also significantly decreased (\approx 70%) by NAC.

Implication of c-Src in enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and protein synthesis in VSMC from SHR

Since c-Src has been reported to be activated by ROS in VSMC (12) it was of interest to examine if c-Src is also implicated in oxidative stress-induced enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis in VSMC from SHR. To investigate this, we examined the effect of PP2, an inhibitor of c-Src on the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis. Results shown in Figure 6 indicate that treatment of cells with PP2 but not PP3, an inactive analogue of PP2, almost completely attenuated the enhanced expression of Gq α protein (A) whereas the enhanced expression of PLC β 1 protein (B) and enhanced protein synthesis (C) were attenuated by about 75% and 80% respectively in VSMC from SHR. On the other hand, PP2 and PP3 did not have any effect on the expression of Gq α and PLC β 1 proteins in VSMC from WKY rats, however, PP2 and not PP3 inhibited the protein synthesis in WKY rats by about 20%.

To further confirm the role of c-Src molecule in enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis in VSMC from SHR, we tested the effect of c-Src specific siRNA on the enhanced levels of Gq α and PLC β 1 protein and associated hypertrophy in VSMC from SHR and the results are shown in Figure 7. Treatment of VSMC with c-Src siRNA that attenuated significantly the expression of c-Src in both VSMC from SHR and WKY rats by about 35% and 50% (A) respectively, resulted in a significant attenuation of enhanced expression of Gq α (B) and PLC β 1 (C) proteins by about 75 % and 90 % respectively and enhanced protein synthesis by about 60 % (D) in VSMC from SHR. In addition, the expression of Gq α protein (B) and the protein synthesis (D) in VSMC from WKY rats were also significantly decreased.

Implication of oxidative stress in enhanced phosphorylation of c-Src in VSMC from SHR

To determine if the activation of growth factor receptors by oxidative stress occurs directly or through c-Src activation, the effect of NAC and DPI was assessed on the phosphorylation of c-Src at tyrosine 419 (Tyr⁴¹⁹) in VSMC from SHR and WKY. As shown in Figure 8, the increased phosphorylation of c-Src at Tyr⁴¹⁹ (85%) was attenuated by NAC (10mM) and DPI (5 μ M) toward WKY levels, whereas it did not have any significant effect in VSMC from WKY rats. Furthermore, the expression level of total c-Src molecule was not altered in VSMC from SHR as compared to WKY rats, and NAC and DPI did not affect the expression level of c-Src.

Implication of c-Src in enhanced phosphorylation of growth factor receptors in VSMC from SHR

To determine if c-Src is the upstream signaling molecule and contributes to the activation of growth factor receptors, the effect of c-Src inhibitor PP2 and PP3, an inactive analog of PP2, was assessed on the phosphorylation of growth factor receptors in VSMC from SHR and WKY rats. As illustrated in Figure 9, PP2, but not PP3, attenuated the enhanced phosphorylation of EGFR (A), IGF-1R (C) and PDGFR (E) in VSMC from SHR to WKY control levels. In addition, the enhanced expression of EGFR (B) and IGF-1R (D) in VSMC from SHR was also attenuated by PP2 by about 40% and 90% respectively; however, PP2 or PP3 did not have any effect on the phosphorylation and expression levels of growth factor receptors in VSMC from WKY rats.

Implication of oxidative stress and c-Src in MAP Kinase signaling in VSMC from SHR

We earlier showed the implication of MAP kinase in enhanced protein synthesis in VSMC from SHR (4) as well as in Ang II-induced enhanced protein synthesis in A10 VSMC (32). Growth factor receptors signal through MAP kinase pathway (26, 36). Since oxidative stress through c-Src transactivate growth factor receptors, it was desirable to examine the implication of ROS and c-Src in the activation of MAPK signaling. To test this, we examined the effect of NAC, DPI and PP2 on the ERK1/2 phosphorylation in VSMC from SHR and WKY rats. Results shown in figure 10A indicate that ERK1/2 phosphorylation was significantly enhanced in VSMC from SHR as compared to WKY rats. Treatment with DPI attenuates the ERK1/2 phosphorylation in both VSMC from SHR and WKY rats; however, the enhanced phosphorylation of ERK1/2 was completely abolished in VSMC from SHR whereas about 50% inhibition was observed in WKY rats. On the other hand, NAC attenuated only slightly the enhanced ERK1/2 phosphorylation in VSMC from SHR. In addition, PP2 but not PP3 attenuated completely the enhanced phosphorylation of ERK1/2 in VSMC from SHR whereas about 35% inhibition was observed in WKY rats (Figure 10B).

DISCUSSION

The implication of ROS in cardiomyocytes and VSMC hypertrophy has been shown by several studies (20, 39, 45). In addition, a role of oxidative stress in the enhanced expression of Gq α and PLC β proteins in A10 VSMC exposed to high glucose and aortic VSMCs from STZ-diabetic rats has been shown (14). We earlier showed that the enhanced levels of endogenous Ang II and ET-1 in VSMC from 16 week-old SHR contribute to the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and resultant increased protein synthesis through the activation of MAP kinase signalling (4). In the present study, we report that enhanced oxidative stress contributes to the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and VSMC hypertrophy in VSMC from SHR.

The fact that NAC and DPI that have been shown to restore the enhanced levels of ROS production (30, 44) also restored the enhanced expression of Gq α , PLC β 1 proteins, enhanced protein synthesis and increased cell volume, markers of VSMC hypertrophy in SHR suggests the implication of ROS in enhanced expression of Gq α and PLC β proteins as well as VSMC hypertrophy in SHR. In this regard, VSMC from SHR have been shown to exhibit enhanced oxidative stress due to the overproduction of O $_2^-$, enhanced activity and overexpression of Nox1/Nox2/Nox4 and p47^{phox} subunits of NADPH oxidase (19, 40). However, Nox5 that has been shown to be expressed in several tissues including human endocardial cells, human VSMC, and human endothelial cells (1) does not appear to contribute to enhanced oxidative stress in VSMC from SHRs because Nox5 is expressed only in primates and not in rodents (28). In addition, a role of NAD(P)H oxidase-derived ROS in potentiating Ang II-induced VSMC hypertrophy and in exacerbating large arteries remodeling has also been shown (45). In addition, NAC was shown to reduce pulmonary

vascular remodeling and left ventricular hypertrophy induced by monocrotaline (11). Furthermore, NOX2 was also implicated in Ang II-induced cardiomyocyte hypertrophy (21).

The underlying mechanism by which ROS enhanced the expression of Gq α and PLC β proteins in VSMC from SHR appears to involve the transactivation of growth factor receptors, because the enhanced phosphorylation of growth factor receptors exhibited by VSMC from SHR was attenuated by both NAC and DPI. In this regard, a role of oxidative stress in the transactivation of growth factor receptors has been reported (5, 37).

Our results showing that the blockade of EGFR, PDGFR and IGF-1R by specific inhibitors; and the silencing of EGFR by siRNA, attenuated significantly the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis in VSMC from SHR suggests the implication of growth factor receptors in enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis in these cells. These results are consistent with our earlier studies showing a role of growth factor receptors in the enhanced expression of G α proteins and hyperproliferation of VSMC from SHR (17, 33). In addition, endothelin-1 was also shown to enhance the expression of G α proteins and proliferation through the transactivation of EGFR in A 10 VSMC (18). Furthermore, a role of growth factor receptors in VSMC hypertrophy has also been shown by several studies (7, 9, 10). Bouallegue et al demonstrated the implication of IGF-1R in ET-1 and Ang II-induced VSMC hypertrophy (10). In addition, in vivo treatment with AG1478 was also shown to attenuate Ang II-induced vascular hypertrophy (7). Furthermore, Kagiya et al have shown the implication of EGFR in Ang II and hypertension (SHR) induced left ventricular hypertrophy by using antisense oligodeoxynucleotide to EGFR (EGFR-AS) (24, 25).

We demonstrate for the first time an enhanced expression of EGFR and IGF-1R in

VSMC from SHR in 16 week-old SHR which may be linked to VSMC dedifferentiation in this animal model of essential hypertension. The enhanced levels of EGFR protein were shown in several diseases such as ovarian carcinomas and primary human brain tumor (27, 35, 46). Ang II that induces VSMC hypertrophy was also reported to increase the expression of IGF-1R (15, 41).

We also demonstrate that c-Src inhibitor PP2 and siRNA attenuated the enhanced expression of Gq α and PLC β proteins and enhanced protein synthesis to WKY levels suggest the role of c-Src in enhanced expression of Gq α and PLC β proteins and enhanced protein synthesis. Our results are consistent with the studies of Descorbeth and Anand-Srivastava who have also reported the implication of c-Src in the enhanced expression of Gq α and PLC β induced by high glucose in A10 VSMC (13) as well as in the enhanced expression of Gi α proteins in VSMC from SHR (17). In addition, we also report that oxidative stress is the upstream signaling molecule of c-Src because of the fact that NAC and DPI attenuated the enhanced phosphorylation of c-Src in VSMC from SHR. In this regard, the contribution of oxidative stress in c-Src activation has also been shown previously in VSMC from SHR (17, 33). Furthermore, the activation of c-Src by H₂O₂ in VSMC has also been reported (5, 9, 37). We also report that PP2, a c-Src inhibitor attenuated the enhanced phosphorylation of growth factor receptors as well as enhanced phosphorylation of ERK1/2 to control WKY levels and suggests that c-Src is upstream of growth factor receptor activation. Taken together, it may be suggested that oxidative stress, through the activation of c-Src, transactivate growth factor receptors and results in the activation of ERK1/2, which contributes to the enhanced expression of Gq α and PLC β proteins and resultant VSMC hypertrophy. In this regard, a role of MAPK in enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis in

VSMC from SHR has been shown (4). The role of oxidative stress in enhanced activation of ERK1/2 in VSMC from SHR has also been shown (31). In addition, H₂O₂ was shown to activate ERK1/2 in an EGF-R/c-Src dependant-fashion (37).

In summary, we provide the first direct evidence that the enhanced oxidative stress exhibited by VSMC from SHR activates c-Src which through the activation of growth factor receptor and MAP kinase signaling increases the expression of Gq α and PLC β 1 proteins and results in hypertrophy (Figure 11). From these studies, it may be suggested that Gq α and PLC- β 1 proteins may be used as the potential targets for the development of new therapies for the treatment of cardiovascular diseases.

Acknowledgments

We thank Christian Charbonneau for technical assistance in the measurement of cell volume.

FUNDING

This study was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP-53074).

DISCLOSURES

None.

References

1. **Ahmarani L, Avedanian L, Al-Khoury J, Perreault C, Jacques D, and Bkaily G.** Whole-cell and nuclear NADPH oxidases levels and distribution in human endocardial endothelial, vascular smooth muscle, and vascular endothelial cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 91: 71-79, 2013.
2. **Anand-Srivastava MB.** Modulation of Gi Proteins in Hypertension: Role of Angiotensin II and Oxidative Stress. *Current cardiology reviews* 6: 298-308, 2010.
3. **Anand-Srivastava MB, Franks DJ, Cantin M, and Genest J.** Presence of "Ra" and "P"-site receptors for adenosine coupled to adenylate cyclase in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications* 108: 213-219, 1982.
4. **Atef ME, and Anand-Srivastava MB.** Enhanced expression of Gqalpha and PLC-beta1 proteins contributes to vascular smooth muscle cell hypertrophy in SHR: role of endogenous angiotensin II and endothelin-1. *American journal of physiology Cell physiology* 307: C97-106, 2014.
5. **Azar ZM, Mehdi MZ, and Srivastava AK.** Insulin-like growth factor type-1 receptor transactivation in vasoactive peptide and oxidant-induced signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 85: 105-111, 2007.
6. **Baynes JW.** Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40: 405-412, 1991.
7. **Beaucage P, and Moreau P.** EGF receptor transactivation in angiotensin II and endothelin control of vascular protein synthesis in vivo. *Journal of cardiovascular pharmacology* 44 Suppl 1: S20-23, 2004.
8. **Berridge MJ.** Inositol trisphosphate as a second messenger in signal transduction. *Annals of the New York Academy of Sciences* 494: 39-51, 1987.
9. **Bouallegue A, Simo Cheyou ER, Anand-Srivastava MB, and Srivastava AK.** ET-1-induced growth promoting responses involving ERK1/2 and PKB signaling and Egr-1 expression are mediated by Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase-II in vascular smooth muscle cells. *Cell calcium* 54: 428-435, 2013.
10. **Bouallegue A, Vardatsikos G, and Srivastava AK.** Role of insulin-like growth factor 1 receptor and c-Src in endothelin-1- and angiotensin II-induced PKB phosphorylation, and

hypertrophic and proliferative responses in vascular smooth muscle cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 87: 1009-1018, 2009.

11. **Chaumais MC, Ranchoux B, Montani D, Dorfmueller P, Tu L, Lecerf F, Raymond N, Guignabert C, Price L, Simonneau G, Cohen-Kaminsky S, Humbert M, and Perros F.** N-acetylcysteine improves established monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Respiratory research* 15: 65, 2014.

12. **Clempus RE, and Griendling KK.** Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular research* 71: 216-225, 2006.

13. **Descorbeth M, and Anand-Srivastava MB.** Role of growth factor receptor transactivation in high glucose-induced increased levels of Gq/11alpha and signaling in vascular smooth muscle cells. *Journal of molecular and cellular cardiology* 49: 221-233, 2010.

14. **Descorbeth M, and Anand-Srivastava MB.** Role of oxidative stress in high-glucose- and diabetes-induced increased expression of Gq/11alpha proteins and associated signaling in vascular smooth muscle cells. *Free radical biology & medicine* 49: 1395-1405, 2010.

15. **Du J, Meng XP, and Delafontaine P.** Transcriptional regulation of the insulin-like growth factor-I receptor gene: evidence for protein kinase C-dependent and -independent pathways. *Endocrinology* 137: 1378-1384, 1996.

16. **Friedman J, Peleg E, Kagan T, Shnizer S, and Rosenthal T.** Oxidative stress in hypertensive, diabetic, and diabetic hypertensive rats. *American journal of hypertension* 16: 1049-1052, 2003.

17. **Gomez Sandoval YH, and Anand-Srivastava MB.** Enhanced levels of endogenous endothelin-1 contribute to the over expression of G1alpha protein in vascular smooth muscle cells from SHR: Role of growth factor receptor activation. *Cellular signalling* 23: 354-362, 2011.

18. **Gomez Sandoval YH, Levesque LO, Li Y, and Anand-Srivastava MB.** Role of epidermal growth factor receptor transactivation in endothelin-1-induced enhanced expression of Gi protein and proliferation in A10 vascular smooth muscle cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 91: 221-227, 2013.

19. **Gusan S, and Anand-Srivastava MB.** cAMP attenuates the enhanced expression of Gi proteins and hyperproliferation of vascular smooth muscle cells from SHR: role of ROS

and ROS-mediated signaling. *American journal of physiology Cell physiology* 304: C1198-1209, 2013.

20. **Hahn NE, Musters RJ, Fritz JM, Pagano PJ, Vonk AB, Paulus WJ, van Rossum AC, Meischl C, Niessen HW, and Krijnen PA.** Early NADPH oxidase-2 activation is crucial in phenylephrine-induced hypertrophy of H9c2 cells. *Cellular signalling* 26: 1818-1824, 2014.

21. **Hingtgen SD, Tian X, Yang J, Dunlay SM, Peek AS, Wu Y, Sharma RV, Engelhardt JF, and Davisson RL.** Nox2-containing NADPH oxidase and Akt activation play a key role in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Physiological genomics* 26: 180-191, 2006.

22. **Hubbard KB, and Hepler JR.** Cell signalling diversity of the Gqalpha family of heterotrimeric G proteins. *Cellular signalling* 18: 135-150, 2006.

23. **Jun T, Ke-yan F, and Catalano M.** Increased superoxide anion production in humans: a possible mechanism for the pathogenesis of hypertension. *Journal of human hypertension* 10: 305-309, 1996.

24. **Kagiyama S, Eguchi S, Frank GD, Inagami T, Zhang YC, and Phillips MI.** Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and hypertension are attenuated by epidermal growth factor receptor antisense. *Circulation* 106: 909-912, 2002.

25. **Kagiyama S, Qian K, Kagiyama T, and Phillips MI.** Antisense to epidermal growth factor receptor prevents the development of left ventricular hypertrophy. *Hypertension* 41: 824-829, 2003.

26. **Katz M, Amit I, and Yarden Y.** Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochimica et biophysica acta* 1773: 1161-1176, 2007.

27. **Kohler M, Janz I, Wintzer HO, Wagner E, and Bauknecht T.** The expression of EGF receptors, EGF-like factors and c-myc in ovarian and cervical carcinomas and their potential clinical significance. *Anticancer research* 9: 1537-1547, 1989.

28. **Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M, and Guzik TJ.** NADPH oxidases in vascular pathology. *Antioxidants & redox signaling* 20: 2794-2814, 2014.

29. **Korsgaard N, Aalkjaer C, Heagerty AM, Izzard AS, and Mulvany MJ.** Histology of subcutaneous small arteries from patients with essential hypertension. *Hypertension* 22: 523-526, 1993.

30. **Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Kirima K, and Tamaki T.** Antioxidants inhibit JNK and p38 MAPK activation but not ERK 1/2 activation by angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 24: 251-261, 2001.
31. **Lappas G, Daou GB, and Anand-Srivastava MB.** Oxidative stress contributes to the enhanced expression of Gialpha proteins and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension* 23: 2251-2261, 2005.
32. **Li Y, Hashim S, and Anand-Srivastava MB.** Intracellular peptides of natriuretic peptide receptor-C inhibit vascular hypertrophy via Gqalpha/MAP kinase signaling pathways. *Cardiovascular research* 72: 464-472, 2006.
33. **Li Y, Levesque LO, and Anand-Srivastava MB.** Epidermal growth factor receptor transactivation by endogenous vasoactive peptides contributes to hyperproliferation of vascular smooth muscle cells of SHR. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 299: H1959-1967, 2010.
34. **Li Y, Sarkar O, Brochu M, and Anand-Srivastava MB.** Natriuretic peptide receptor-C attenuates hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of nitroxidative stress and Gi proteins. *Hypertension* 63: 846-855, 2014.
35. **Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H, Whittle N, Waterfield MD, Ullrich A, and Schlessinger J.** Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature* 313: 144-147, 1985.
36. **Ma CX, Reinert T, Chmielewska I, and Ellis MJ.** Mechanisms of aromatase inhibitor resistance. *Nature reviews Cancer* 15: 261-275, 2015.
37. **Mbong N, and Anand-Srivastava MB.** Hydrogen peroxide enhances the expression of Gialpha proteins in aortic vascular smooth cells: role of growth factor receptor transactivation. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 302: H1591-1602, 2012.
38. **Nakashima H, Frank GD, Shirai H, Hinoki A, Higuchi S, Ohtsu H, Eguchi K, Sanjay A, Reyland ME, Dempsey PJ, Inagami T, and Eguchi S.** Novel role of protein

kinase C-delta Tyr 311 phosphorylation in vascular smooth muscle cell hypertrophy by angiotensin II. *Hypertension* 51: 232-238, 2008.

39. **Rice KM, Uddemmarri S, Desai DH, Morrison RG, Harris R, Wright GL, and Blough ER.** PGF2alpha-associated vascular smooth muscle hypertrophy is ROS dependent and involves the activation of mTOR, p70S6k, and PTEN. *Prostaglandins & other lipid mediators* 85: 49-57, 2008.

40. **Saha S, Li Y, and Anand-Srivastava MB.** Reduced levels of cyclic AMP contribute to the enhanced oxidative stress in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 86: 190-198, 2008.

41. **Scheidegger KJ, Du J, and Delafontaine P.** Distinct and common pathways in the regulation of insulin-like growth factor-1 receptor gene expression by angiotensin II and basic fibroblast growth factor. *The Journal of biological chemistry* 274: 3522-3530, 1999.

42. **Smrcka AV, Hepler JR, Brown KO, and Sternweis PC.** Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science* 251: 804-807, 1991.

43. **Ueno H, Kanellakis P, Agrotis A, and Bobik A.** Blood flow regulates the development of vascular hypertrophy, smooth muscle cell proliferation, and endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *Hypertension* 36: 89-96, 2000.

44. **Vaquero EC, Edderkaoui M, Pandol SJ, Gukovsky I, and Gukovskaya AS.** Reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 279: 34643-34654, 2004.

45. **Weber DS, Rocic P, Mellis AM, Laude K, Lyle AN, Harrison DG, and Griendling KK.** Angiotensin II-induced hypertrophy is potentiated in mice overexpressing p22phox in vascular smooth muscle. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 288: H37-42, 2005.

46. **Yoshida K, Tosaka A, Takeuchi S, and Kobayashi N.** Epidermal growth factor receptor content in human renal cell carcinomas. *Cancer* 73: 1913-1918, 1994.

.

Figures legend

Figure 1. Effect of NAC and DPI on protein synthesis and Gq α /PLC β 1 protein expression in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats. VSMC from 16 wk-old SHR and age matched WKY rats were incubated with NAC and DPI. The cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against Gq α and PLC β 1 (A, B upper panels) as described in Materials and Methods. The β -actin was used as the loading control. The proteins were quantified by densitometric scanning (A, B lower panels) and the protein synthesis was determined by [3 H]-leucine incorporation (C) as described in Materials and Methods. The results are expressed as percentage of control, taken as 100%. Values are means \pm SEM of 4 separate experiments using different cell cultures. *P < 0.05, ***P < 0.001 vs. WKY rats; # P < 0.05, ## P < 0.01 vs. SHR.

Figure 2. Effect of NAC and DPI on cell volume of vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats. VSMC from 16-week-old SHR and age-matched WKY were grown to 50% confluence in petri dishes. Cells were serum deprived for 24 h to induce cell quiescence and were incubated for 16 h in the absence or presence of NAC (μ M) and DPI (5 μ M). The cells were then washed twice and fixed with 10% formalin for 1 hour in 4 $^{\circ}$ C and further incubated 45 min in the room temperature with whole cell stains reagent using Thermo ScientificTM CellomicsTM Whole Cell Stains (green). The volume of VSMC was evaluated by 3D live cell microscopy imaging with inverse point scanning confocal microscope with 2 PMT channels. Objective Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC and

40x/1.40 Oil DIC. 3D microscopy datasets interpretation was performed with the software Imaris (Bitplane). Values are means \pm SEM of 3 separate experiments using different cell cultures. In each experiment, the results are expressed as the average of cell volume of 5 different cells. **P < 0.01 vs. WKY rats; # P < 0.05 vs. SHR.

Figure 3. Effect of growth factor receptor inhibition on the enhanced protein expression of Gq α /PLC β 1 and enhanced protein synthesis in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats. VSMC were treated 16 hours with AG1478 (5 μ M), AG1295 (5 μ M) and AG1028 (5 μ M). The cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against Gq α (upper panels A), PLC β 1 (upper panels B) as described in Materials and methods. Dynein was used as the loading control. The proteins were quantified by densitometric scanning (A, B lower panels). The protein synthesis was determined by [3 H]-leucine incorporation (C) as described in Materials and Methods. The results are expressed as percentage of control, taken as 100%. Values are means \pm SEM of 4 separate experiments using different cell cultures. **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. WKY rats; # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 vs. SHR.

Figure 4. Effect of the knockdown of EGFR on enhanced expression Gq α /PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats. Confluent VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY rats were incubated in the absence or presence of EGFR-siRNA for 12 h. A scramble siRNA was used as a negative control. Cell lysates were prepared and subjected to Western blot analysis using specific antibody against EGFR (A), Gq α (B) and PLC β 1 (C). The β -actin and dynein were used as the loading control. The protein bands were quantified by

densitometric scanning (A, B and C, bottom panels) and protein synthesis was determined by ^3H -leucine incorporation (D) as described in "Methods". Results are expressed as a percentage of control taken as 100%. Values are means \pm SE of 3 separate experiments using different cell cultures. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. WKY rats; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. SHR.

Figure 5. Effect of NAC and DPI on EGFR, IGF-1R and PDGFR phosphorylation and expression in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats. VSMC from 16 wk-old SHR and age matched WKY rats were incubated with NAC and DPI. The cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against pEGFR/EGFR, pIGF-1R/IGF-1R and pPDGFR/PDGFR (A, B, C, D, E upper panels) as described in Materials and methods. The proteins were quantified by densitometric scanning (A, B, C, D, E lower panels). The β -actin was used as a loading control. The results are expressed as percentage of control, taken as 100%. Values are means \pm SEM of 5 separate experiments using different cell cultures. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. WKY rats; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. SHR.

Figure 6. Effect of c-Src inhibitor (PP2) on enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats. VSMC were incubated in the presence or absence of PP2 (5 μM) or PP3 (5 μM) for 16 hours. Membranes were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against Gq α /PLC β 1 (A; B upper panels) as described in Materials and Methods. The proteins were quantified by densitometric scanning (A, B lower

panels) and the protein synthesis was determined by [³H]-leucine incorporation (C) as described in Materials and Methods. The results are expressed as a percentage of control taken as 100%. Values are means ± SEM of 4 separate experiments using different cell cultures. *P < 0.05, ***P < 0.001 vs. WKY rats; ## P < 0.01, ### P < 0.001 vs. SHR.

Figure 7. Effect of the knockdown of c-Src on the expression of Gqα/PLCβ1 proteins and protein synthesis in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats. Confluent VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY rats were incubated in the absence or presence of c-Src-siRNA for 12 h. A scramble siRNA was used as a negative control. Cell lysates were prepared and subjected to Western blot analysis using specific antibody against c-Src (A), Gqα (B) and PLCβ1 (C). β-actin and dynein were used as the loading control. Protein synthesis was determined by [³H]-leucine incorporation (D). Results are expressed as a percentage of control taken as 100%; Values are means ± SE of 3 separate experiments using different cell cultures. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs. WKY rats; # P < 0.05, ## P < 0.01 vs. SHR.

Figure 8. Effect of NAC and DPI on enhanced c-Src phosphorylation in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats. VSMC from 16 wk-old SHR and age-matched WKY rats were incubated in the presence or absence of NAC (10 mM) or DPI (5 μM) for 16 hours. Membranes were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against (phospho)-c-Src and c-Src (upper panels) as described in Materials and Methods. Dynein was used as the loading control. The proteins were quantified by densitometric scanning (lower panels) as described in Materials and Methods. The results are expressed as a percentage of control taken as 100%. Values are

means \pm SEM of 3 separate experiments using different cell cultures. ***P < 0.001 vs. WKY rats; ### P < 0.001 vs. SHR.

Figure 9. Effect of c-Src inhibitor on EGFR, IGF-1R and PDGFR phosphorylation and expression in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats. VSMC from 16 wk-old SHR and age matched WKY rats were incubated in the absence or the presence of PP2/PP3 (5 μ M). The cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against pEGFR/EGFR, pPDGFR/PDGFR and pIGF-1R/IGF-1R (A, B, C, D, E upper panels) as described in Materials and Methods. The β -actin was used as the loading control. The proteins were quantified by densitometric scanning (A, B, C, D, E lower panels). The β -actin was used as a leading control. The results are expressed as percentage of control, taken as 100%. Values are means \pm SEM of 5 separate experiments using different cell cultures. **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. WKY rats; # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 vs. SHR.

Figure 10. Effect of ROS inhibition and c-Src inhibition on p42/44MAPK signaling in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats. VSMC were incubated in the presence or absence of NAC (10 mM), DPI (5 μ M) and PP2/PP3 (5 μ M) for 16 hours. Membranes were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against pERK1/2 and ERK1/2 (A; B upper panels) as described in Materials and Methods. The proteins were quantified by densitometric scanning (A, B lower panels). The results are expressed as a percentage of control taken as 100%. Values are means \pm SEM of 3 separate experiments using different cell cultures. *P < 0.05, **P < 0.05, ***P < 0.001 vs. WKY rats; ### P < 0.001 vs. SHR.

Figure 11. The possible intracellular signaling mechanisms implicated in the oxidative stress-induced overexpression of Gq α /PLC β 1 proteins and resultant VSMC hypertrophy.. ROS, through the activation of c-Src, transactivate RTKs and MAPK signaling, which increases the protein expression of Gq α /PLC- β 1 and results in VSMC hypertrophy.

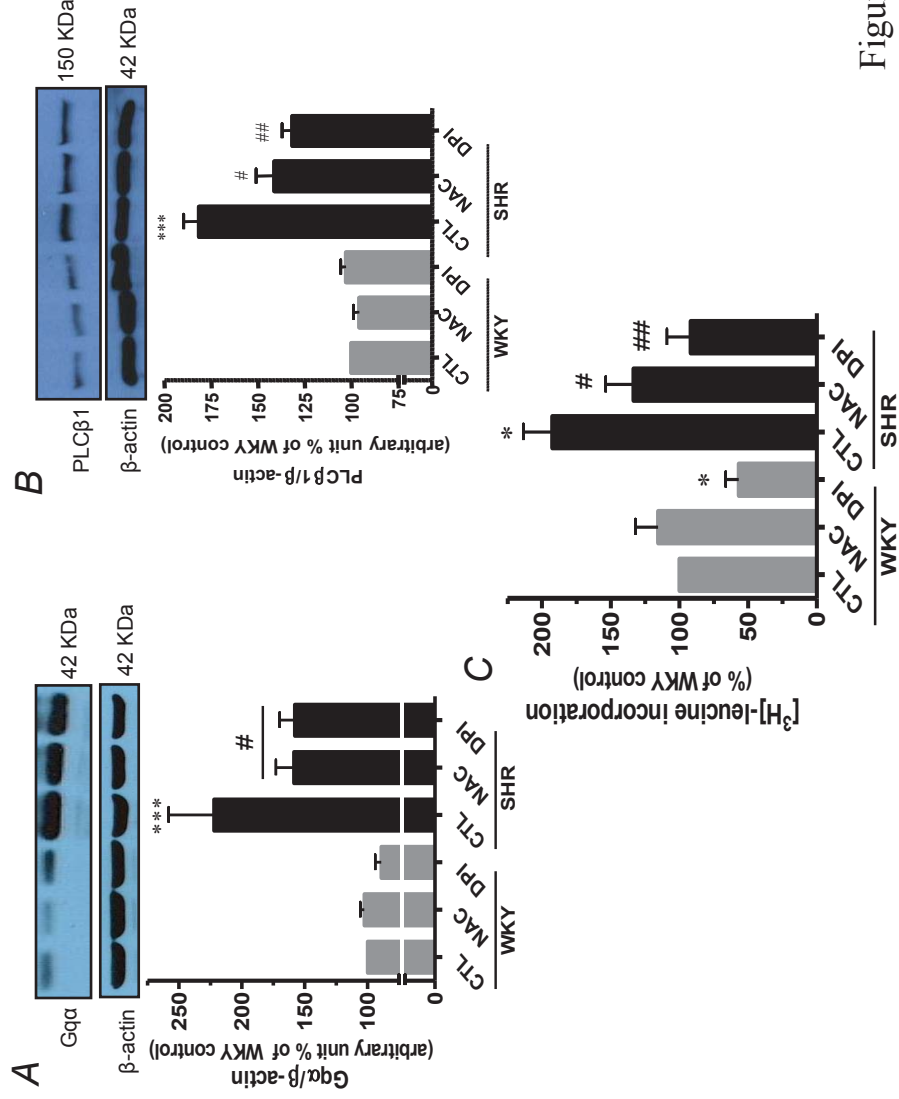


Figure 1

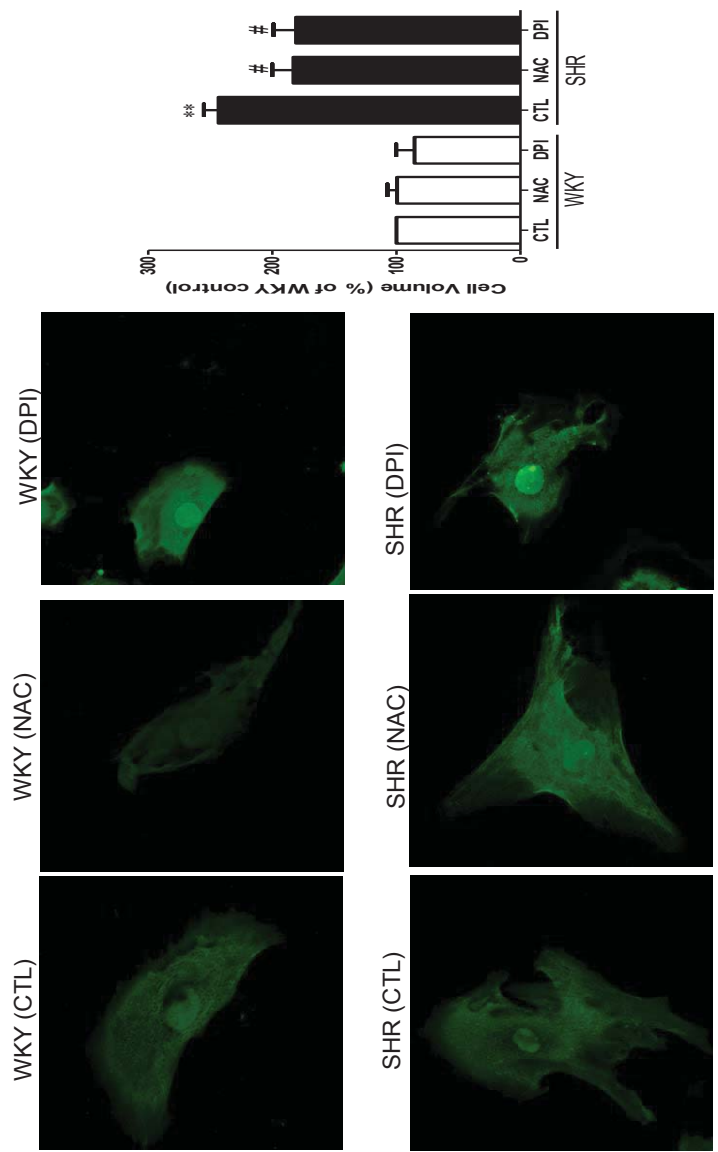


Figure 2

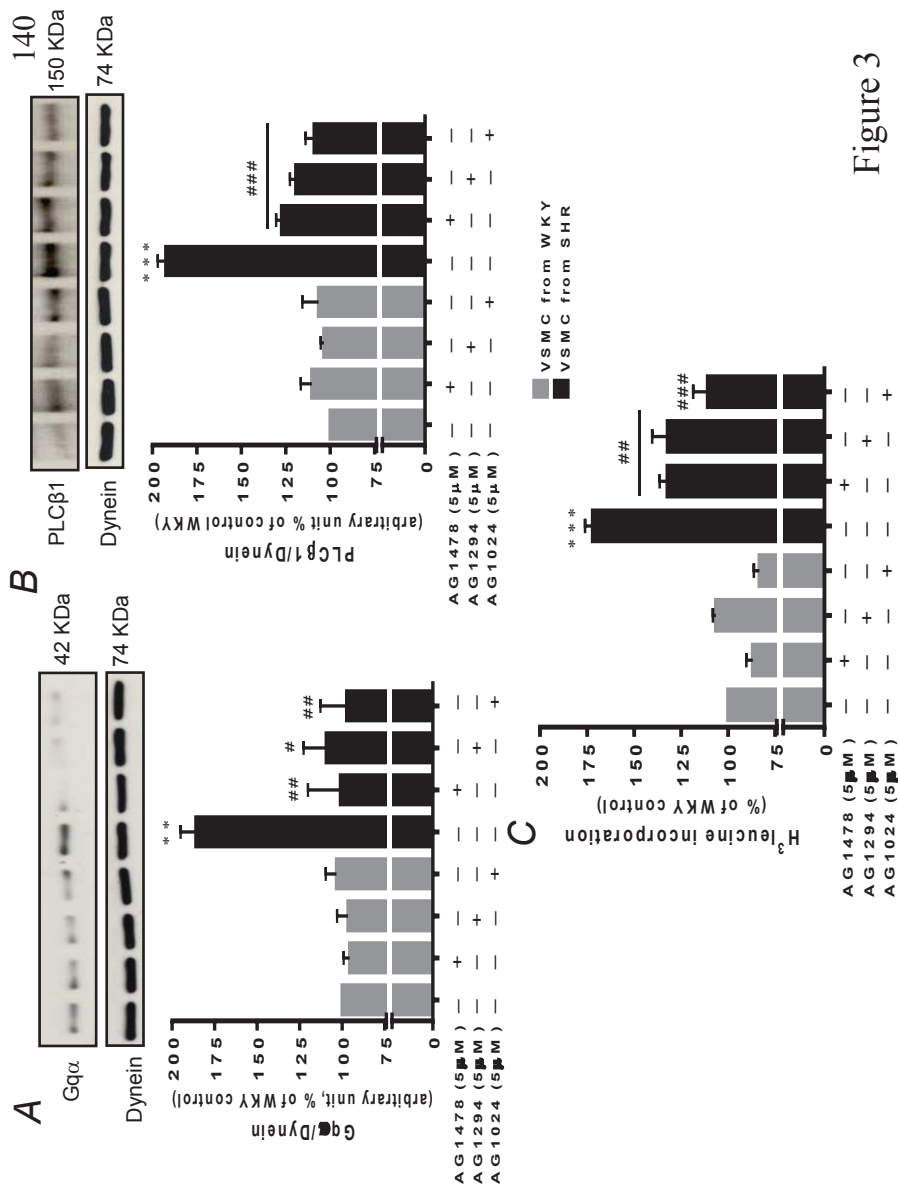


Figure 3

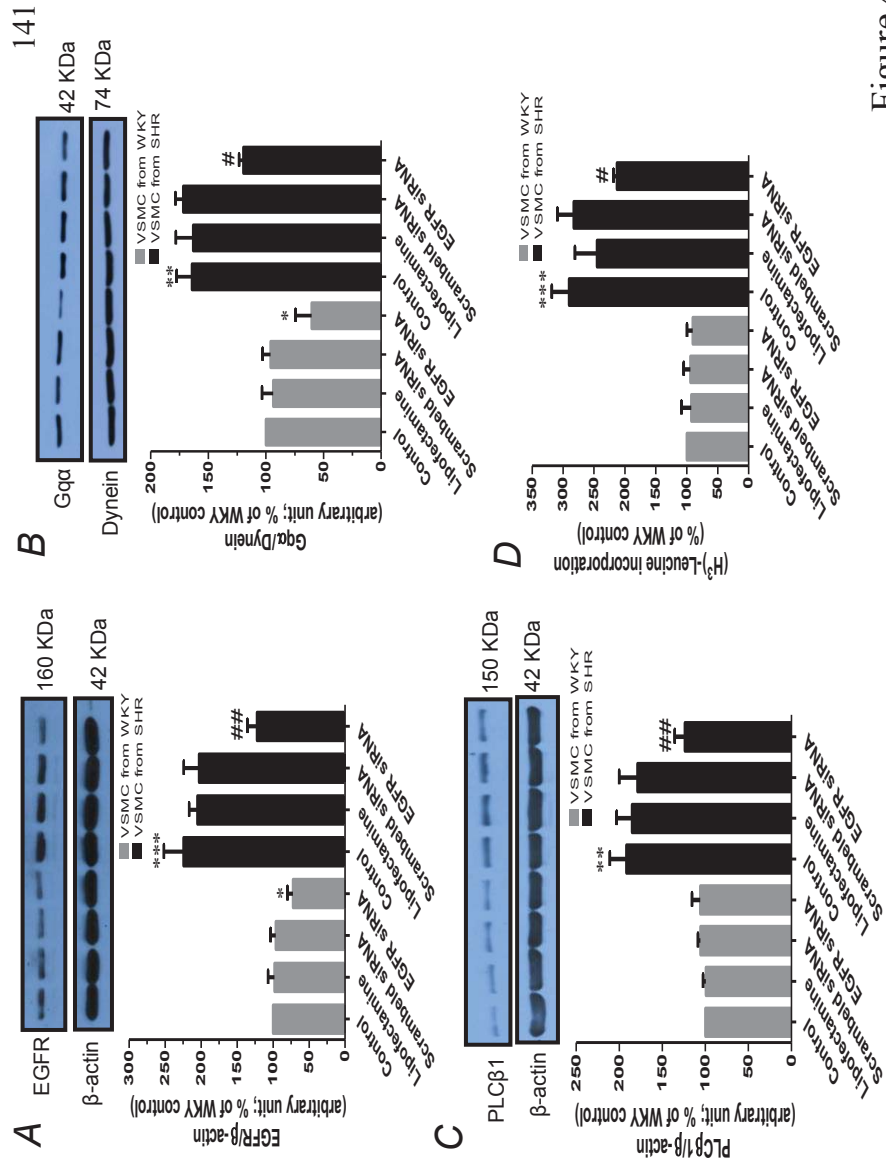


Figure 4

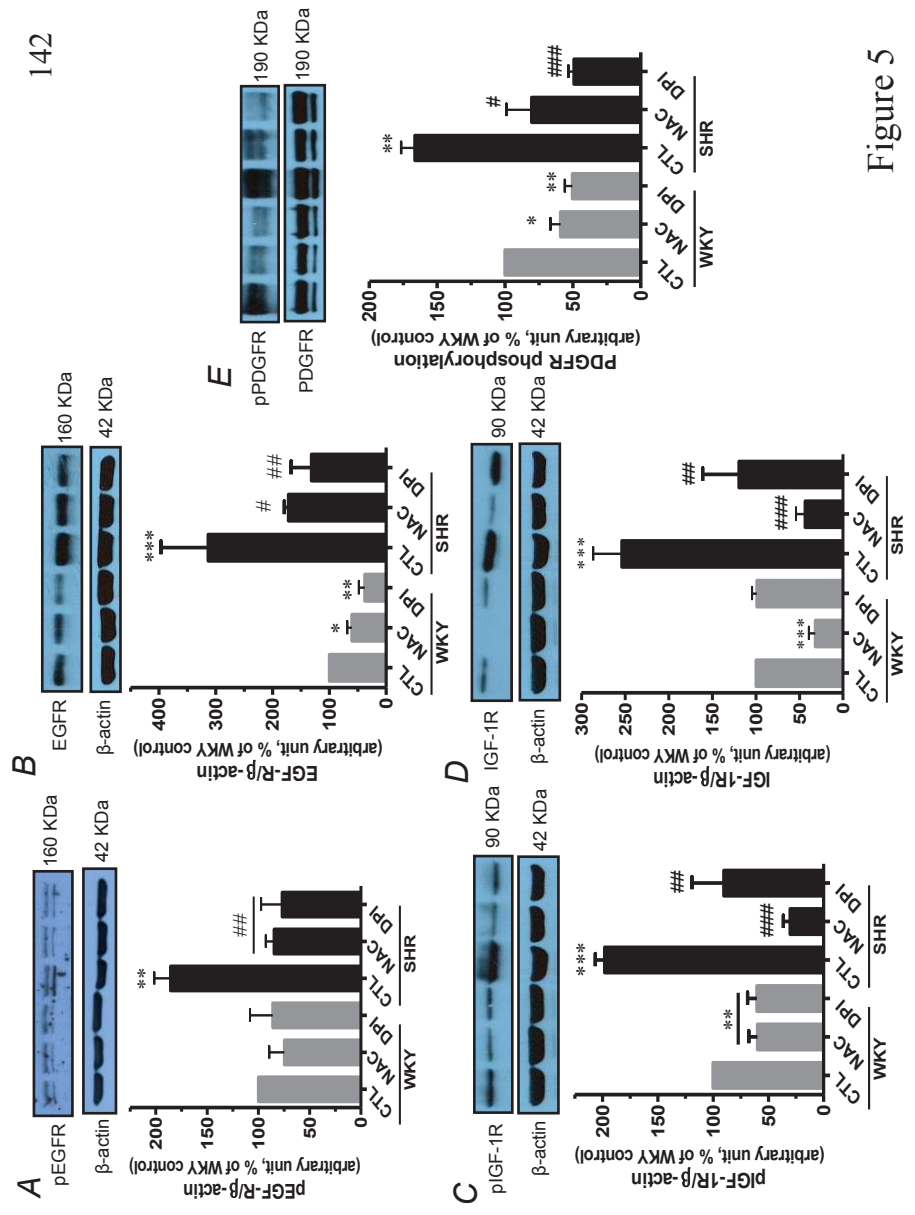


Figure 5

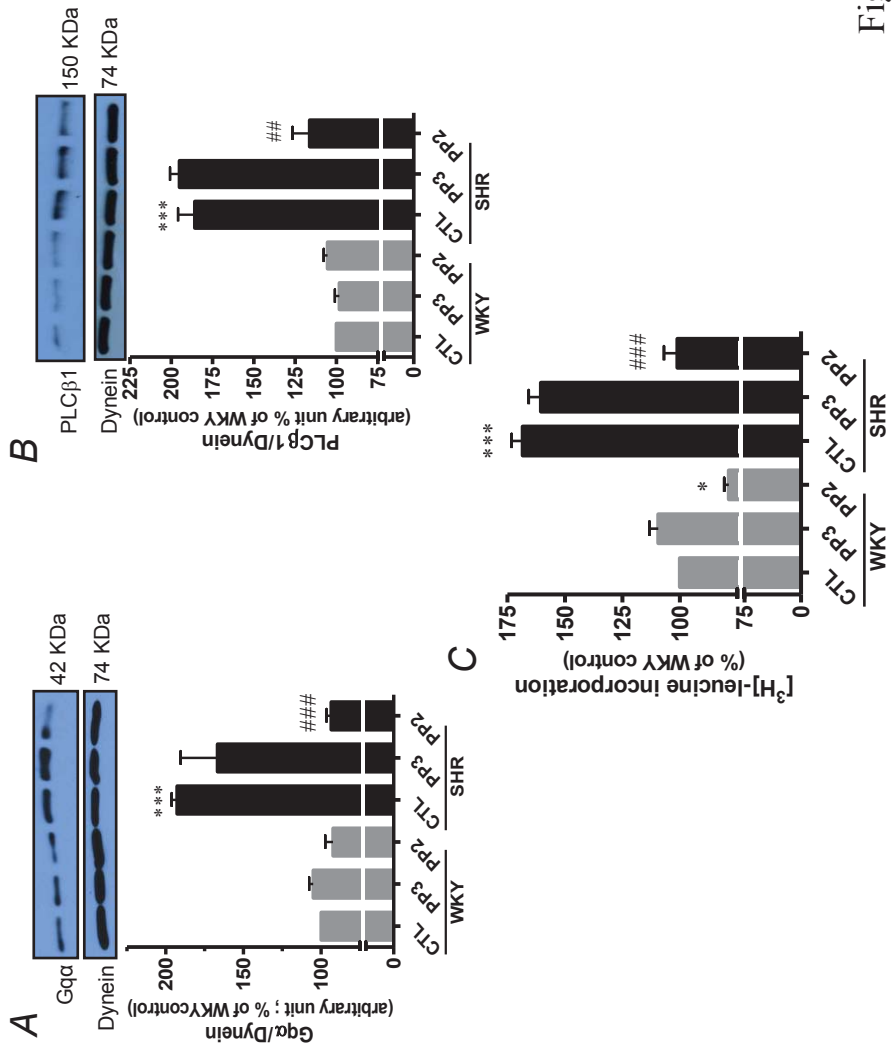


Figure 6

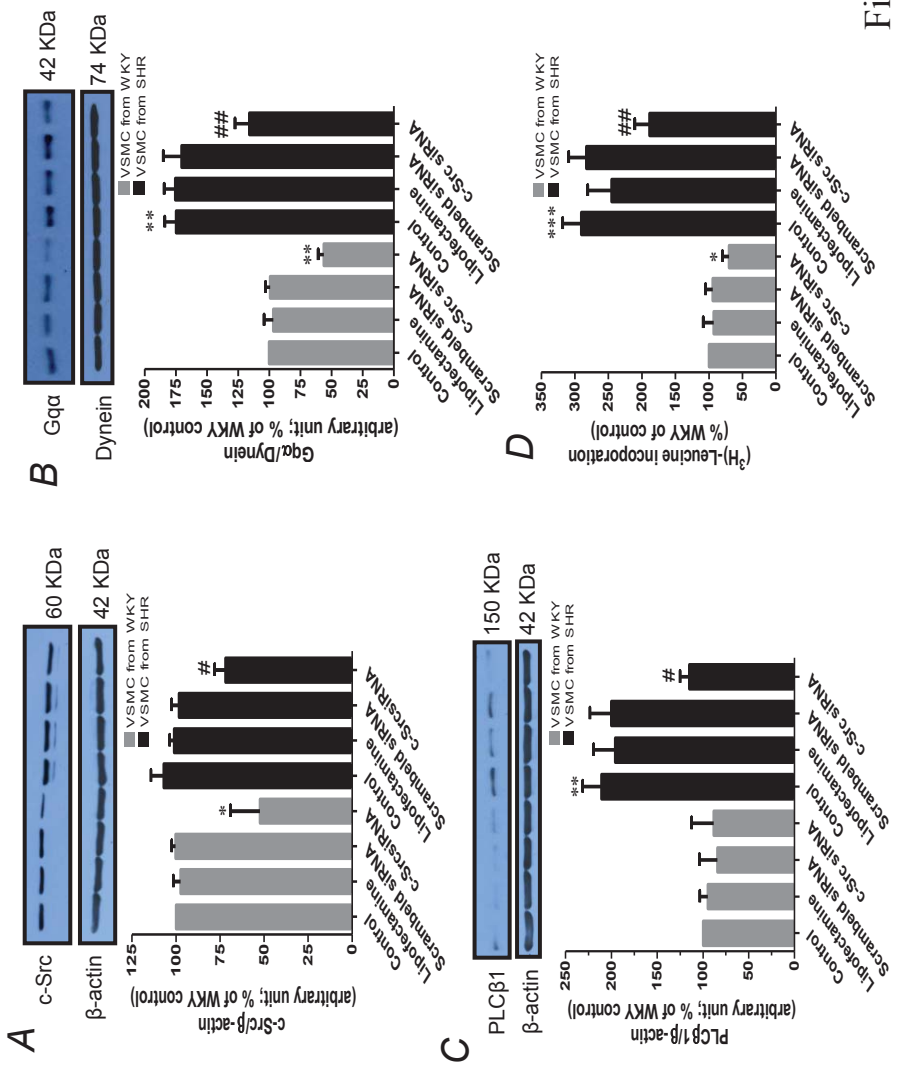


Figure 7

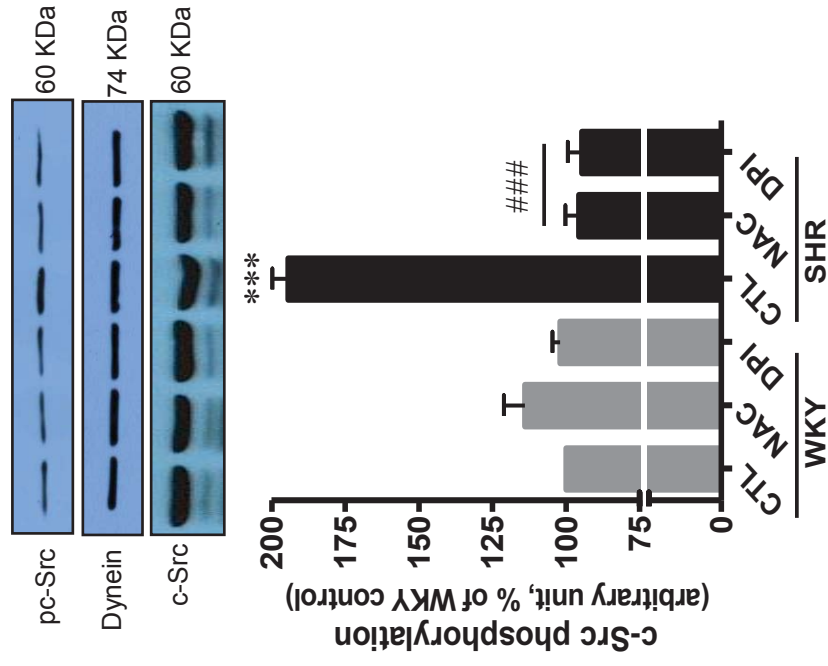


Figure 8

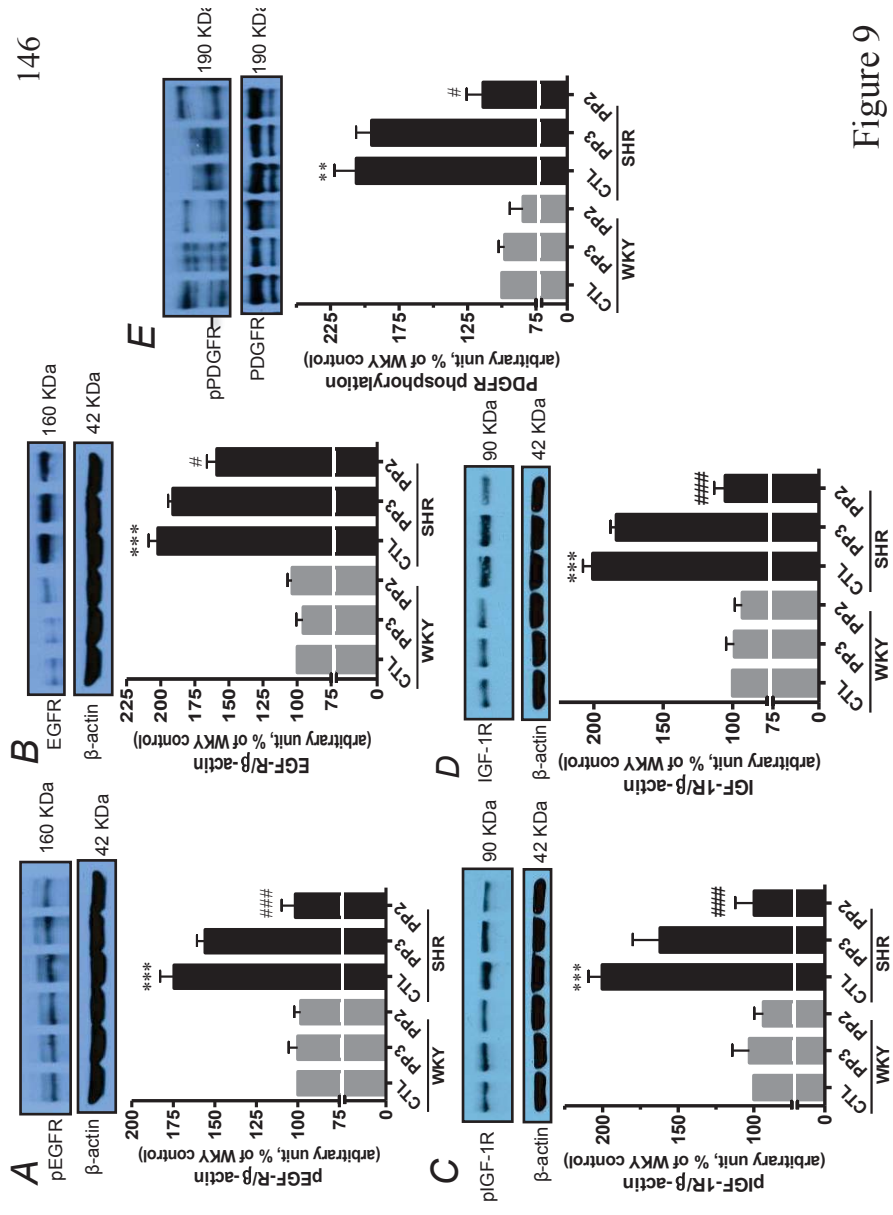


Figure 9

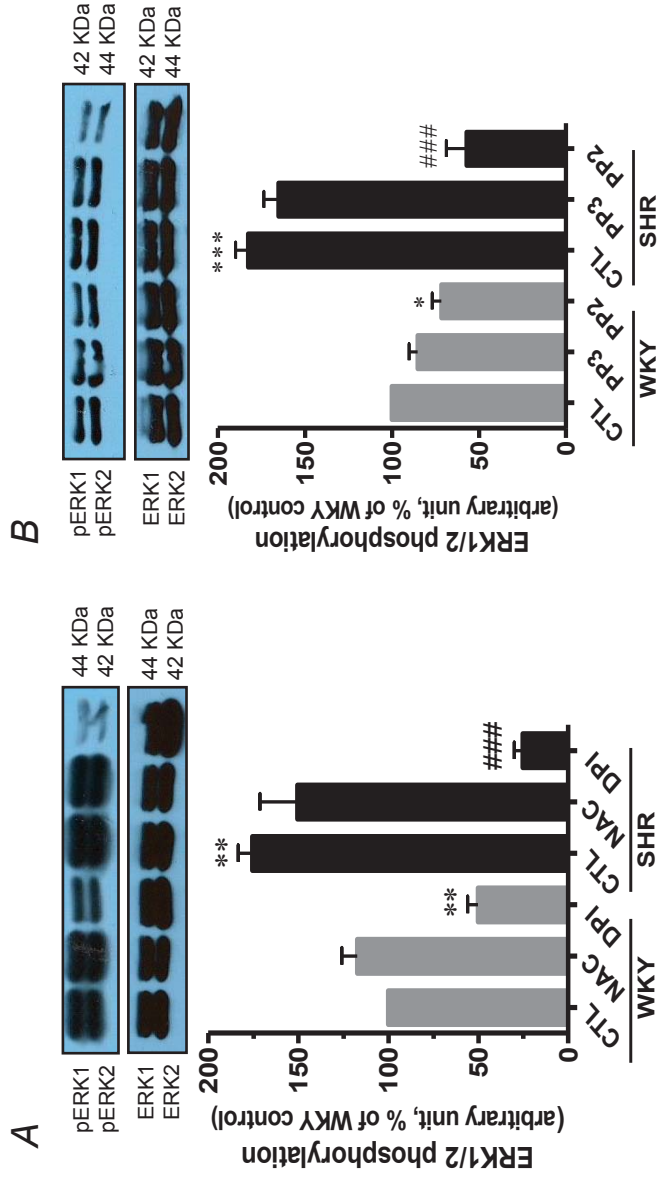


Figure 10

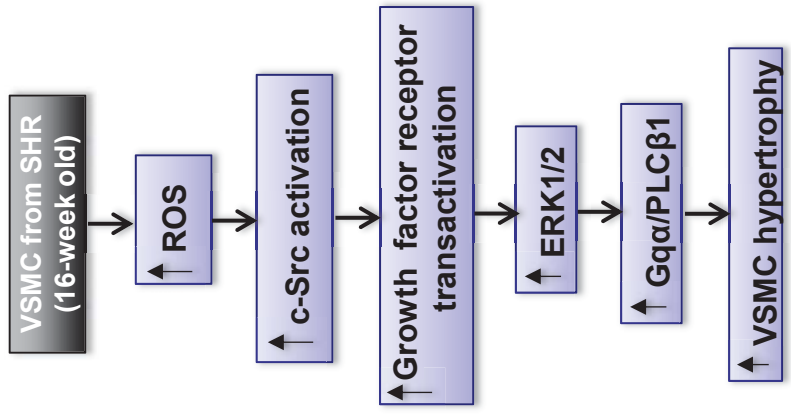


Figure 11

Role of PKC δ in enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and VSMC hypertrophy in spontaneously hypertensive rats

Mohammed Emehdi Atef and Madhu B. Anand-Srivastava*

Department of Molecular and Integrative Physiology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Running Head: PKC δ signaling and VSMC hypertrophy

*Address correspondence to:

Dr. Madhu B. Anand-Srivastava,
Department of Molecular and Integrative Physiology, Faculty of Medicine,
University of Montreal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville,
Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7,
Tel : (514)343-2091
Fax: (514)343-2111

Submitted to *PLOS ONE* (December 2015).

Abstract

Gq α signaling has been implicated in cardiac hypertrophy. In addition, Ang II was also shown to induce its hypertrophic effect through Gq α and PKC δ activation; however, the role of PKC δ in vascular smooth muscle cell (VSMC) hypertrophy in animal model is still lacking. The present study was therefore undertaken to examine the role of PKC δ and the associated signaling mechanisms in VSMC hypertrophy using 16-week-old spontaneously hypertensive rats (SHR). VSMC from 16-week-old SHR exhibited enhanced phosphorylation of PKC δ -Tyr³¹¹ and increased protein synthesis, marker of hypertrophy, as compared to WKY rats which was attenuated by rottlerin, an inhibitor of PKC δ . In addition, knocking down of PKC δ by PKC δ -siRNA also attenuated enhanced protein synthesis in VSMC from SHR. Furthermore, rottlerin attenuated the increased production of superoxide anion, NAD (P) H oxidase activity, increased expression of Gq α , PLC β 1, IGF-1R and EGFR proteins in VSMC from SHR. In addition, the enhanced phosphorylation of c-Src, PKC δ -Tyr³¹¹, IGF-1R, EGFR and ERK1/2 exhibited by VSMC from SHR was also attenuated by rottlerin. These results suggest that VSMC from SHR exhibit enhanced activity of PKC δ which through ROS, c-Src, growth factor receptor transactivation and MAP kinase signaling enhanced the expression of Gq α and PLC β 1 proteins and resultant VSMC hypertrophy in SHR.

Key words: PKC δ Tyr³¹¹, hypertrophy, Gq α /PLC β 1, SHR, VSMC.

Introduction

Essential hypertension is associated with vascular remodeling characterized by enhanced media to lumen ratio in arteries [1] and is due to increased vascular smooth muscle cells (VSMC) proliferation and hypertrophy. Guanine nucleotide regulatory proteins (G-proteins) and receptor tyrosine kinases (RTKs) play a major role in the regulation of vascular remodeling and aberration in the expression and/or activity of these molecules contribute to vascular remodeling [2-6]. The Gq α , a heterotrimeric G protein, and phospholipase C (PLC) β regulate phosphatidyl inositol (PI) turnover activated by many GPCR agonists such as Ang II, ET-1 and thrombin, and play an important role in mediating the prohypertrophic response by initiating other signaling mechanism including RTKs transactivation and MAP kinase activation [7-10]. The levels of Ang II and ET-1 are enhanced in VSMC from spontaneously hypertensive rats (SHR) [11,12] and promote VSMC hypertrophy [2] and proliferation [13] in an autocrine and paracrine way.

Postreceptor signaling pathways activated by growth promoting substances involve activation of protein kinase C (PKC) through 1,2-diacylglycerol (DAG) production and/or intracellular calcium [8,14]. PKC is an intracellular serine/threonine protein kinase family of at least 12 isotypes subdivided into three classes, conventional PKCs (cPKCs), novel PKCs (nPKCs) and atypical PKC (aPKCs), which have distinct functions. PKCs isozymes expression pattern vary according to cell type. PKC δ , PKC α and PKC ζ are the most abundant isozymes in VSMC [15,16]. The role of PKC isoforms in vascular hypertrophy is still insufficiently characterized and may vary according to cell type [17,18]. These intracellular serine/threonine kinases are rapidly activated and have been reported to be implicated in the

regulation of cell proliferation [19] and growth [20] and likely play an important role in mediating vascular remodeling. PKC δ is one of nPKCs isoforms that do not require Ca²⁺ but is activated by DAG [21-24]. During the last decade, PKC δ associated with tyrosine (Tyr)³¹¹ phosphorylation has emerged as a potential mediator in response to many stimuli including Ang II and thrombin [7,25]. Furthermore, the involvement of PKC δ in growth factor activation such as EGFR [8,9,26,27] and IGF-1R [28] has also been reported. However, the role of PKC δ in mediating vascular remodeling in essential hypertension and its possible cross-talk with other signaling mechanism implicated in this process has not yet been well characterized. We recently demonstrated the role of endogenous Ang II and ET-1 in enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and VSMC hypertrophy in spontaneously hypertensive rats through the activation of MAPK signaling [2]. We also showed that enhanced oxidative stress exhibited by VSMC from SHR through c-Src and growth factor receptor activation increases MAP kinase signaling and enhances the expression of Gq α and PLC β 1 proteins and results in VSMC hypertrophy [29]. However, the role of PKC δ in mediating vascular remodeling in essential hypertension has not yet been well characterized. The present study is therefore undertaken to examine if VSMC from SHR exhibit enhanced activation of PKC δ and its implication in VSMC hypertrophy and to further explore the signaling mechanism responsible for this process.

We showed that the enhanced activation of PKC δ in VSMC from SHR increases oxidative stress, c-Src and growth factor receptor transactivation that through MAP kinase signaling increases the expression of Gq α and PLC β 1 proteins and results in VSMC hypertrophy.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Rottlerin and lucigenin were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (St-Louis, Missouri, USA). Leucine, L-[4,5-³H(N)] and thymidine, L-[4,5-³H(N)] were purchased from Perkin Elmer (Boston, MA). Monoclonal Gq α antibody (10), monoclonal PLC- β 1 antibody (D-8), monoclonal (phospho)-ERK1/2 (phosphospecific-tyrosine-204) antibody, polyclonal (phospho)-PKC δ (phosphospecific-tyrosine-311)-R antibody, monoclonal PKC δ (G-9), polyclonal ERK1/2 antibody (C-14), monoclonal dynein IC1/2 antibody (74-1), and Western blotting reagents were from St Cruz biotech (Santa Cruz, CA, USA). Polyclonal (phospho)-EGFR antibody (phosphospecific-tyrosine-1173) was from Calbiochem. Polyclonal EGFR, IGF-1R, (phospho)-c-Src (phosphospecific-tyrosine-419) and (phospho)-IGF-1R (phosphospecific-tyrosine-1165/1166) antibodies were from St Cruz biotech. Monoclonal anti- β -actin antibody (A5441) and all other chemicals used in these experiments were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Animals, cell culture an incubation

Aortic VSMC from 16-wk-old SHR and age-matched WKY were cultured as described previously [30]. These cells were found to contain high levels of smooth muscle-specific actin. VSMC were plated in 75-cm² flasks and incubated at 37°C in 95% air-5% CO₂ humidified atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (with glucose, L-glutamine, and sodium bicarbonate) containing 1% antibiotics (containing penicillin, streptomycin, and amphotrecin B) and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). Cells were passaged upon reaching confluence with 0.5% trypsin and utilized between passages 2 and 6. Confluent cells

were starved by incubation for 24 hours in DMEM without FBS at 37°C to have cell quiescence. For the receptor antagonist studies, VSMC from SHR and WKY were incubated for 16 hours in the absence or presence of different concentrations of rottlerin (from 1 μ M to 10 μ M). After incubation, the cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in a 200 μ l buffer containing 25 mM Tris·HCl (pH 7.5), 25 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml aprotinin, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate, and 0.5 μ g/ml leupeptin on ice. The cell lysates were centrifuged at 12,000 g for 15 min at 4°C, and the supernatants were used for Western blot analysis. All the animal procedures used in the present study were approved by the Comité de Déontologie de l'Expérimentation sur les Animaux (CDEA) of the University of Montreal (#99050). The investigation conforms to the 'Guide for the Care and Use of Laboratory

Western blotting

The levels of protein expression and phosphorylation were determined by western blotting as described previously [2]. After SDS-PAGE, separated proteins were transferred to a nitrocellulose membrane with a semi-dry transblot apparatus at 15 V for 45 min (Gq α , G11 α , ERK1/2/p-ERK1/2) or a liquid transfer apparatus at 100 V for 1 h (PLC β 1, EGFR, pEGFR, IGFR, pIGFR, PKC δ , pPKC δ , c-Src and p-Src). Membranes were blocked with 5 % dry milk and incubated overnight with specific antibodies. β -actin was used as loading controls. The antibody-antigen complexes were detected by incubating the membranes with horseradish peroxidase-conjugated antibodies for 1 h at room temperature. The blots were washed three times with PBS before reaction with enhanced chemiluminescence (ECL).

Quantitative analysis of the proteins was performed by densitometric scanning of the autoradiographs using the enhanced laser densitometer LKB Ultrosan XL and quantified using the gel-scan XL evaluation software (version 2.1) from Pharmacia (Baie d'Urfé, Québec, Canada).

Determination of protein synthesis

VSMC from 16 week-old SHR and age-matched WKY were grown to confluence in 12-well culture plates. Protein synthesis (Cell hypertrophy) was evaluated by [³H]-leucine incorporation into cells as described previously [31]. Confluent cells were serum deprived for 24 hours to induce cell quiescence and were incubated in the absence or presence of rottlerin (ranged from 1 to 10 μ M) for 24 h. [³H]-leucine (2 μ Ci per well) was added at the same time as rottlerin. The cells were rinsed twice with ice-cold 1X PBS and incubated with 5% trichloroacetic acid (TCA) for 1 h at 4°C. After being washed twice with ice-cold 1X PBS, the cells were incubated with 0.4 N sodium hydroxide solution for 30 min at room temperature, and radioactivity was determined by liquid scintillation counter.

PKC δ downregulation with siRNA

For siRNA transfection efficiency, the manufacturer's protocol was followed. Briefly, VSMCs were seeded in a 12 well plate or petri dishes and cultured in antibiotic free normal growth medium supplemented with 10% FBS until the cells were 60% confluent (~48 hours). On the day of transfection, cells were washed with transfection medium (sc-36868) and incubated with 1ml of transfection reagent (sc-29528) containing 80 pmoles of either scrambled siRNA (sc-37007) or siRNA specific for PKC δ oligonucleotides for 12 hours. The

medium was replaced with normal DMEM (containing 10 % FBS and 1% antibiotics) for an additional 24 h (90% confluence).

Determination of superoxide anion and NADPH oxidase activity

The production of basal superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) was measured using the lucigenin-enhanced chemiluminescence method at a concentration of 5 μ M. After 24 hours of starvation, the VSMC were washed with oxygenated Krebs-Hepes buffer and placed in scintillation vials containing lucigenin solution. The emitted luminescence was measured with a liquid scintillation counter (Wallac 1409; Perkin Elmer Life Science, Saint-Laurent, Canada) for 5 min. The NAD (P) H oxidase activity was determined by adding NADH (100 μ M). The values were adjusted to the total weight of proteins for each sample.

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SEM. Comparisons between groups were made with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post-hoc test. A difference between groups was significant at $P < 0.05$.

Results

VSMC from SHR exhibit enhanced expression of PKC δ phosphorylation at Tyr³¹¹

Several vasoactive peptides such as Ang II and ET-1 have been shown to activate PKC δ [14,32]. PKC δ activation associated with phosphorylation at Tyr³¹¹ has been shown to mediate Ang II-induced VSMC hypertrophy [7]. Since VSMC from SHR exhibit enhanced levels of endogenous Ang II [11] and ET-1 [12] and enhanced protein synthesis [2], it was desirable to investigate if the VSMC hypertrophy in SHR is attributed to the overexpression of PKC δ phosphorylated at Tyr³¹¹. To test this, we determined the levels of PKC δ phosphorylated at Tyr³¹¹ in VSMC from SHR. The results shown in Figure 1 indicate that the level of PKC δ phosphorylated at Tyr³¹¹ was significantly enhanced by about 100 % in VSMC from SHR as compared to VSMC from WKY rats whereas the expression of PKC δ was not altered. The treatment of VSMC with different concentrations of rottlerin, an inhibitor of PKC δ , attenuated significantly the enhanced Tyr³¹¹ phosphorylation in a concentration-dependent manner and was drastically abolished at 10 μ M. In addition, rottlerin at 10 μ M attenuated significantly the phosphorylation level of PKC δ at Tyr³¹¹ in WKY control rats.

Role of PKC δ in VSMC hypertrophy in SHR

VSMC from SHR have been shown to exhibit hypertrophy (increased protein synthesis) [2]. To investigate the role of PKC δ in enhanced protein synthesis in VSMC from SHR, the effect of rottlerin was tested on protein synthesis in VSMC from SHR and age matched WKY rats and the results are shown in Figure 2. As reported earlier [2,33], protein synthesis was significantly augmented in VSMC from SHR by about 50 % as compared to WKY rats. Rottlerin attenuated the enhanced protein synthesis in a concentration-dependent

manner in VSMC from SHR. In addition, rottlerin also attenuated protein synthesis in VSMC from WKY rats.

To further investigate the implication of PKC δ in increased protein synthesis in VSMC from SHR, we used the siRNA approach to knockdown the PKC δ and examined the effect of the knockdown of PKC δ on protein synthesis in VSMC from SHR and WKY rats. Results shown in Figure 3 indicate that the treatment of VSMC with siRNA of PKC δ that attenuated the expression of PKC δ by 80 % (A, D) also inhibited the enhanced protein synthesis by about 70 % (C) in VSMC from SHR; however, this treatment did not affect significantly the expression of PKC δ as well as protein synthesis in VSMC from WKY rats. On the other hand, PKC δ knockdown attenuates slightly but significantly the PKC δ phosphorylation at Tyr³¹¹ in VSMC from SHR (A, B).

Role of PKC δ in enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins in VSMC from SHR

We have earlier shown the implication of enhanced expression of Gq α and PLC β 1 in enhanced protein synthesis in VSMC from 16 week-old SHR [2]. Since PKC δ is implicated in enhanced protein synthesis, it was of interest to examine if PKC δ contributes to the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 in VSMC from SHR. To test this, the effect of rottlerin on the expression of Gq α and PLC β 1 was investigated in VSMC from SHR and WKY rats and the results are shown in Figure 4. As reported earlier[2], the expression of Gq α (A) and PLC β 1 (B) was significantly augmented by about 165 and 115 % respectively in VSMC from SHR as compared to WKY rats and rottlerin significantly inhibited the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins in a concentration dependant manner and at 10 μ M, it was attenuated completely to WKY control level.

Implication of PKC δ in enhanced production of superoxide anion and NADPH oxidase activity in VSMC from SHR

PKC δ activation has been shown to enhance NADPH oxidase activity and the levels of reactive oxygen species [34]. To investigate if enhanced activation (phosphorylation at Tyr³¹¹) of PKC δ in VSMC from SHR is implicated in enhanced oxidative stress that results in enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and protein synthesis, the effect of rottlerin on production of O₂⁻ and NADPH oxidase activity was examined in VSMC from SHR and WKY rats. Results shown in Figure 5 indicate that as reported earlier [35], O₂⁻ production (Figure 5A) and NADPH oxidase activity (Figure 5B) were enhanced in VSMC from SHR as compared to WKY rats by about 110 % and 100 %, respectively and rottlerin significantly attenuated the enhanced levels of O₂⁻ as well as NADPH oxidase activity in a concentration-dependant manner and at 10 μ M these were completely attenuated to control WKY levels. In addition, rottlerin also attenuated the basal O₂⁻ and NADPH oxidase activity in VSMC from WKY rats. These results suggest that the enhanced activation of PKC δ through the enhanced oxidative stress contributes to the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and resultant VSMC hypertrophy.

Implication of PKC δ in c-Src activation in VSMC from SHR

Since PKC δ is implicated in enhanced production of ROS which through c-Src activation has been shown to enhance the expression of Gq α and PLC β 1 protein and VSMC hypertrophy in SHR [29] it was of interest to investigate the role of PKC δ in c-Src activation. To test this, the effect of rottlerin on c-Src phosphorylation was examined in VSMC from SHR and WKY rats and the results are shown in Figure 6. The increased phosphorylation of c-

Src at Tyr⁴¹⁹ (70%) was completely attenuated by rottlerin at all the concentrations used (1 μ M-5 μ M) and at 10 μ M it was completely abolished whereas it did not have any significant effect in VSMC from WKY rats. Furthermore, the expression level of total c-Src molecule was not altered in VSMC from SHR as compared to WKY rats, and rottlerin did not affect the expression level of c-Src.

Implication of PKC δ in ERK1/2 Phosphorylation

Since enhanced phosphorylation of ERK1/2 was shown to be implicated in enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and protein synthesis in VSMC from SHR [2], it was of interest to examine the contribution of PKC δ , upstream signaling molecule, in the enhanced phosphorylation of ERK1/2 in VSMC from SHR. To test this, we examined the effects of rottlerin on ERK1/2 phosphorylation in VSMC from SHR and WKY rats and the results are shown in Figure 7. As reported earlier [2], ERK1/2 phosphorylation was significantly enhanced by about 75% in VSMC from SHR as compared to WKY rats. Treatment of cells with rottlerin attenuated significantly the enhanced phosphorylation of ERK1/2 in a concentration-dependant manner in VSMC from SHR and at 5 and 10 μ M it was completely attenuated to control level. In addition, rottlerin at 5 μ M and 10 μ M inhibited significantly the ERK1/2 phosphorylation in VSMC from WKY rats by about 35% and 50% respectively.

Implication of PKC δ in growth factor receptor expression and activation

We earlier showed that growth factor receptor transactivation and MAP Kinase signaling plays a role in the overexpression of Gq α and PLC β 1 proteins and VSMC hypertrophy in SHR [29]. To further investigate the role of PKC δ in growth factor receptor transactivation and/or expression, the effect of rottlerin on the phosphorylation of EGFR and

IGF-1R using specific phospho-tyrosine antibodies was examined in VSMC from SHR and the results are shown in Figure 8. Phospho-specific-Tyr¹¹⁷³-EGFR detected a single band at 160 kDa (A) and phospho-specific-Tyr^{1165/1166}-IGF-1R detected a single band at 90 kDa corresponding to IGF-1R (Figure B8), in VSMC from both SHR and WKY rats. However, as reported earlier [29], the extent of growth factor receptor phosphorylation was greater in VSMC from SHR compared to VSMC from WKY rats. The phosphorylation of IGF-1R was increased by approximately 110% in VSMC from SHR compared to WKY rats, whereas the phosphorylation of EGFR was augmented by about 80%. The enhanced phosphorylation of EGFR at Tyr¹¹⁷³ was attenuated completely by rottlerin (from 1 μ M to 5 μ M), whereas these concentrations of rottlerin were ineffective in reducing significantly the phosphorylation level of EGFR in VSMC from WKY. At a concentration of 10 μ M, rottlerin abolished drastically the enhanced phosphorylation of EGFR in VSMC from SHR and attenuated significantly the phosphorylation level of EGFR by about 50 % in WKY control cells. The treatment with different concentration of rottlerin inhibited significantly the increased phosphorylation of IGF-1R (Figure 8B) in a concentration dependant manner. Furthermore, these treatments decrease also the phosphorylation level in VSMC from WKY. In addition, the expression levels of EGFR (Figure 8A) and IGF-1R (Figure 8B) were also augmented by about 200% and 100% respectively in VSMC from SHR as compared to WKY rats, which was attenuated significantly by rottlerin. Furthermore, rottlerin also attenuated significantly the protein expression of EGFR in VSMC from WKY rats.

DISCUSSION

Ang II-induced VSMC hypertrophy has been shown to involve PKC δ [7]. In addition, this serine-threonine kinase was also reported to be involved in the processes of cardiac hypertrophy [36,37]. We earlier showed the role of endogenous Ang II and ET-1 in the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and the enhanced protein synthesis in VSMC from SHR through MAPKs signaling [2]. In the present study, we demonstrate the implication of enhanced PKC δ activation (associated with PKC δ phosphorylation at Tyr³¹¹) in the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis in VSMC from spontaneously hypertensive rats (SHR).

We show that VSMC from 16-week-old SHR exhibit enhanced PKC δ phosphorylation at Tyr³¹¹ which may contribute to the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins as well as enhanced protein synthesis because PKC δ inhibition with rottlerin, as quantified by the phosphorylation level at Tyr³¹¹, attenuated significantly the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and the enhanced protein synthesis in VSMC from SHR. This was further supported by our study showing that knockdown of PKC δ with specific siRNA attenuated significantly the enhanced protein synthesis in VSMC from SHR. Our results are in agreement with the study of Nakashima et al who have shown the implication of PKC δ associated with enhanced phosphorylation at Tyr³¹¹ in Ang II-induced VSMC hypertrophy [7]. It should be noted that rottlerin has been used as a putative inhibitor of PKC δ in several studies during the last 20 years in order to block the activity of PKC δ [38,39], that was correlated with increased PKC δ phosphorylation [40]. In addition, rottlerin was also shown to inhibit PKC δ activity through mitochondria uncoupling mechanism [41].

PKC δ has been shown to be activated by hyperglycemia induced oxidative stress [42].

Furthermore, PKC δ activation was also associated with the process of atherosclerosis implicating LDL oxidation [43]. Our results showing that the inhibition of PKC δ activity with rottlerin results in a significant attenuation of NADPH oxidase activity and O₂⁻ production and suggest the implication of PKC δ in ROS production in VSMC. Our results are consistent with other studies demonstrating the inhibition of ROS production by rottlerin in many cell types including VSMCs and adipocytes [44,45]. A role of PKC δ in NADPH oxidase activation has been reported in various cells [46]. The mechanisms by which PKC δ activates NADPH oxidase is not clear but may involve the phosphorylation of the cytoplasmic subunits of the oxidase, such as p47^{phox}, and initiates its translocation to the membrane [47,48]. In this regard, a role of PKC δ in p47^{phox} activation of NADPH oxidase in Ang II-induced ROS production and VSMC hypertrophy has been shown [34]. In addition, PKC δ activation has also been shown to mediate its effects through increasing ROS production and NADPH subunits expression [26,49]. We earlier showed that enhanced oxidative stress exhibited by VSMC from SHR contributes to the overexpression of Gq α and PLC β 1 proteins as well as to enhanced protein synthesis [29]. Taken together, it may be suggested that PKC δ -induced enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins as well as enhanced protein synthesis in VSMC from SHR is also mediated through its ability to increase oxidative stress.

We earlier showed a role of c-Src in enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins as well as in enhanced protein synthesis in VSMC from SHR [29]. In this study, we show that the augmented phosphorylation of c-Src in VSMC from SHR is attributed to the enhanced activation of PKC δ because the inhibition of PKC δ by rottlerin attenuated the enhanced phosphorylation of c-Src. Furthermore, the oxidative stress has been demonstrated to be the upstream signaling molecule of c-Src (2). Taken together, it may be suggested that the

enhanced activation of PKC δ through oxidative stress and activation of c-Src contributes to the overexpression of Gq α and PLC β 1 proteins as well as to the enhanced protein synthesis in VSMC from SHR.

As demonstrated in this study, VSMC from SHR exhibit enhanced expression of EGFR and IGF-1R which may be associated with cell dedifferentiation to a synthetic profile characterized by enhanced protein synthesis. The implication of growth factor receptors in enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis in VSMC from SHR has been shown in an earlier study [29]. In addition; we also showed that c-Src is the upstream of growth factor receptor activation [29]. The transactivation of several receptor tyrosine kinases (RTKs) has also been reported to involve c-Src molecule [50-52]. Our results showing that rottlerin inhibited the increased phosphorylation of IGF-1R and EGFR, suggest the role of PKC δ in enhanced activation of growth factor receptors in VSMC from SHR. In this regard, Hsieh et al have shown a pivotal role of PKC δ in thrombin induced EGFR expression in VSMC [8].

A role of MAPK in enhanced expression of Gq α /PLC β 1 proteins and enhanced protein synthesis in VSMC from SHR has been shown [2]. Growth factor receptors have also been reported to signal through MAP kinase pathways [50,53]. The fact that rottlerin inhibited the enhanced phosphorylation of ERK1/2 in VSMC from SHR suggests the implication of PKC δ in enhanced activation of MAPkinase. In this context, the inhibition of PKC δ with rottlerin has been reported to inhibit the ET-1 induced MAPK activity in VSMC [54]. Taken together, it may be suggested that enhanced activity of PKC δ in VSMC from SHR through the transactivation of growth factor receptors and MAP kinase signaling increase the expression of Gq α and PLC β 1 and results in VSMC hypertrophy. In summary, we provide evidence that the

enhanced activation of PKC δ at Tyr³¹¹ phosphorylation in VSMC from SHR through oxidative stress and c-Src transactivate growth factor receptor which increase the activity of MAP kinase and contributes to the enhanced expression of Gq α and PLC β 1 proteins and VSMC hypertrophy (Figure 9).

References

1. Korsgaard N, Aalkjaer C, Heagerty AM, Izzard AS, Mulvany MJ (1993) Histology of subcutaneous small arteries from patients with essential hypertension. *Hypertension* 22: 523-526.
2. Atef ME, Anand-Srivastava MB (2014) Enhanced expression of Gqalpha and PLC-beta1 proteins contributes to vascular smooth muscle cell hypertrophy in SHR: role of endogenous angiotensin II and endothelin-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 307: C97-106.
3. Berk BC (2001) Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev* 81: 999-1030.
4. Delafontaine P, Song YH, Li Y (2004) Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 435-444.
5. Dreux AC, Lamb DJ, Modjtahedi H, Ferns GA (2006) The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis. *Atherosclerosis* 186: 38-53.
6. Zhu B, Zhao G, Witte DP, Hui DY, Fagin JA (2001) Targeted overexpression of IGF-I in smooth muscle cells of transgenic mice enhances neointimal formation through increased proliferation and cell migration after intraarterial injury. *Endocrinology* 142: 3598-3606.
7. Nakashima H, Frank GD, Shirai H, Hinoki A, Higuchi S, et al. (2008) Novel role of protein kinase C-delta Tyr 311 phosphorylation in vascular smooth muscle cell hypertrophy by angiotensin II. *Hypertension* 51: 232-238.
8. Hsieh HL, Tung WH, Wu CY, Wang HH, Lin CC, et al. (2009) Thrombin induces EGF receptor expression and cell proliferation via a PKC(delta)/c-Src-dependent pathway in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 1594-1601.
9. Hsieh HL, Sun CC, Wang TS, Yang CM (2008) PKC-delta/c-Src-mediated EGF receptor transactivation regulates thrombin-induced COX-2 expression and PGE(2) production in rat vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1783: 1563-1575.

10. Gavi S, Shumay E, Wang HY, Malbon CC (2006) G-protein-coupled receptors and tyrosine kinases: crossroads in cell signaling and regulation. *Trends Endocrinol Metab* 17: 48-54.
11. Fukuda N, Satoh C, Hu WY, Soma M, Kubo A, et al. (1999) Production of angiotensin II by homogeneous cultures of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1210-1217.
12. Lu MH, Chao CF, Huang CG, Chang LT (2003) Coculture of vascular endothelial cells and smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 25: 413-425.
13. Li Y, Levesque LO, Anand-Srivastava MB (2010) Epidermal growth factor receptor transactivation by endogenous vasoactive peptides contributes to hyperproliferation of vascular smooth muscle cells of SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299: H1959-1967.
14. Frank GD, Saito S, Motley ED, Sasaki T, Ohba M, et al. (2002) Requirement of Ca²⁺ and PKC δ for Janus kinase 2 activation by angiotensin II: involvement of PYK2. *Mol Endocrinol* 16: 367-377.
15. Ohanian V, Ohanian J, Shaw L, Scarth S, Parker PJ, et al. (1996) Identification of protein kinase C isoforms in rat mesenteric small arteries and their possible role in agonist-induced contraction. *Circ Res* 78: 806-812.
16. Leszczynski D, Joenvaara S, Foegh ML (1996) Protein kinase C- α regulates proliferation but not apoptosis in rat coronary vascular smooth muscle cells. *Life Sci* 58: 599-606.
17. Chen C, Mochly-Rosen D (2001) Opposing effects of delta and xi PKC in ethanol-induced cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 33: 581-585.
18. Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, et al. (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L429-438.
19. Sasaguri T, Kosaka C, Hirata M, Masuda J, Shimokado K, et al. (1993) Protein kinase C-mediated inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation: the isoforms that may mediate G1/S inhibition. *Exp Cell Res* 208: 311-320.

20. Miyamoto A, Nakayama K, Imaki H, Hirose S, Jiang Y, et al. (2002) Increased proliferation of B cells and auto-immunity in mice lacking protein kinase Cdelta. *Nature* 416: 865-869.
21. Andrea JE, Walsh MP (1992) Protein kinase C of smooth muscle. *Hypertension* 20: 585-595.
22. Kikkawa U, Matsuzaki H, Yamamoto T (2002) Protein kinase C delta (PKC delta): activation mechanisms and functions. *J Biochem* 132: 831-839.
23. Nishizuka Y (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607-614.
24. Ron D, Kazanietz MG (1999) New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J* 13: 1658-1676.
25. Hall KJ, Jones ML, Poole AW (2007) Coincident regulation of PKCdelta in human platelets by phosphorylation of Tyr311 and Tyr565 and phospholipase C signalling. *Biochem J* 406: 501-509.
26. Fan CY, Katsuyama M, Yabe-Nishimura C (2005) PKCdelta mediates up-regulation of NOX1, a catalytic subunit of NADPH oxidase, via transactivation of the EGF receptor: possible involvement of PKCdelta in vascular hypertrophy. *Biochem J* 390: 761-767.
27. Uchiyama K, Saito M, Sasaki M, Obara Y, Higashiyama S, et al. (2009) Thromboxane A2 receptor-mediated epidermal growth factor receptor transactivation: involvement of PKC-delta and PKC-epsilon in the shedding of epidermal growth factor receptor ligands. *Eur J Pharm Sci* 38: 504-511.
28. Li W, Jiang YX, Zhang J, Soon L, Flechner L, et al. (1998) Protein kinase C-delta is an important signaling molecule in insulin-like growth factor I receptor-mediated cell transformation. *Mol Cell Biol* 18: 5888-5898.
29. Atef ME, Anand-Srivastava MB (2015) Oxidative stress contributes to the enhanced expression of Gqα/PLCβ1 proteins and hypertrophy of VSMC from SHR: role of growth factor receptors transactivation (Abstract). *Canadian Hypertension Congress*, October 22-24. pp. 47.
30. Anand-Srivastava MB, Franks DJ, Cantin M, Genest J (1982) Presence of "Ra" and "P"-site receptors for adenosine coupled to adenylate cyclase in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 108: 213-219.

31. Li Y, Hashim S, Anand-Srivastava MB (2006) Intracellular peptides of natriuretic peptide receptor-C inhibit vascular hypertrophy via Gqalpha/MAP kinase signaling pathways. *Cardiovasc Res* 72: 464-472.
32. Clerk A, Bogoyevitch MA, Anderson MB, Sugden PH (1994) Differential activation of protein kinase C isoforms by endothelin-1 and phenylephrine and subsequent stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases in ventricular myocytes cultured from neonatal rat hearts. *J Biol Chem* 269: 32848-32857.
33. Atef ME, Anand-Srivastava MB (2011) Enhanced Expression of G(alpha)q and PLC{beta}1 in Aortic Vascular Smooth Muscle Cells from Spontaneously Hypertensive Rats: Role of Endogenous Angiotensin II and Endothelin-1 (Abstract). *FASEB J* 25: 1009.1009.
34. Lv P, Miao SB, Shu YN, Dong LH, Liu G, et al. (2012) Phosphorylation of smooth muscle 22alpha facilitates angiotensin II-induced ROS production via activation of the PKCdelta-P47phox axis through release of PKCdelta and actin dynamics and is associated with hypertrophy and hyperplasia of vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Circ Res* 111: 697-707.
35. Saha S, Li Y, Anand-Srivastava MB (2008) Reduced levels of cyclic AMP contribute to the enhanced oxidative stress in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 86: 190-198.
36. Braun MU, LaRosee P, Simonis G, Borst MM, Strasser RH (2004) Regulation of protein kinase C isozymes in volume overload cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biochem* 262: 135-143.
37. Koide Y, Tamura K, Suzuki A, Kitamura K, Yokoyama K, et al. (2003) Differential induction of protein kinase C isoforms at the cardiac hypertrophy stage and congestive heart failure stage in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens Res* 26: 421-426.
38. Frasch SC, Henson PM, Kailey JM, Richter DA, Janes MS, et al. (2000) Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta. *J Biol Chem* 275: 23065-23073.
39. Li C, Wernig F, Leitges M, Hu Y, Xu Q (2003) Mechanical stress-activated PKCdelta regulates smooth muscle cell migration. *FASEB J* 17: 2106-2108.

40. Steinberg SF (2004) Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta. *Biochem J* 384: 449-459.
41. Soltoff SP (2001) Rottlerin is a mitochondrial uncoupler that decreases cellular ATP levels and indirectly blocks protein kinase Cdelta tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 276: 37986-37992.
42. Ha H, Yu MR, Choi YJ, Lee HB (2001) Activation of protein kinase c-delta and c-epsilon by oxidative stress in early diabetic rat kidney. *Am J Kidney Dis* 38: S204-207.
43. Larroque-Cardoso P, Swiader A, Ingueneau C, Negre-Salvayre A, Elbaz M, et al. (2013) Role of protein kinase C delta in ER stress and apoptosis induced by oxidized LDL in human vascular smooth muscle cells. *Cell Death Dis* 4: e520.
44. Lee IT, Lin CC, Wang CH, Cherng WJ, Wang JS, et al. (2013) ATP stimulates PGE(2)/cyclin D1-dependent VSMCs proliferation via STAT3 activation: role of PKCs-dependent NADPH oxidase/ROS generation. *Biochem Pharmacol* 85: 954-964.
45. Talior I, Tennenbaum T, Kuroki T, Eldar-Finkelman H (2005) PKC-delta-dependent activation of oxidative stress in adipocytes of obese and insulin-resistant mice: role for NADPH oxidase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E405-411.
46. Bankers-Fulbright JL, Kita H, Gleich GJ, O'Grady SM (2001) Regulation of human eosinophil NADPH oxidase activity: a central role for PKCdelta. *J Cell Physiol* 189: 306-315.
47. Fontayne A, Dang PM, Gougerot-Pocidallo MA, El-Benna J (2002) Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry* 41: 7743-7750.
48. Reeves EP, Dekker LV, Forbes LV, Wientjes FB, Grogan A, et al. (1999) Direct interaction between p47phox and protein kinase C: evidence for targeting of protein kinase C by p47phox in neutrophils. *Biochem J* 344 Pt 3: 859-866.
49. Greene MW, Burrington CM, Lynch DT, Davenport SK, Johnson AK, et al. (2014) Lipid metabolism, oxidative stress and cell death are regulated by PKC delta in a dietary model of nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One* 9: e85848.
50. Gomez Sandoval YH, Anand-Srivastava MB (2011) Enhanced levels of endogenous endothelin-1 contribute to the over expression of G1alpha protein in vascular smooth

- muscle cells from SHR: Role of growth factor receptor activation. *Cell Signal* 23: 354-362.
51. Liebmann C (2001) Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal* 13: 777-785.
 52. Luttrell LM, Della Rocca GJ, van Biesen T, Luttrell DK, Lefkowitz RJ (1997) Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J Biol Chem* 272: 4637-4644.
 53. Katz M, Amit I, Yarden Y (2007) Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1161-1176.
 54. Chen QW, Edvinsson L, Xu CB (2009) Role of ERK/MAPK in endothelin receptor signaling in human aortic smooth muscle cells. *BMC Cell Biol* 10: 52.

Figures legends

Figure 1. Effect of rottlerin on PKC δ phosphorylation at Tyr³¹¹ in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats. VSMC from 16 week-old SHR and age matched WKY rats were incubated with different concentration of rottlerin. The cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against PKC δ and (phospho)-PKC δ ³¹¹ as described in Materials and Methods. The β -actin was used as a loading control. The proteins were quantified by densitometric scanning. The results are expressed as percentage of control, taken as 100%. Values are means \pm SEM of 5 separate experiments using different cell cultures. *P < 0.05, ***P < 0.001 vs. WKY rats; ### P < 0.001 vs. SHR

Figure 2. Effect of rottlerin on protein synthesis in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats. VSMC from 16 week-old SHR and age matched WKY rats were incubated with different concentration of rottlerin (from 1 μ M to 10 μ M). Protein synthesis was determined by [³H]-leucine incorporation as described in Materials and Methods. The results are expressed as a percentage of control, taken as 100%. Values are means \pm SEM of 4 separate experiments using different cell cultures. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. WKY rats; ### P < 0.001 vs. SH.

Figure 3. Effect of the knockdown of PKC δ on protein synthesis in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats. VSMC from 16 week-old SHR and age matched WKY rats were incubated in the absence or presence of PKC δ siRNA for 16 hours as described in Materials and Methods. The cell lysates were

prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against PKC δ and (phospho) PKC δ^{311} , and the β -actin was used as a loading control (A). The proteins were quantified by densitometric scanning (B, D) and the protein synthesis was determined by [3 H]-leucine incorporation (C) as described in Materials and Methods. The results are expressed as percentage of control, taken as 100%. Values are means \pm SEM of 3 separate experiments using different cell cultures. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. WKY rats; # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 vs. SHR

Figure 4. Effect of rottlerin on enhanced expression of Gq α /PLC β 1 in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats. VSMC from 16 week-old SHR and age matched WKY rats were incubated with different concentration of rottlerin. The cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against Gq α and PLC β 1 (A, B upper panels) as described in Materials and Methods. The β -actin was used as a loading control. The proteins were quantified by densitometric scanning (A, B lower panels). The results are expressed as percentage of control, taken as 100%. Values are means \pm SEM of 4 separate experiments using different cell cultures. *P < 0.05, ***P < 0.001 vs. WKY rats; # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 vs. SHR

Figure 5. Effect of rottlerin on NADPH activity and ROS production in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats. VSMC from 16 week-old SHR and age matched WKY rats were incubated in the absence or presence of different concentration of rottlerin (from 1 μ M to 10 μ M) for 16 hours, and O $_2$ production (A)

and NADPH activity (B) were determined as described in Materials and Methods. The results are presented as means \pm SEM of 4 separate experiments using different cell cultures. ***P < 0.001 vs. WKY rats; # P < 0.05, ### P < 0.001 vs. SHR.

Figure 6. Effect of PKC δ inhibition on c-Src activity in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats. VSMC were incubated in the presence or absence of rottlerin (from 1 μ M to 10 μ M) for 16 hours. Membranes were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies (phospho)-c-Src and c-Src (upper panels) as described in Materials and Methods. The proteins were quantified by densitometric scanning (lower panels). The results are expressed as a percentage of control taken as 100%. Values are means \pm SEM of 3 separate experiments using different cell cultures. ***P < 0.001 vs. WKY rats; ### P < 0.001 vs. SHR.

Figure 7. Effect of PKC δ inhibition on p42/44MAPK signaling in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats. VSMC were incubated in the presence or absence of rottlerin (from 1 μ M to 10 μ M) for 16 hours. Membranes were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against pERK1/2 and ERK1/2 (upper panels) as described in Materials and Methods. The proteins were quantified by densitometric scanning (lower panels). The results are expressed as a percentage of control taken as 100%. Values are means \pm SEM of 3 separate experiments using different cell cultures. *P < 0.05, ***P < 0.001 vs. WKY rats; # P < 0.05, ### P < 0.001 vs. SHR.

Figure 8. Effect of rottlerin on EGF-R and IGF-1R phosphorylation and expression in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 16-weeks old SHR and age-matched WKY rats. VSMC were treated with different concentration of rottlerin for 16 hours. The cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against EGF-R/pEGF-R and IGF-1R/p-IGF-1R (A, B upper panels) as described in Materials and methods. The proteins were quantified by densitometric scanning (A, B lower panels). The results are expressed as percentage of control, taken as 100%. Values are means \pm SEM of 5 separate experiments using different cell cultures. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. WKY rats; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. SHR.

Figure 9. The possible intracellular signaling mechanisms implicated the endogenous enhanced PKC δ activation associated with enhanced PKC δ phosphorylation at Tyr³¹¹ in VSMC hypertrophy and associated signaling. PKC δ through the activation of ROS production and c-Src, transactivate RTKs and MAPK signaling, which increases the protein expression of G $_q$ α /PLC- β 1, EGF-R and IGF-1R and results in enhanced protein synthesis.

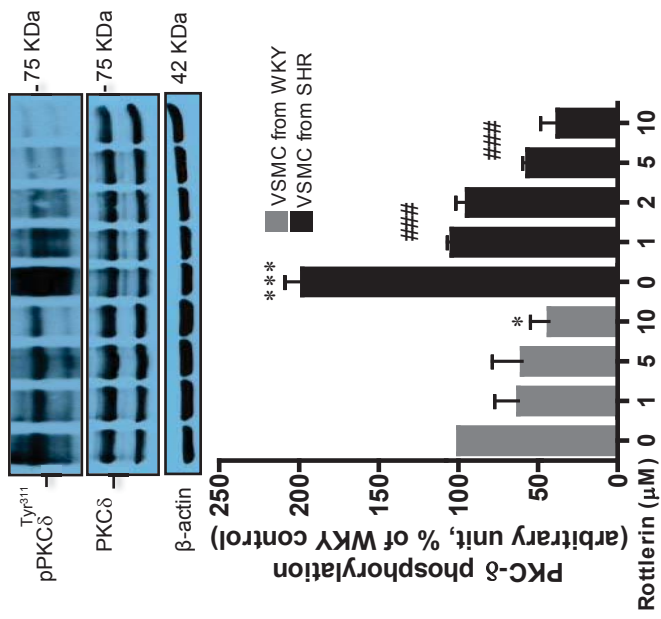


Figure 1

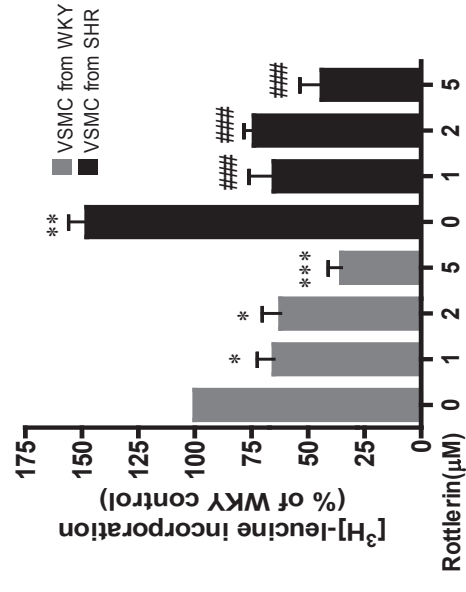


Figure 2

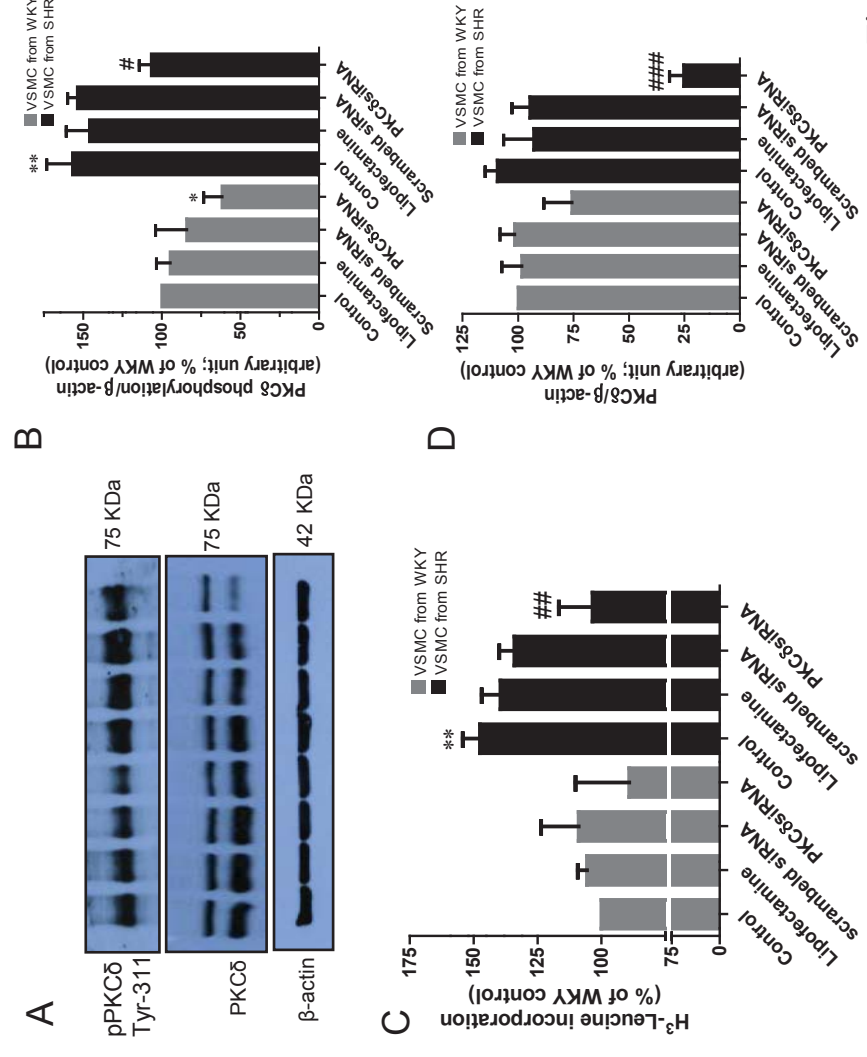


Figure 3

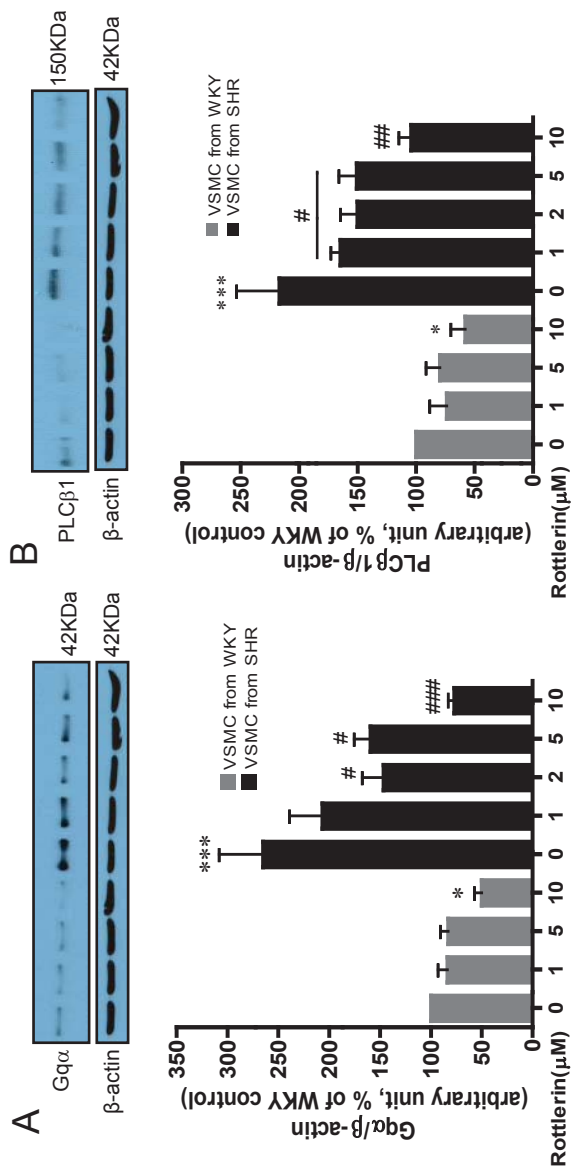


Figure 4

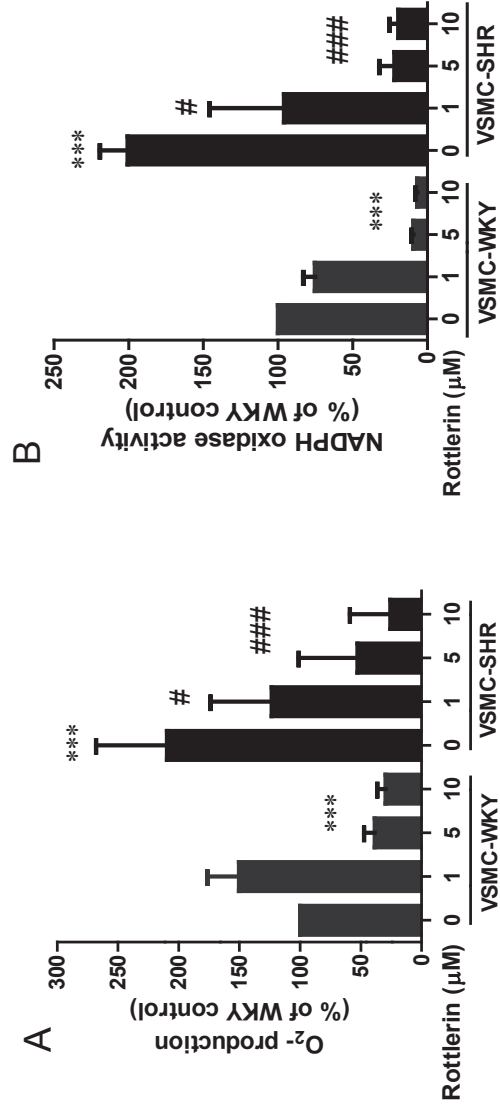


Figure 5

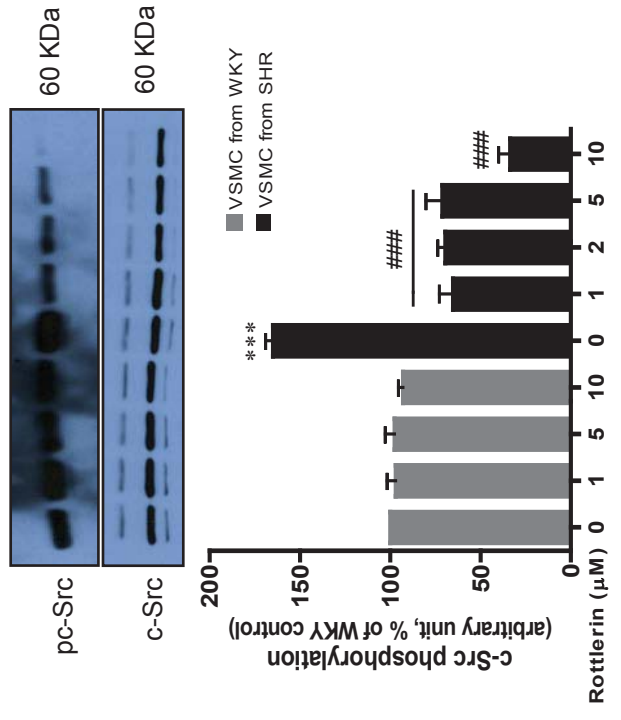


Figure 6

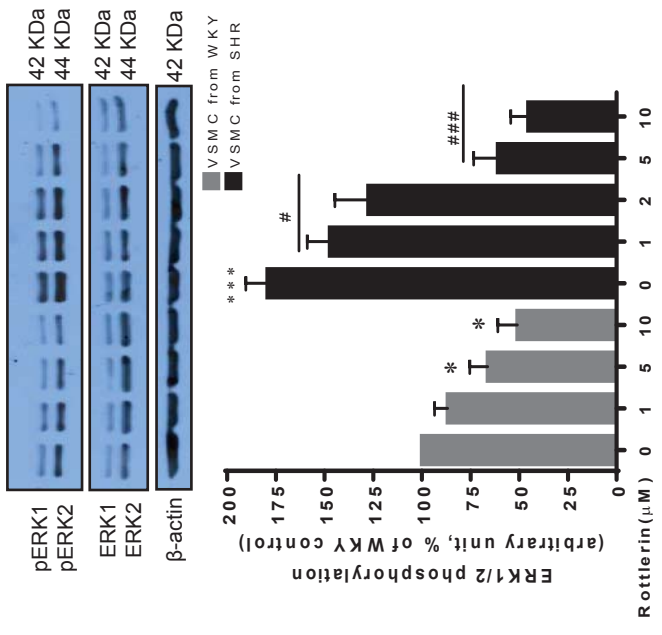


Figure 7

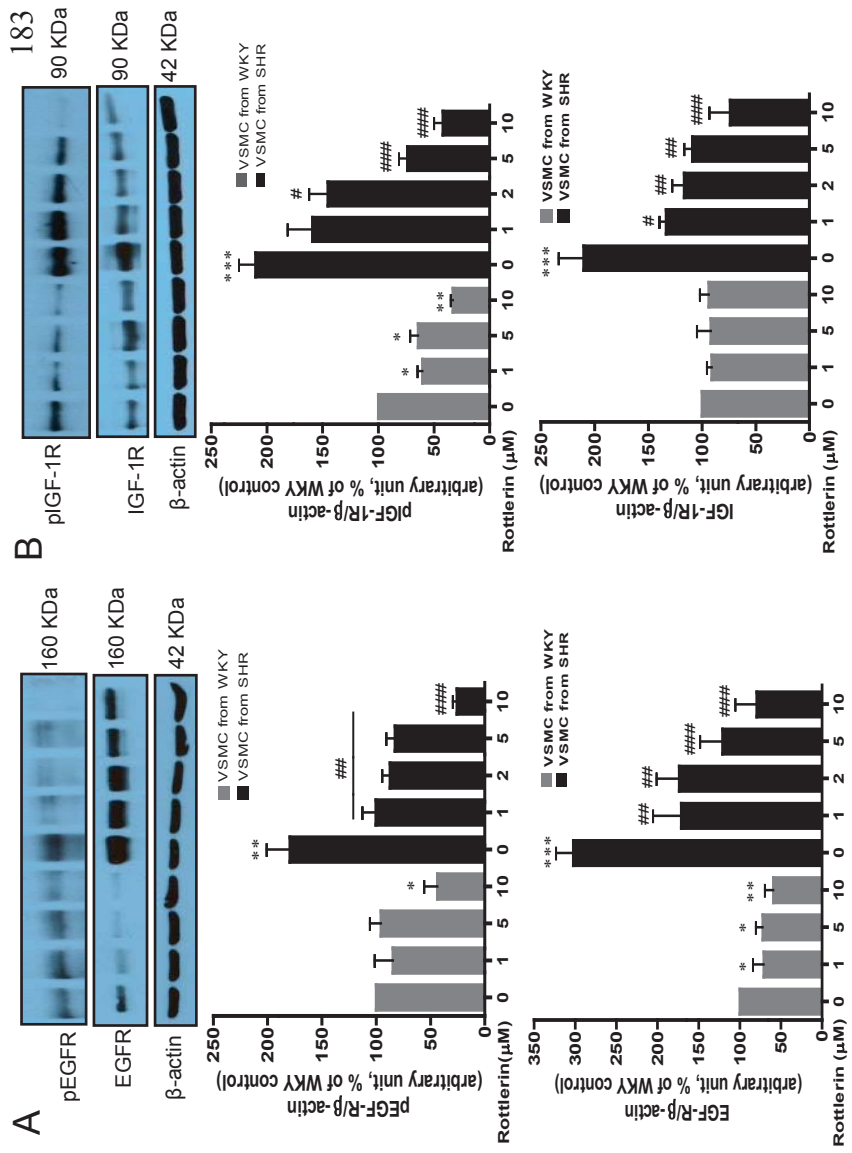


Figure 8

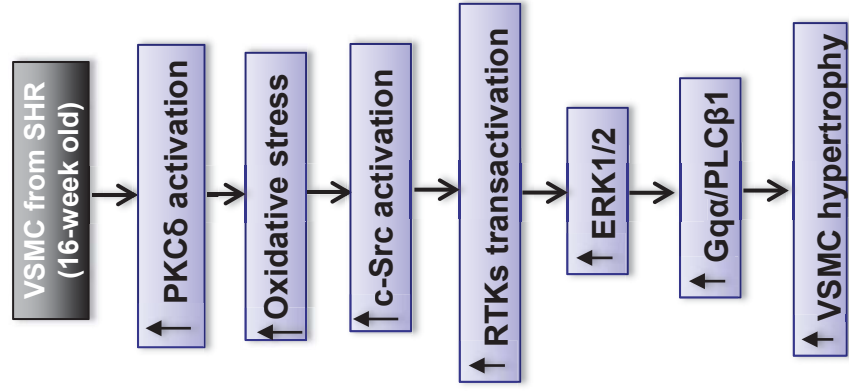


Figure 9

Chapitre III

DISCUSSION, CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

Discussion générale

En principe, le remodelage vasculaire reflète une réponse compensatoire caractérisée par une hypertrophie artérielle et une fibrose liée à une augmentation de la pression artérielle (Mourad et al 1998). Une hypertrophie des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) est un facteur potentiel du développement de la rigidité aortique et de la diminution de la compliance aortique de grosses artères de conduction (Seals 2003, Zieman et al 2005). Des recherches cliniques d'association sur une large population ont montré une corrélation significative, entre la diminution de la compliance aortique et le remodelage de l'artériole rétinale (Cheung et al 2007). Effectivement, de par son emplacement anatomique à la sortie du ventricule gauche, l'aorte joue un rôle modulateur important de la circulation sanguine.

La culture cellulaire constitue un outil méthodologique important pour étudier le comportement des CMLVs indépendamment des autres cofacteurs (Weissberg et al 1995). Afin d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypertrophie des CMLVs de l'aorte, l'artère de conduction la plus importante, nous avons procédé à une culture primaire de CMLVs de SHR et de WKY à l'âge de 12 semaines et à l'âge de 16 semaines. Nos premiers résultats montrent qu'à l'âge de 16 semaines, on assiste à une augmentation endogène de l'expression protéique de Gq α et de PLC β 1 dans les CMLVs de SHR par rapport aux rats contrôles WKY. Cette altération de l'expression protéique de Gq α et de PLC β 1 n'est pas remarquée dans les CMLVs à l'âge de 12 semaines (absence d'hypertrophie cardiaque). En effet, par l'utilisation du rapport poids cardiaque/poids corporel, nous avons pu déterminer que les SHR âgés de 16 semaines, présentent une hypertrophie cardiaque par rapport à des SHR âgés de 12 semaines en comparaison aux rats WKY normotendus appariés pour l'âge. De plus,

nous avons remarqué que cette hypertrophie est associée à une augmentation endogène du niveau d'expression protéique de Gq α au niveau du muscle cardiaque de SHR (données non publiées). Dans le même contexte, des études ont rapporté que la surexpression de la sous-unité Gq α (souris transgéniques) est associée à un dysfonctionnement contractile (Yatani et al 1999), une hypertrophie des cardiomyocytes (Adams et al 1998), une hypertrophie pathologique du ventricule gauche (D'Angelo et al 1997, Tao et al 2012) et une insuffisance cardiaque (D'Angelo et al 1997, Dai et al 2011). La surexpression protéique de PLC β 1 et de Gq α a été aussi remarquée au niveau du tissu cardiaque post-infarctus (Ju et al 1998).

Des recherches sur des souris transgéniques exprimant un peptide inhibiteur de la protéine Gq α (GqI) au niveau des CMLVs ont permis d'élucider, et pour la première fois, le rôle déterminant de la voie de signalisation de Gq α vasculaire dans l'hypertension et l'hypertrophie cardiaque induite par des hormones vasoactives (Keys et al 2002). Nos recherches ont révélé un rôle important de la voie de signalisation de Gq α dans l'hypertrophie des CMLVs provenant d'un modèle animal d'hypertension essentielle (SHR: *spontaneously hypertensive rats*). Effectivement, par l'utilisation d'une approche de la génétique moléculaire (l'interférence de l'ARNm), nous avons pu démontrer pour la première fois, l'implication de Gq α et de l'isoforme PLC β 1 dans la réponse hypertrophique endogène de CMLVs de SHR. En effet, la réduction du niveau d'expression protéique de Gq α et de PLC β 1 dans les CMLVs par des petits ARNm interférents (siRNA) et/ou des oligonucleotides antisense spécifiques à l'ARNm de chaque protéine, ont permis d'inhiber significativement l'hypertrophie des CMLVs de SHR.

Dans le cas de l'hypertension, les artères sont sujettes à un processus d'hypertrophie vasculaire associée à une activation locale du système rénine angiotensine (Morishita et al

1994, Morishita et al 1992, Shiota et al 1992). Indépendamment des autres facteurs systémiques, l'Ang II synthétisées localement par le tissu vasculaire (Campbell 1987, Campbell & Habener 1986, Paul & Ganten 1992), induit une hypertrophie des CMLVs d'une manière autocrine et paracrine selon plusieurs mécanismes impliquant des voies de signalisation liées au récepteur AT1 (Berk 2001, Berk & Rao 1993, Berk et al 1989, Geisterfer et al 1988, Gibbons et al 1992, Naftilan et al 1989). Même si le rôle du récepteur AT1 de l'Ang II dans l'hypertrophie de la CMLV ait été bien établi (Geisterfer et al 1988, Griendling et al 1997), ce n'est qu'en 2008 qu'Ohtsu et ses collaborateurs ont démontré un lien de causalité entre la protéine Gq α et la réponse hypertrophique de la CMLV induite par l'Ang II, selon un mécanisme dépendant de la transactivation de l'EGFR (Ohtsu et al 2008). Dans le même contexte, Keys et collaborateurs avaient démontré dans une étude provocatrice que l'inhibition de la voie de Gq α au niveau vasculaire par une surexpression du peptide inhibiteur de Gq (GqI) au niveau des CMLVs (utilisation de la séquence promoteur SM22 α (Eckhart et al 2002)) a permis d'atténuer efficacement l'hypertension artérielle induite par des agonistes vasoactifs (noradrénaline (NA), sérotonine et Ang II) dont les récepteurs membranaires sont couplés à une protéine Gq α . Cette atténuation était associée à une inhibition de l'hypertrophie cardiaque (Keys et al 2002). Contrairement à l'hypertrophie cardiaque induite expérimentalement par une surcharge de pression, l'hypertrophie induite indirectement par une augmentation de la résistance périphérique totale suite à une administration chronique des agonistes vasoactifs, ne semble pas être influencée par une inhibition de la voie de signalisation Gq α au niveau des cardiomyocytes (surexpression du GqI par l'utilisation de la séquence promoteur α MHC (Akhter et al 1998)) mais plutôt au niveau des CMLVs (Keys et al 2002). Les résultats de cette étude supportent notre hypothèse selon laquelle l'hypertrophie

cardiaque dans le modèle animal de l'hypertension essentielle, caractérisée par une augmentation locale du niveau d'Ang II et d'ET-1 (Fukuda et al 1999, Lu et al 2003), est le résultat des événements vasculaires régulés par la voie de signalisation de Gq α . Quant à la PLC β 1, nous sommes les premiers à démontrer un lien de causalité entre une surexpression endogène de la PLC β 1 et le taux de synthèse protéique élevé dans les CMLVs de SHR par l'utilisation des siRNA spécifiques pour l'ARNm de la PLC β 1. Schelling et collaborateurs avaient démontré que l'isoforme PLC β 1 et la protéine Gq α jouent un rôle critique dans les mécanismes de signalisation moléculaire induite par l'Ang II au niveau des CMLVs (Schelling et al 1997). Dans une autre étude faite sur des cardiomyocytes, Filtz et collaborateurs avaient démontré que la surexpression de l'isoforme PLC β 1b dans des cardiomyocytes était associée à une hypertrophie cellulaire (Filtz et al 2009). De plus, cette même étude confirme le rôle critique de la PLC β 1 dans la réponse prohypertrophique initialisée par la sous-unité Gq α . Contrairement aux isoformes PLC δ 1 et PLC γ 1, la PLC β 1 est responsable de l'augmentation du niveau de l'IP3 dans les CMLVs car l'électroporation d'anticorps contre la PLC β 1, afin de bloquer son activité, a permis d'inhiber significativement l'augmentation de l'IP3 induite par l'Ang II (Schelling et al 1997, Ushio-Fukai et al 1998b). Dans le cadre de nos résultats, l'inhibition pharmacologique des phospholipases C par U-73122 (Bleasdale et al 1989), rapporté par son inhibition de l'afflux du calcium en provenance du réticulum endoplasmique (Macmillan & McCarron 2010), a eu approximativement le même degré d'inhibition de l'hypertrophie des CMLVs de SHR comparée à celle obtenue après la transfection de ces cellules avec de PLC β 1-siRNA. De plus, nous avons démontré que la PLC β 1 est le principal isoforme responsable de l'hypertrophie des CMLVs chez le SHR. Car l'inhibition pharmacologique des PLCs par U-73122 dans les CMLVs dans lesquelles le niveau

d'expression protéique de la PLC β 1 a été réduit par des siRNAPLC β 1 ne permet pas d'avoir une inhibition additionnelle significative de l'hypertrophie des CMLVs de SHR. Dans le même contexte, plusieurs études ont rapporté que l'inhibition de PLCs par U-73122 a permis d'inhiber l'hypertrophie (taux de synthèse protéique) des cardiomyocytes (Barac et al 2005, Singal et al 2004). Nos résultats suggèrent donc un rôle important de la protéine Gq α et de son effecteur, PLC β 1, dans la réponse hypertrophique des CMLVs de SHR (article 1).

À l'instar de certains autres organes, le tissu vasculaire est pourvu d'un système rénine-angiotensine (SRA) local indépendant du SRA systémique (Campbell & Habener 1986) (Asaad & Antonaccio 1982, Miyazaki et al 1986). Dans les CMLVs, le récepteur AT1 est couplé majoritairement à la protéine Gq α (Ohtsu et al 2008) qui se trouve surtout associée à la PLC β 1 (Arkininstall et al 1995, Le Mellay et al 1997, Schelling et al 1997). À l'instar du récepteur AT1 de l'Ang II, le récepteur ET_A de l'ET-1 se trouve aussi couplé à la protéine Gq α (Hersch et al 2004), et l'axe Gq α -PLC β joue un rôle important dans le processus d'activation des MAPKs par les récepteurs de l'ET-1 (Cramer et al 2001, Hersch et al 2004). Selon nos résultats de recherche, les récepteurs AT1 de l'Ang II et ET_A de l'ET-1 sont impliqués dans la réponse hypertrophique endogène de la CMLV, selon une voie de signalisation dépendante de MAPKs. En effet, contrairement au récepteur ET_B, l'inhibition pharmacologique des récepteurs AT1 et ET_A par le losartan et le BQ123, a permis d'atténuer considérablement la surexpression protéique de Gq α /PLC β 1, le taux de phosphorylation élevé des p42/44MAPKs et le taux de synthèse protéique élevé dans les CMLVs de SHR (article 1). En accord avec nos résultats, Touyz et collaborateurs ont démontré, en utilisant du losartan, le rôle important du récepteur AT1 de l'Ang II dans l'augmentation du taux de synthèse protéique induite par l'Ang II, au niveau des CMLVs humaines de l'aorte et des artères de résistance (Touyz et al

1999). Cette réponse hypertrophique est dépendante des p42/44MAPKs (Touyz et al 1999). Le losartan a montré aussi son efficacité dans l'inhibition du taux synthèse protéique induite par l'Ang II dans les cellules du tubule proximal rénal en culture (Chatterjee et al 1997). Dans le même contexte, El Mabrouk et collaborateurs ont rapporté aussi un rôle important du récepteur AT1 dans l'induction du taux de synthèse protéique dans les CMLVs de SHR et de WKY traitées avec de l'Ang II (El Mabrouk et al 2001). Dans notre cas, cette inhibition du taux de synthèse protéique endogène a été surtout efficace dans les CMLVs de SHR. Quant aux récepteurs de l'ET-1 et en accord avec nos résultats, Iwasaki et collaborateurs ont démontré le rôle important de l'ET-1 dans l'augmentation du taux de synthèse protéique à travers son récepteur ET_A (Iwasaki et al 1999) qui est abondamment exprimé dans les CMLVs par rapport au récepteur ET_B (Moreau & Dao 1999). De plus, d'autres études in vivo ont rapporté un rôle crucial de l'ET-1 dans la réponse hypertrophique des artères de résistance (Moreau & Dao 1999). Nos résultats reflètent donc un rôle important de l'Ang II et de l'ET-1, synthétisés localement, dans la réponse hypertrophique des CMLVs. Effectivement, les CMLVs de SHR se caractérisent par un profil synthétique élevé de certains agents vasoactifs promoteurs de la croissance tels que le PDGF-A (Hahn et al 1991) et le TGF- β 1 (Hamet et al 1991), induit par l'Ang II synthétisé localement (Majack et al 1990, Stouffer & Owens 1994). De plus, les CMLVs sont aussi capables de stimuler la synthèse inductible de l'ET-1 d'une manière autocrine après une stimulation avec l'Ang II (Hahn et al 1990). D'un autre côté, nous sommes les premiers à démontrer le rôle important du récepteur AT1 de l'Ang II et du récepteur ET_A de l'ET-1 dans la régulation du taux d'expression protéique endogène élevée de Gq α et de PLC β 1 au niveau de CMLVs de SHR à l'âge de 16 semaines (article 1).

Dans le cadre de la même étude, l'inhibition des MAPKs par PD98059 a permis d'atténuer la surexpression endogène de Gq α /PLC β 1 et le taux élevé de synthèse protéique dans les CMLVs de SHR. En désaccord avec les résultats de Hou et collaborateurs sur les mécanismes moléculaires de l'hypertrophie des fibroblastes humains cardiaques (Hou et al 2000), nos résultats de recherche montrent plutôt une inhibition efficace du taux de synthèse protéique après le traitement des CMLVs de SHR avec PD98059 (inhibiteur des MAPKs). En plus d'un effet direct de l'Ang II et de l'ET-1 sur la signalisation MAPK déjà confirmé par plusieurs chercheurs (Bouallegue et al 2013, Ishida et al 1998, Touyz et al 2001), les forces d'étirement appliquées sur des CMLVs induisent une activation des p42/44MAPKs dépendamment du degré et de la fréquence d'élongation. Cette activation est assurée par l'ET-1 et l'Ang II par le biais de leurs récepteurs ET_A et AT1 successivement (Hosokawa et al 2002). De ce fait, contrairement au récepteur ET_B, l'inhibition pharmacologique du récepteur ET_A et du récepteur AT1 par , successivement, BQ123 et losartan a permis d'inhiber l'hyperphosphorylation d'ERK1/2 et l'hypertrophie des CMLVs. Nos résultats sont en accord avec Chen et ses collaborateurs qui ont démontré , en adoptant plusieurs approches techniques y compris l'immunobuvardage de type Western, que l'inhibition pharmacologique du récepteur ET_B par BQ788 n'a pas d'effet sur l'hyperphosphorylation d'ERK1/2 induite par l'ET-1 alors que l'inhibition pharmacologique du récepteur ET_A par BQ123 a permis d'inhiber l'effet de l'ET-1 sur les MAPK/ERK1/2 (Chen et al 2009). D'autre part, plusieurs recherches ont montré un rôle plutôt prohypertrophique que mitotique de l'ET-1 (Jahan et al 1996, Scott-Burden et al 1991, Yang et al 1999). Dans le même contexte, Dao et ses collaborateurs ont montré que l'ET-1 peut avoir un effet prohypertrophique ou promitotique sur les petites artérioles selon sa concentration locale (Dao et al 2006). En accord avec nos résultats,

plusieurs études ont déjà rapporté un rôle important du récepteur AT1 de l'Ang II dans l'activation des p42/44MAPKs par l'utilisation de la même approche pharmacologique que la nôtre (Ishida et al 1998, Touyz et al 2001).

L'activation des MAPKs est classiquement associée à une activation subséquente de facteurs de transcriptions (Ciccarelli & Giustetto 2014, Dhillon et al 2007). Les facteurs de transcription AP1 et NF- κ B sont impliqués dans la régulation de plusieurs processus biologiques et pathologiques (Fujioka et al 2004) d'une façon synergique et concomitante (Fujioka et al 2004, Shyu et al 2008). L'activité de ces facteurs de transcription est régulée, entre autres, par le calcium, les PKCs et les p42/44MAPKs (Liu et al 2000, Macian et al 2001, Zhao & Lee 1999). Selon nos résultats de recherche, l'inhibition pharmacologique des facteurs de transcription AP1 et NF- κ B par l'hélénaline et la curcumine, atténue significativement la surexpression protéique des Gq α /PLC β 1. Ceci suggère un rôle important des facteurs de transcription activés, entre autres, par les p42/44MAPKs dans la régulation de l'expression génique de certaines molécules impliquées dans l'hypertrophie vasculaire telles que Gq α et PLC β 1.

Les CMLVs de SHR sont caractérisées par une augmentation de production de l'anion superoxide et une surexpression des sous-unités de l'enzyme NADPH (Gusan & Anand-Srivastava 2013, Saha et al 2008). Les EROs sont impliquées dans l'hypertrophie des CMLVs induite par des agonistes vasoactifs tels que PGF2 α et l'Ang II (Rice et al 2008, Weber et al 2005). Dans cette deuxième partie, nous avons démontré l'implication du stress oxydatif dans le taux d'expression protéique élevé de Gq α et de PLC β 1 et dans l'hypertrophie des CMLVs de SHR.

L'ET-1 et l'Ang II induisent leurs effets, au moins partiellement, par une augmentation du taux de production des espèces réactives oxygénées (EROs) en activant essentiellement la NADPH oxidase (Chen et al 2012, Griendling et al 1994). Cette enzyme pro-oxydante est impliquée dans l'hypertension (Rajagopalan et al 1996) et dans la réponse hypertrophique des CMLVs induite par l'Ang II (Kyaw et al 2001, Ushio-Fukai et al 1996). Les EROs sont impliquées dans la régulation de plusieurs réponses physiopathologiques des CMLVs y compris la prolifération, l'hypertrophie, l'expression génique et l'activation des facteurs de transcription (Kehrer 1993, Schreck et al 1991). Le récepteur AT1 de l'Ang II, par exemple, joue un rôle crucial dans l'installation et le développement de l'athérosclérose selon un mécanisme dépendant du stress oxydatif (Warnholtz et al 1999). Plusieurs efforts de recherche clinique ont été déployés afin de déterminer le rôle protecteur de certains antioxydants contre les maladies cardiovasculaires. L'administration de la vitamine E par exemple est associée à un risque diminué de maladies coronaires (Rimm et al 1993). Le resveratrol, antioxydant naturel, a été proposé récemment comme une thérapie potentielle pour le traitement des maladies cardiovasculaires (Zordoky et al 2014). L'utilisation des antioxydants avec d'autres options thérapeutiques peut être donc efficace dans le traitement des maladies cardiovasculaires (Amaral et al 2015, Steinberg 1993, Stephens et al 1996).

Pour élucider le rôle important du stress oxydant dans le comportement prohypertrophique des CMLVs de SHR, nous avons utilisé deux antioxydants, NAC (piégeur des EROs) et DPI (inhibiteur des flavoenzymes), connus par son inhibition efficace du taux de production des EROs (Kyaw et al 2001, Rao et al 1999, Vaquero et al 2004). Ces molécules antioxydantes diminuent significativement la surexpression endogène de Gq α et de PLC β 1 et le taux de synthèse protéique élevé dans les CMLVs de SHR. Ceci suggère un rôle important

du stress oxydant dans l'augmentation de l'expression protéique de Gq α et de PLC β 1 et dans la hausse du taux synthèse protéique dans les CMLVs de SHR. En accord avec les résultats de cette étude, des CMLVs traités au glucose ou provenant de l'aorte de rats diabétiques STZ montrent aussi une augmentation dans l'expression protéique de Gq α et de PLC β 1 selon un mécanisme dépendant du stress oxydatif (Descorbeth & Anand-Srivastava 2010). De plus, Daou et collaborateurs ont rapporté aussi un effet significatif du DPI dans l'inhibition du taux de synthèse protéique induite par l'ET-1 dans les CMLVs (Daou & Srivastava 2004). Bleeke et collaborateurs avaient démontré aussi le rôle important de DPI et NAC dans l'inhibition du taux synthèse protéique induite par les catécholamines dans les CMLVs (Bleeke et al 2004).

Nous avons aussi démontré une augmentation de l'expression protéique endogène de l'EGFR et de l'IGF-1R dans les CMLVs de SHR à l'âge de 16 semaines (article 2). Ces anomalies d'expression constituent probablement un marqueur de dédifférenciation des CMLVs caractérisée par une augmentation locale du taux de peptides vasoactives et par un taux de synthèse protéique et d'ADN élevé. Dans ce contexte, l'Ang II a été rapporté par son implication dans l'augmentation du taux d'expression protéique et de l'ARNm de l'IGF-1R dans, respectivement, des CMLVs et des kératinocytes (Du et al 1996, Scheidegger et al 1999). De plus, l'Ang II a été aussi rapporté par son induction de l'augmentation de l'expression protéique de l'EGFR selon un mécanisme dépendant du stress oxydative (Nakai et al 2008). L'inhibition de l'expression protéique de l'EGFR par des siRNA spécifiques permet de diminuer significativement le taux d'expression protéique élevé de Gq α et de PLC β 1 ainsi que le taux de synthèse protéique élevé dans les CMLVs de SHR. Dans ce contexte, Kagiya et collaborateurs avaient démontré le rôle efficace de la diminution de l'expression de l'EGFR par des oligonucleotides antisense dans l'inhibition de l'hypertrophie ventriculaire induite par

l'Ang II et l'hypertension (Kagiyama et al 2002, Kagiyama et al 2003). L'EGFR est classiquement connu par son implication dans l'établissement et le développement de plusieurs pathologies caractérisées par une hyperprolifération cellulaire (Fischer et al 2003) comme les maladies cancéreuses et les maladies cardiovasculaires. À l'instar des autres RTKs, l'EGFR est transactivé par plusieurs agonistes vasoactifs (Daub et al 1996, Hackel et al 1999, Luttrell et al 1999). La transactivation de l'EGFR par un RCPG activé, permet la production d'un signal intracellulaire promitotique et prohypertrophique (Fischer et al 2003, Prenzel et al 1999). Quant au récepteur du facteur de croissance insulino-mimétique (IGF-1R), il est surtout impliqué dans la régulation de la formation de la néointima (Wu et al 2010). En effet, l'effet pro-prolifératif de l'Ang II et d' H_2O_2 est médié, entre autres, par une transactivation de l'IGF-1R (Azar et al 2007, Delafontaine et al 2004). Il a également été observé qu'une administration de l'Ang II ($100 \text{ ng} \times \text{kg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) à des rats, pendant deux semaines, induit une hausse significative de la pression artérielle et une hypertrophie artérielle (sans polyploïdie/hyperplasie) de l'aorte thoracique et de l'artère carotide (Parker et al 1998). Cette hypertrophie artérielle est associée à une augmentation très significative de l'expression du PDGF-A (Parker et al 1998). Dans le même contexte, Berk et collaborateurs ont démontré que l'effet prohypertrophique de l'Ang II se fait selon deux mécanismes : 1) un mécanisme dépendant de PDGF-A, responsable de l'augmentation du volume de la CMLV; 2) un mécanisme indépendant de PDGF-A responsable de l'augmentation du taux de synthèse protéique (Berk & Rao 1993).

La transactivation des récepteurs des facteurs de croissance semble impliquée dans les mécanismes moléculaires par lesquels les EROs augmentent le taux d'expression protéique de $Gq\alpha$ et de $PLC\beta 1$ dans les CMLVs de SHR. Car DPI et NAC ont atténué

l'hyperphosphorylation de l'EGFR, de l'IGF-1R et de PDGFR mais aussi le taux d'expression protéique élevé de l'EGFR et de l'IGF-1R. De plus, un traitement des CMLVs avec les inhibiteurs de l'EGFR (AG1478 (5 μ M)), du PDGFR (AG1295 (5 μ M)) et de l'IGF-1R (AG1028 (5 μ M)) atténue significativement la surexpression endogène de Gq α /PLC β 1 et la réponse hypertrophique des CMLVs de SHR. Ces résultats indiquent un rôle important de la transactivation des récepteurs des facteurs de croissance dans les mécanismes moléculaires de la réponse hypertrophique. Cette transactivation est assurée au moins partiellement par les EROs. Dans ce contexte, plusieurs travaux issus de notre laboratoire ont rapporté que la transactivation de l'EGFR, du PDGFR et de l'IGF-1R est médiée, au moins partiellement, par des EROs et par la molécule c-Src (Gomez Sandoval & Anand-Srivastava 2011, Gusan & Anand-Srivastava 2013) (Descorbeth & Anand-Srivastava 2010). Nos résultats de recherche montrent aussi que l'inhibition pharmacologique de la molécule c-Src ne permet pas seulement d'atténuer significativement la surexpression endogène des protéines Gq α et PLC β 1 mais aussi le taux d'expression protéique élevé du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) et insulino-mimétique (IGF-1R) que nous avons rapporté dans les CMLVs de SHR à l'âge de 16 semaines (article 2). En plus, le taux de phosphorylation élevé d'EGFR, d'IGF-1R et de PDGFR, rapporté dans les CMLVs de SHR, a été aussi atténué par l'inhibition pharmacologique de la molécule c-Src. De plus, l'inhibition de l'expression de c-Src par des siRNA spécifiques a permis aussi d'atténuer efficacement le taux d'expression protéique élevé de Gq α et de PLC β 1 et le taux de synthèse protéique élevé dans les CMLVs de SHR. En accord avec notre étude, Hsieh et collaborateurs ont démontré l'implication de la molécule c-Src dans l'augmentation de l'expression protéique de l'EGFR en utilisant la même approche pharmacologique (PP1) (Hsieh et al 2009). De plus, notre laboratoire a démontré

aussi le rôle important de la molécule c-Src dans la transactivation des récepteurs des facteurs de croissance (Descorbeth & Anand-Srivastava 2010, Gomez Sandoval & Anand-Srivastava 2011, Gusan & Anand-Srivastava 2013). Nos résultats et les résultats des autres indiquent donc un rôle intermédiaire important de l'activité de la molécule c-Src dans le comportement prohypertrophique des CMLVs par son implication dans les anomalies d'expression de plusieurs molécules de signalisation potentiellement impliquées dans le mécanisme du remodelage vasculaire. Cette réponse hypertrophique des CMLVs constitue un facteur déterminant de la rigidité aortique (Gao et al 2014). Dans ce contexte, une inhibition pharmacologique de la molécule c-Src par PP2 a permis d'inhiber la rigidité aortique induite par des agonistes alpha-adrénergiques (Gao et al 2014, Saphirstein et al 2013). Ceci suggère un rôle important de l'activité de la molécule c-Src dans les événements précoces du remodelage vasculaire.

Nos résultats de recherche montrent aussi une sensibilité de p42/44MAPK au stress oxydatif. Car DPI inhibe complètement le taux de phosphorylation élevée d'ERK1/2 dans les CMLVs de SHR. NAC n'atténue que partiellement l'hyperphosphorylation d'ERK1/2 dans les CMLVs de SHR à l'âge de 16 semaines. Dans ce contexte, Lappas et collaborateurs ont déjà rapporté que NAC et DPI diminuent significativement l'hyperphosphorylation d'ERK1/2 dans les CMLVs de SHR à l'âge de 12 semaines (Lappas et al 2005). Cependant, nos résultats sont en désaccord avec les résultats de l'étude entretenue par Ushio-Fukai et ses collaborateurs qui ont rapporté un effet non significatif du DPI dans l'inhibition de l'hyperphosphorylation d'ERK1/2 induite par l'Ang II (Ushio-Fukai et al 1998a). Kyaw et collaborateurs ont aussi rapporté que NAC et DPI inhibent seulement la phosphorylation JNK induite par l'Ang II mais pas la phosphorylation des p42/44MAPK (Kyaw et al 2001). L'inhibition

pharmacologique de la molécule c-Src a permis d'inhiber l'hyperphosphorylation de p42/44MAPKs dans les CMLVs de SHR. De plus, l'inhibition pharmacologique des récepteurs de facteurs de croissance permet aussi d'inhiber significativement l'hyperphosphorylation de la molécule ERK1/2. Ishida et collaborateurs ont démontré le rôle de la molécule c-Src dans l'activation d'ERK1/2 par l'utilisation des inhibiteurs de tyrosines kinases, genistein et CP-188,556. Selon cette même étude, l'inactivation du gène codant pour la molécule c-Src est associée à une diminution de l'activité basale et de la sensibilité de la molécule ERK1/2 à l'Ang II (Ishida et al 1998). De plus, l'Ang II et l'ET-1 activent la phosphorylation de la molécule ERK1/2 selon une voie de signalisation dépendante de la molécule c-Src et de la transactivation des récepteurs du facteur de croissance (Gomez Sandoval & Anand-Srivastava 2011) (Sandoval et al 2011).

La troisième partie de ce travail de doctorat nous a permis d'élucider un rôle important de la PKC δ , associée à une phosphorylation en tyrosine 311 (Tyr³¹¹), dans les mécanismes moléculaires de la réponse hypertrophique des CMLVs de SHR.

Les PKCs sont classiquement impliquées dans la transduction du signal intracellulaire initialisé par des RCPGs. Plusieurs isoformes sont exprimés dans les CMLVs tels les isoformes PKC α , δ , ϵ , et ζ (Leszczynski et al 1996, Ohanian et al 1996). La PKC δ , abondamment exprimée dans les CMLVs aortique (Fukumoto et al 1997), semble jouer un rôle important dans l'hypertrophie des CMLVs induite par l'Ang II (Nakashima et al 2008). L'activité de la PKC δ est associée à une augmentation de la phosphorylation de plusieurs sites à activité tyrosine kinase y compris le site Tyr³¹¹ (Steinberg 2004). Contrairement à la Thr⁵⁰⁵ et Tyr³³², la phosphorylation de la PKC δ en Tyr³¹¹ est essentielle dans le processus d'activation

de la PKC δ par l'Ang II (Wong et al 2011). Pour bloquer l'activité de la PKC δ , nous avons utilisé la rottlerin, un composé naturel utilisé comme inhibiteur putatif de la PKC δ dans plusieurs études durant les 20 dernières années (Frasch et al 2000, Li et al 2003a). Selon nos résultats de recherche, les CMLVs de SHR à l'âge de 16 semaines montrent une hyperphosphorylation endogène de la PKC δ dans le résidu Tyr³¹¹. La rottlerin, utilisée comme inhibiteur de la PKC δ , bloque significativement cette hyperphosphorylation selon une manière concentration-dépendante (de 1 μ M à 10 μ M). L'utilisation de la rottlerin comme un inhibiteur spécifique de la PKC δ a généré des controverses quelques années après son identification comme inhibiteur spécifique par Gschwendt et ses collaborateurs en 1994 (Gschwendt et al 1994). Des recherches ont rapporté que la rottlerin inhibe effectivement l'activité de la PKC δ selon un mécanisme indirect dépendant du non-couplement de la mitochondrie (*mitochondria uncoupling*) (Soltoff 2001). Cependant, la PKC δ constitue un point de convergence de plusieurs voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la régulation de plusieurs processus biologiques tels que l'apoptose, la prolifération, la croissance et le stress oxydatif (Li et al 2003a, Talior et al 2005) (Hsieh et al 2008) (Kikkawa et al 2002). De ce fait, les effets pléiotropiques de la rottlerin peuvent refléter en quelque sorte le résultat d'une inhibition de la PKC δ et conséquemment d'une inhibition subséquente des molécules activées par cette sérine-thréonine kinase.

Nous avons donc démontré que la rottlerin inhibe potentiellement l'activité de la PKC δ telle qu'évaluée par le niveau de phosphorylation de la PKC δ en Tyr³¹¹ (article 3). L'inhibition pharmacologique de la PKC δ est associée à une inhibition de la hausse du taux d'expression protéique de Gq α et de PLC β 1 dans les CMLVs de SHR. De plus, nous avons aussi démontré que la rottlerin et le knockdown de la PKC δ par des siRNA spécifiques, diminue

significativement le taux de synthèse protéique dans les CMLVs de SHR. Ces résultats indiquent un rôle important de la PKC δ , liée à une hyperphosphorylation en Tyr³¹¹, dans la réponse hypertrophique associée à une surexpression endogène des protéines Gq α et PLC β 1 dans les CMLVs de SHR. Dans le même contexte, et en adoptant une approche méthodologique différente de la nôtre (volume cellulaire), Nakashima et collaborateurs ont démontré que la réponse hypertrophique induite par l'Ang II est médiée par la phosphorylation de la PKC δ en Tyr³¹¹ selon un mécanisme dépendant d'une activation de la molécule c-Src (Nakashima et al 2008). En accord avec nos résultats, Fan et collaborateurs ont aussi rapporté que l'inhibition de l'expression de la PKC δ par de shRNAs spécifiques, a permis de diminuer efficacement le taux de synthèse protéique et le taux d'expression de la sous-unité NOX1 induit par les prostaglandines PGF2alpha (Fan et al 2005). Nos résultats et le résultat des autres investigateurs indiquent donc un rôle important de la PKC δ dans la réponse hypertrophique des CMLVs. Ce rôle semble lié à une régulation du mécanisme du stress oxydatif à travers l'induction de l'expression de certaines composantes du NADPH (Fan et al 2005, Katsuyama et al 2002). En effet, une augmentation de l'activité de la NADPH oxydase et du taux de production de l'ion superoxide dans les CMLVs de SHR, est attribuée à une augmentation de la concentration endogène de l'Ang II et de l'ET-1 (Li et al 2010). De plus, l'Ang II induit son effet pro-oxydant en augmentant la translocation et l'expression des sous-unités de la NADPH tels que p47phox (Lv et al 2012). De ce fait, nous voulons vérifier l'hypothèse selon laquelle une augmentation de l'activation de la PKC δ associée à une hyperphosphorylation en Tyr³¹¹ est impliquée dans l'augmentation du niveau du stress oxydatif dans les CMLVs de SHR. Selon nos résultats de recherche, l'inhibition de la PKC δ par la rottlerin a été associée à une diminution significative de l'activité de la NADPH oxydase

et du taux de production d'O₂⁻, et à des concentrations élevées (5µM et 10µM), la rottlerin inhibe drastiquement l'activité de la NADPH oxidase et du taux de production d'O₂⁻ dans les CMLVs de SHR.

L'emplacement du résidu Tyr³¹¹ dans la région charnière entre le domaine catalytique et le domaine C1 proche de la zone de liaison du substrat de c-Src suggère un rôle important de la molécule c-Src dans la régulation de l'activité de la PKCδ. En effet, la molécule c-Src est connue pour son implication dans la dégradation de la PKCδ qui se trouve en aval (Benes & Soltoff 2001, Blake et al 1999). De plus, la phosphorylation de la PKCδ en Tyr³¹¹ par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est médiée par la molécule c-Src (Nakashima et al 2008). L'inhibition de la molécule c-Src par PP1 et PP2 a permis d'inhiber complètement la phosphorylation du résidu Tyr³¹¹ induite par la thrombine (activation rapide entre 20s et 1min) dans les plaquettes sanguines humaines (Hall et al 2007). Cependant, nos résultats de recherche basés sur une approche pharmacologique (PP2; rottlerin), montrent plutôt une inhibition réciproque entre ces deux molécules de signalisation. En effet, l'inhibition de la molécule c-Src par PP2 est associée à une inhibition significative du taux de phosphorylation de la PKCδ en Tyr³¹¹ dans les CMLVs (données non publiées). De plus, la rottlerin inhibe significativement le taux de phosphorylation élevée de molécule c-Src en Tyr⁴¹⁹ (article 3).

Pour faire suite à nos résultats, nous avons aussi testé l'implication de la PKCδ dans les anomalies d'expression de certaines molécules de signalisation impliquées dans la réponse prohypertrophique des CMLVs. Dans plusieurs types cellulaires y compris les CMLVs et les cardiomyocytes, la PKC joue un rôle intermédiaire important dans le processus de transactivation de l'EGFR (Fischer et al 2003, Shah et al 2003, Wetzker & Bohmer 2003). Des

hormones vasoactives telles que l'Ang II, l'ET-1 et la thrombine, induisent leurs effets, au moins partiellement, par une transactivation de l'EGFR (Hsieh et al 2009). Selon nos résultats de recherche, la PKC δ joue un rôle important dans la transactivation et l'expression de l'EGFR et de l'IGF-1R. En effet, l'inhibition de la PKC δ par la rottlerin, n'inhibe pas seulement l'hyperphosphorylation endogène de ces récepteurs de facteurs de croissance, mais inhibe considérablement leur niveau d'expression protéique augmentée. En plus, le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR) montre un niveau de phosphorylation élevé, qui est inhibé aussi par la rottlerin (données non publiées). En accord avec nos résultats, Hsieh et ses collaborateurs ont démontré un rôle signalétique important de la PKC δ dans l'induction de l'expression de l'EGFR par la thrombine dans les CMLVs (Hsieh et al 2009).

La PKC δ se trouve en amont des MAPKs (Ginnan et al 2006). Tel que démontré dans l'article 1, l'activité des MAPKs, associée à une hyperphosphorylation d'ERK1/2, est impliquée dans l'hypertrophie des CMLVs de SHR selon un mécanisme dépendant d'une augmentation de l'expression protéique de Gq α et de PLC β 1 (Ataf & Anand-Srivastava 2014). Nos résultats montrent également que l'inhibition de l'activité de la PKC δ par la rottlerin est associée à une inhibition concentration-dépendante de l'hyperphosphorylation d'ERK1/2 dans les CMLVs de SHR. D'un autre côté, la rottlerin inhibe la phosphorylation basale d'ERK1/2 dans les CMLVs de WKY à partir d'une concentration de 5 μ M. Ceci indique que les CMLVs de WKY est moins sensible à l'effet de la rottlerin à de faibles concentrations. Dans le même contexte, l'inhibition de l'activité de la PKC δ par la rottlerin a été associée à une inhibition de l'activité des MAPKs induite par l'ET-1 dans les CMLVs (Chen et al 2009).

Conclusion

En conclusion, les résultats de ce travail de doctorat nous ont permis d'élucider pour la première fois certains aspects des mécanismes moléculaires de la réponse hypertrophique des CMLVs provenant de l'aorte de rats spontanément hypertendus, modèle animal de l'hypertension essentielle. Ces changements consistent surtout à une augmentation de l'expression protéique de certaines molécules rapportées par leur implication dans les processus du remodelage cardiovasculaire, et qui sont essentiellement : $Gq\alpha$, $PLC\beta 1$, EGFR et IGF-1R. L'Ang II et l'ET-1, synthétisées localement, semblent jouer un rôle crucial dans l'hypertrophie des CMLVs de SHR selon un mécanisme dépendant du stress oxydatif, de l'activation de la molécule c-Src/PKC δ , de la transactivation des RTKs et des MAPKs (figure 10). Ces changements au niveau vasculaire peuvent être l'origine de plusieurs complications cardiovasculaires liées à l'hypertension telles que l'hypertrophie cardiaque et l'athérosclérose.

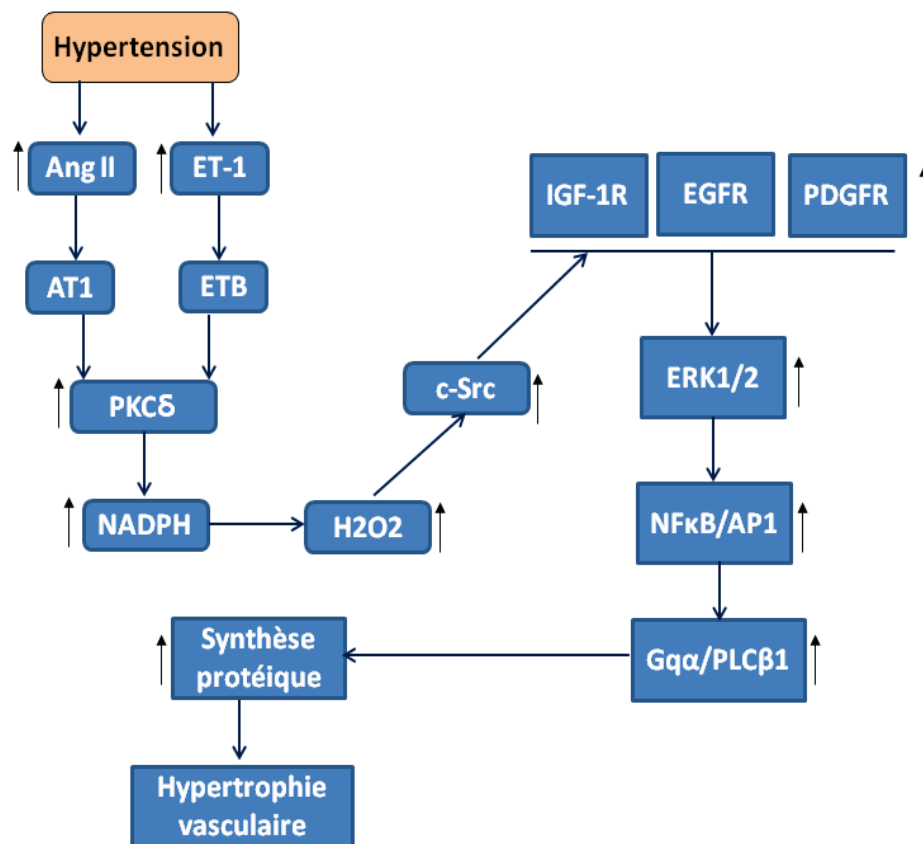


Figure 10 : Modèle représentatif du mécanisme moléculaire de l'hypertrophie des CMLVs dans le modèle animal de l'hypertension essentielle (SHR).

Une augmentation endogène de l'Ang II et de l'ET-1 au niveau des CMLVs permet d'activer, successivement, les récepteurs AT1 et ETa. L'activation subséquente de la PKCδ associée à une hyperphosphorylation en Tyr³¹¹ induit une augmentation du niveau de stress oxydatif qui, par le biais de la molécule c-Src permet la transactivation des récepteurs des facteurs de croissance (EGFR; PDGF-R et IGF-1R) et l'activation subséquente des p42/44MAPKs. Ces MAPKs agissent classiquement sur les facteurs de transcriptions NFκB/AP1 ce qui augmente considérablement l'expression des protéines impliquées dans le remodelage vasculaire. Ces événements signalétiques induisent une surexpression protéique de Gqα et de PLCβ1 et une augmentation du taux de synthèse protéique.

Perspectives

Les travaux présentés dans le cadre de ce travail de doctorat nous ont permis d'élucider plusieurs aspects de mécanisme moléculaire de la réponse hypertrophique des CMLVs dans le modèle animal de l'hypertension essentielle. Les peptides vasoactifs endogènes tels que l'Ang II et l'ET-1, jouent un rôle important dans le processus de l'hypertrophie vasculaire. Ce remodelage hypertrophique implique, entre autres, l'axe $Gq\alpha/PLC\beta1$.

Pour faire suite à ces études, l'analyse de la cinétique de sécrétion de certaines substances vasoactives par les CMLVs et les CEs en culture provenant de plusieurs modèles animaux d'hypertension (ex; SHR, 1K1C, sel-DOCA), par l'utilisation de l'HPLC couplée à la RIA (*Radio ImmunoAssays*), constitue un outil d'analyse important afin d'avoir une idée claire de la cinétique de sécrétion, l'ordre de sécrétion et la concentration des substances vasoactives synthétisées et sécrétées localement. Les substrats candidats sont entre autres, l'Ang II, l'ET-1, les prostaglandines, la thrombine et les facteurs de croissance. Dans le même contexte, on peut aussi évaluer l'effet de différentes forces d'élongation (pathologique et physiologique) sur le profil synthétique des CMLVs et/ou des cellules endothéliales. Un protocole d'étirement a été élaboré pour la première fois par Sadoshima et collaborateurs (Sadoshima et al 1992). Ce protocole permet d'appliquer différents degrés d'élongation sur des cellules in vitro (*Cyclic mechanical stress* : CMS) (ex. 0; 10; 20 % d'élongation), pour différentes périodes en présence et en absence d'un traitement (antagonistes; agonistes, siRNAs...).

Il est préférable d'élaborer aussi le profil sécrétoire des CMLVs issues de différents territoires vasculaires. Ceci permet de faire une étude d'association entre le profil sécrétoire

endogène et la cinétique de certaines maladies liées à l'hypertension telles que les maladies cardiaques et certaines maladies neurodégénératives.

Les agonistes endogènes constituent un vrai déficit pour la médecine moderne, et pourraient être un facteur non négligeable de l'établissement de certaines maladies neurodégénératives telles que la maladie d'alzheimer et la démence vasculaire. En effet, à l'instar des autres territoires vasculaires, la paroi vasculaire cérébrale subit des changements hémodynamiques et morphologiques profonds suite à une augmentation systémique chronique de l'hypertension artérielle. Effectivement, le tissu vasculaire au niveau cérébral a la capacité de synthétiser des agonistes vasoactifs d'une manière endogène. Une dédifférenciation des CMLVs de la paroi vasculaire vers un profil synthétique peut influencer considérablement la dynamique du tissu neuroglial en affectant plusieurs voies de signalisation impliquées dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'alzheimer et la démence vasculaire. D'autre part, une augmentation du stress oxydatif au niveau central par les agonistes endogènes ou autres peut avoir une origine majoritairement vasculaire. De ce fait, une concentration pathologique des ERO peut être l'une des causes de l'assemblage des plaques amyloïdes (cinétique d'agrégation). En effet, le tissu neuronal est pourvu de plusieurs récepteurs membranaires qu'on trouve au niveau vasculaire tels que les récepteurs AT_1 et ET_A . Une augmentation de l'activité locale de ces récepteurs peut être un facteur de risque potentiel du développement de certaines maladies neurodégénératives.

Dans un résultat issu de ce travail de doctorat, nous avons constaté une augmentation très apparente de l'expression de l'EGFR dans les CMLVs de SHR à l'âge de 16 semaines par rapport aux rats normotendus. Cette augmentation de l'expression protéique de l'EGFR peut

être le signe d'un remodelage vasculaire précoce et d'une dédifférenciation des CMLVs. Car une inhibition de l'activité et une diminution de l'expression de l'EGFR inhibent considérablement le taux de synthèse protéique. De ce fait, on suggère un rôle important d'une surexpression endogène de l'EGFR dans le processus du remodelage vasculaire. L'inhibition de la PKC δ par la rottlerin (évaluée par le degré d'inhibition de la phosphorylation en PKC δ Tyr³¹¹) a permis d'atténuer considérablement la surexpression endogène de l'EGFR dans les CMLVs de SHR selon une manière concentration-dépendante. Dans ce cadre, nous suggérons qu'une étude *in vivo* soit faite pour voir si l'administration de la rottlerin (composé naturel à propriétés antioxydantes) peut affecter l'établissement et le développement de l'hypertension ainsi que le remodelage cardiovasculaire dans le modèle animal d'hypertension essentielle ainsi que dans d'autres modèles animaux d'hypertension artérielle.

Les mécanismes moléculaires d'apoptose/prolifération ne sont pas complètement élucidés. Un déséquilibre dans le rapport apoptose/prolifération constitue un facteur important du développement de certains aspects du remodelage vasculaire tel que l'athérosclérose. Il serait donc intéressant de vérifier l'implication de la PKC δ /PKC α dans le processus d'apoptose par l'analyse du rapport Bcl2/BAX au niveau des CMLVs et l'effet d'une inhibition de ces protéines à activité tyrosine kinase sur l'équilibre prolifération/apoptose. Même chose peut être faite afin de comprendre le comportement pro-apoptotique des neurones dans le contexte de certains cas pathologiques tels que les maladies neurodégénératives.

Bibliographie

- Adams JW, Sakata Y, Davis MG, Sah VP, Wang Y, et al. 1998. Enhanced G α q signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 10140-5
- Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, et al. 2004. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation* 109: 227-33
- Ahn D, Ge Y, Stricklett PK, Gill P, Taylor D, et al. 2004. Collecting duct-specific knockout of endothelin-1 causes hypertension and sodium retention. *The Journal of clinical investigation* 114: 504-11
- Akhter SA, Luttrell LM, Rockman HA, Iaccarino G, Lefkowitz RJ, Koch WJ. 1998. Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science* 280: 574-7
- Akishita M, Horiuchi M, Yamada H, Zhang L, Shirakami G, et al. 2000. Inflammation influences vascular remodeling through AT₂ receptor expression and signaling. *Physiological genomics* 2: 13-20
- Alberts B, Wilson J, Hunt T. 2004. *Biologie moléculaire de la cellule: Livre de cours ; Livre d'exercices*. Médecine Sciences Publications.
- Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. 2000. Localization and function of angiotensin AT₁ receptors. *American journal of hypertension* 13: 31S-38S
- Amaral JH, Ferreira GC, Pinheiro LC, Montenegro MF, Tanus-Santos JE. 2015. Consistent antioxidant and antihypertensive effects of oral sodium nitrite in DOCA-salt hypertension. *Redox biology* 5: 340-46
- Ammit AJ, Panettieri RA, Jr. 2001. Invited review: the circle of life: cell cycle regulation in airway smooth muscle. *Journal of applied physiology* 91: 1431-7
- Anand-Srivastava MB. 1988. Altered responsiveness of adenylate cyclase to adenosine and other agents in the myocardial sarcolemma and aorta of spontaneously-hypertensive rats. *Biochemical pharmacology* 37: 3017-22
- Anand-Srivastava MB. 2010. Modulation of G α Proteins in Hypertension: Role of Angiotensin II and Oxidative Stress. *Current cardiology reviews* 6: 298-308
- Anand-Srivastava MB, de Champlain J, Thibault C. 1993. DOCA-salt hypertensive rat hearts exhibit altered expression of G-proteins. *American journal of hypertension* 6: 72-5
- Anand-Srivastava MB, Picard S, Thibault C. 1991. Altered expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory proteins (G α) in spontaneously hypertensive rats. *American journal of hypertension* 4: 840-3
- Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & development* 22: 1276-312
- Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. 1990. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 348: 730-2
- Arkininstall S, Chabert C, Maundrell K, Peitsch M. 1995. Mapping regions of G α q interacting with PLC beta 1 using multiple overlapping synthetic peptides. *FEBS letters* 364: 45-50

- Arnqvist HJ, Bornfeldt KE, Chen Y, Lindstrom T. 1995. The insulin-like growth factor system in vascular smooth muscle: interaction with insulin and growth factors. *Metabolism: clinical and experimental* 44: 58-66
- Asaad MM, Antonaccio MJ. 1982. Vascular wall renin in spontaneously hypertensive rats. Potential relevance to hypertension maintenance and antihypertensive effect of captopril. *Hypertension* 4: 487-93
- Atef ME, Anand-Srivastava MB. 2014. Enhanced expression of Gqalpha and PLC-beta1 proteins contributes to vascular smooth muscle cell hypertrophy in SHR: role of endogenous angiotensin II and endothelin-1. *American journal of physiology. Cell physiology* 307: C97-106
- Azar ZM, Mehdi MZ, Srivastava AK. 2007. Insulin-like growth factor type-1 receptor transactivation in vasoactive peptide and oxidant-induced signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 85: 105-11
- Azuma H, Hamasaki H, Sato J, Isotani E, Obayashi S, Matsubara O. 1995. Different localization of ETA and ETB receptors in the hyperplastic vascular wall. *Journal of cardiovascular pharmacology* 25: 802-9
- Azuma H, Niimi Y, Hamasaki H. 1992. Prevention of intimal thickening after endothelial removal by a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, losartan. *British journal of pharmacology* 106: 665-71
- Bahrami BF, Ataie-Kachoie P, Pourgholami MH, Morris DL. 2014. p70 Ribosomal protein S6 kinase (Rps6kb1): an update. *Journal of clinical pathology* 67: 1019-25
- Baillyes EM, Nave BT, Soos MA, Orr SR, Hayward AC, Siddle K. 1997. Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting. *The Biochemical journal* 327 (Pt 1): 209-15
- Banes-Berceli AK, Ogobi S, Tawfik A, Patel B, Shirley A, et al. 2005. Endothelin-1 activation of JAK2 in vascular smooth muscle cells involves NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Vascular pharmacology* 43: 310-9
- Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, et al. 2001. A Ca²⁺-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *The Journal of biological chemistry* 276: 37594-601
- Banfi B, Tirone F, Durussel I, Knisz J, Moskwa P, et al. 2004. Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *The Journal of biological chemistry* 279: 18583-91
- Barac YD, Zeevi-Levin N, Yaniv G, Reiter I, Milman F, et al. 2005. The 1,4,5-inositol trisphosphate pathway is a key component in Fas-mediated hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *Cardiovascular research* 68: 75-86
- Barauna VG, Magalhaes FC, Campos LC, Reis RI, Kunapuli SP, et al. 2013. Shear stress-induced Ang II AT1 receptor activation: G-protein dependent and independent mechanisms. *Biochemical and biophysical research communications* 434: 647-52
- Barman SA, Marrero MB. 2005. Mechanism of endothelin-1 activation of MAP kinases in neonatal pulmonary vascular smooth muscle. *Lung* 183: 425-39
- Baryshnikov SG, Pulina MV, Zulian A, Linde CI, Golovina VA. 2009. Orail, a critical component of store-operated Ca²⁺ entry, is functionally associated with Na⁺/Ca²⁺ exchanger and plasma membrane Ca²⁺ pump in proliferating human arterial myocytes. *American journal of physiology. Cell physiology* 297: C1103-12

- Batty IH, Downes CP. 1996. Thrombin receptors modulate insulin-stimulated phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate accumulation in 1321N1 astrocytoma cells. *The Biochemical journal* 317 (Pt 2): 347-51
- Baumbach GL, Heistad DD. 1989. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension* 13: 968-72
- Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, et al. 1994. Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 79: 1277-85
- Belin RJ, Sumandea MP, Allen EJ, Schoenfelt K, Wang H, et al. 2007. Augmented protein kinase C-alpha-induced myofilament protein phosphorylation contributes to myofilament dysfunction in experimental congestive heart failure. *Circulation research* 101: 195-204
- Benes C, Soltoff SP. 2001. Modulation of PKCdelta tyrosine phosphorylation and activity in salivary and PC-12 cells by Src kinases. *American journal of physiology. Cell physiology* 280: C1498-510
- Benter IF, Yousif MH, Dhaunsi GS, Kaur J, Chappell MC, Diz DI. 2008. Angiotensin-(1-7) prevents activation of NADPH oxidase and renal vascular dysfunction in diabetic hypertensive rats. *American journal of nephrology* 28: 25-33
- Berk BC. 2001. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiological reviews* 81: 999-1030
- Berk BC, Rao GN. 1993. Angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hypertrophy: PDGF A-chain mediates the increase in cell size. *Journal of cellular physiology* 154: 368-80
- Berk BC, Vekshtein V, Gordon HM, Tsuda T. 1989. Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 13: 305-14
- Berra-Romani R, Mazzocco-Spezia A, Pulina MV, Golovina VA. 2008. Ca²⁺ handling is altered when arterial myocytes progress from a contractile to a proliferative phenotype in culture. *American journal of physiology. Cell physiology* 295: C779-90
- Berridge MJ. 1987. Inositol trisphosphate as a second messenger in signal transduction. *Annals of the New York Academy of Sciences* 494: 39-51
- Berridge MJ. 2005. Unlocking the secrets of cell signaling. *Annual review of physiology* 67: 1-21
- Berts A, Zhong H, Minneman KP. 1999. No role for Ca⁺⁺ or protein kinase C in alpha-1A adrenergic receptor activation of mitogen-activated protein kinase pathways in transfected PC12 cells. *Molecular pharmacology* 55: 296-303
- Birnbaumer L. 1992. Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits. *Cell* 71: 1069-72
- Birukov KG. 2009. Cyclic stretch, reactive oxygen species, and vascular remodeling. *Antioxidants & redox signaling* 11: 1651-67
- Blake RA, Garcia-Paramio P, Parker PJ, Courtneidge SA. 1999. Src promotes PKCdelta degradation. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 10: 231-41
- Bleasdale JE, Bundy GL, Bunting S, Fitzpatrick FA, Huff RM, et al. 1989. Inhibition of phospholipase C dependent processes by U-73, 122. *Advances in prostaglandin, thromboxane, and leukotriene research* 19: 590-3

- Bleeke T, Zhang H, Madamanchi N, Patterson C, Faber JE. 2004. Catecholamine-induced vascular wall growth is dependent on generation of reactive oxygen species. *Circulation research* 94: 37-45
- Bobe R, Hadri L, Lopez JJ, Sassi Y, Atassi F, et al. 2011. SERCA2a controls the mode of agonist-induced intracellular Ca²⁺ signal, transcription factor NFAT and proliferation in human vascular smooth muscle cells. *Journal of molecular and cellular cardiology* 50: 621-33
- Bobik A, Grooms A, Millar JA, Mitchell A, Grinpukel S. 1990. Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. *The American journal of physiology* 258: C408-15
- Boegehold MA. 1998. Heterogeneity of endothelial function within the circulation. *Current opinion in nephrology and hypertension* 7: 71-8
- Bohr DF, Webb RC. 1988. Vascular smooth muscle membrane in hypertension. *Annual review of pharmacology and toxicology* 28: 389-409
- Bouallegue A, Simo Cheyou ER, Anand-Srivastava MB, Srivastava AK. 2013. ET-1-induced growth promoting responses involving ERK1/2 and PKB signaling and Egr-1 expression are mediated by Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase-II in vascular smooth muscle cells. *Cell calcium* 54: 428-35
- Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, Hahn AW, Werner A, Luscher TF. 1992. Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circulation research* 70: 1191-7
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. 1990. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348: 125-32
- Bowling N, Walsh RA, Song G, Estridge T, Sandusky GE, et al. 1999. Increased protein kinase C activity and expression of Ca²⁺-sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation* 99: 384-91
- Braquet P, Chabrier PE, Clostre F. 1994. [Functions of the endothelium]. *Presse medicale* 23: 225-7
- Braszko JJ, J WL, Kupryszewski G, Witczuk B, Wisniewski K. 1988. Behavioral effects of angiotensin II and angiotensin II-(4-8)-pentapeptide in rats. *Physiology & behavior* 44: 327-32
- Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, et al. 1982. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *The New England journal of medicine* 307: 205-11
- Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, et al. 1986. Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circulation research* 59: 297-309
- Budhiraja S, Singh J. 2008. Protein kinase C beta inhibitors: a new therapeutic target for diabetic nephropathy and vascular complications. *Fundamental & clinical pharmacology* 22: 231-40
- Bunney TD, Katan M. 2006. Phospholipase C epsilon: linking second messengers and small GTPases. *Trends in cell biology* 16: 640-8
- Burton AC. 1954. Relation of structure to function of the tissues of the wall of blood vessels. *Physiological reviews* 34: 619-42

- Caldwell KK, Boyajian CL, Cooper DM. 1992. The effects of Ca²⁺ and calmodulin on adenylyl cyclase activity in plasma membranes derived from neural and non-neural cells. *Cell calcium* 13: 107-21
- Callera GE, Tostes RC, Yogi A, Montezano AC, Touyz RM. 2006. Endothelin-1-induced oxidative stress in DOCA-salt hypertension involves NADPH-oxidase-independent mechanisms. *Clinical science* 110: 243-53
- Callera GE, Touyz RM, Teixeira SA, Muscara MN, Carvalho MH, et al. 2003. ETA receptor blockade decreases vascular superoxide generation in DOCA-salt hypertension. *Hypertension* 42: 811-7
- Campbell DJ. 1987. Circulating and tissue angiotensin systems. *The Journal of clinical investigation* 79: 1-6
- Campbell DJ, Habener JF. 1986. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *The Journal of clinical investigation* 78: 31-9
- Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. 1996. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circulation research* 78: 415-23
- Cantley LC. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296: 1655-7
- Cardillo C, Kilcoyne CM, Waclawiw M, Cannon RO, 3rd, Panza JA. 1999. Role of endothelin in the increased vascular tone of patients with essential hypertension. *Hypertension* 33: 753-8
- Caunt CJ, Finch AR, Sedgley KR, McArdle CA. 2006. Seven-transmembrane receptor signalling and ERK compartmentalization. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 17: 276-83
- Celio MR, Inagami T. 1981. Angiotensin II immunoreactivity coexists with renin in the juxtaglomerular granular cells of the kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78: 3897-900
- Chagin AS, Vuppalapati KK, Kobayashi T, Guo J, Hirai T, et al. 2014. G-protein stimulatory subunit alpha and Gq/11alpha G-proteins are both required to maintain quiescent stem-like chondrocytes. *Nature communications* 5: 3673
- Chatterjee PK, Weerackody RP, Mistry SK, Hawksworth GM, McLay JS. 1997. Selective antagonism of the AT1 receptor inhibits angiotensin II stimulated DNA and protein synthesis in primary cultures of human proximal tubular cells. *Kidney international* 52: 699-705
- Chen DD, Dong YG, Yuan H, Chen AF. 2012. Endothelin 1 activation of endothelin A receptor/NADPH oxidase pathway and diminished antioxidants critically contribute to endothelial progenitor cell reduction and dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 59: 1037-43
- Chen J, Kitchen CM, Streb JW, Miano JM. 2002. Myocardin: a component of a molecular switch for smooth muscle differentiation. *Journal of molecular and cellular cardiology* 34: 1345-56
- Chen QW, Edvinsson L, Xu CB. 2009. Role of ERK/MAPK in endothelin receptor signaling in human aortic smooth muscle cells. *BMC cell biology* 10: 52
- Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD. 2001. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 269: 131-40
- Chester AH, Yacoub MH. 2014. The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension. *Global cardiology science & practice* 2014: 62-78

- Cheung N, Sharrett AR, Klein R, Criqui MH, Islam FM, et al. 2007. Aortic distensibility and retinal arteriolar narrowing: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Hypertension* 50: 617-22
- Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. 2015a. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta physiologica* 214: 33-50
- Chistiakov DA, Sobenin IA, Orekhov AN, Bobryshev YV. 2015b. Human miR-221/222 in Physiological and Atherosclerotic Vascular Remodeling. *BioMed research international* 2015: 354517
- Chow LH, Tao PL, Chen YH, Lin YH, Huang EY. 2015. Angiotensin IV possibly acts through PKMzeta in the hippocampus to regulate cognitive memory in rats. *Neuropeptides* 53: 1-10
- Chua BH, Krebs CJ, Chua CC, Diglio CA. 1992. *Endothelin stimulates protein synthesis in smooth muscle cells*. E412-E16 pp.
- Chung CH, Lin KT, Chang CH, Peng HC, Huang TF. 2009. The integrin alpha2beta1 agonist, aggrexin, promotes proliferation and migration of VSMC through NF-kB translocation and PDGF production. *British journal of pharmacology* 156: 846-56
- Ciccarelli A, Giustetto M. 2014. Role of ERK signaling in activity-dependent modifications of histone proteins. *Neuropharmacology* 80: 34-44
- Cohen S. 2008. Origins of growth factors: NGF and EGF. *The Journal of biological chemistry* 283: 33793-7
- Cooper DM, Mons N, Karpen JW. 1995. Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature* 374: 421-4
- Costa AC, Becker LK, Moraes ER, Romero TR, Guzzo L, et al. 2012. Angiotensin-(1-7) induces peripheral antinociception through mas receptor activation in an opioid-independent pathway. *Pharmacology* 89: 137-44
- Cramer H, Schmenger K, Heinrich K, Horstmeyer A, Boning H, et al. 2001. Coupling of endothelin receptors to the ERK/MAP kinase pathway. Roles of palmitoylation and G(alpha)q. *European journal of biochemistry / FEBS* 268: 5449-59
- D'Angelo DD, Sakata Y, Lorenz JN, Boivin GP, Walsh RA, et al. 1997. Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 8121-6
- D'Orleans-Juste P, Plante M, Honore JC, Carrier E, Labonte J. 2003. Synthesis and degradation of endothelin-1. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 81: 503-10
- Dai DF, Johnson SC, Villarin JJ, Chin MT, Nieves-Cintrón M, et al. 2011. Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and Galphaq overexpression-induced heart failure. *Circulation research* 108: 837-46
- Daigle C, Martens FM, Girardot D, Dao HH, Touyz RM, Moreau P. 2004. Signaling of angiotensin II-induced vascular protein synthesis in conduit and resistance arteries in vivo. *BMC cardiovascular disorders* 4: 6
- Danyel LA, Schmerler P, Paulis L, Unger T, Steckelings UM. 2013. Impact of AT2-receptor stimulation on vascular biology, kidney function, and blood pressure. *Integrated blood pressure control* 6: 153-61
- Dao HH, Bouvet C, Moreau S, Beaucage P, Lariviere R, et al. 2006. Endothelin is a dose-dependent trophic factor and a mitogen in small arteries in vivo. *Cardiovascular research* 71: 61-8

- Daou GB, Srivastava AK. 2004. Reactive oxygen species mediate Endothelin-1-induced activation of ERK1/2, PKB, and Pyk2 signaling, as well as protein synthesis, in vascular smooth muscle cells. *Free radical biology & medicine* 37: 208-15
- Daskalopoulou SS, Rabi DM, Zarnke KB, Dasgupta K, Nerenberg K, et al. 2015. The 2015 Canadian Hypertension Education Program recommendations for blood pressure measurement, diagnosis, assessment of risk, prevention, and treatment of hypertension. *The Canadian journal of cardiology* 31: 549-68
- Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A. 1996. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379: 557-60
- Davie N, Haleen SJ, Upton PD, Polak JM, Yacoub MH, et al. 2002. ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *American journal of respiratory and critical care medicine* 165: 398-405
- Delafontaine P, Song YH, Li Y. 2004. Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24: 435-44
- Delcroix M, Howard L. 2015. Pulmonary arterial hypertension: the burden of disease and impact on quality of life. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 24: 621-9
- Dempsey EC, McMurtry IF, O'Brien RF. 1991. Protein kinase C activation allows pulmonary artery smooth muscle cells to proliferate to hypoxia. *The American journal of physiology* 260: L136-45
- Deng LY, Li JS, Schiffrin EL. 1995. Endothelin receptor subtypes in resistance arteries from humans and rats. *Cardiovascular research* 29: 532-5
- Descorbeth M, Anand-Srivastava MB. 2010. Role of oxidative stress in high-glucose- and diabetes-induced increased expression of Gq/11alpha proteins and associated signaling in vascular smooth muscle cells. *Free radical biology & medicine* 49: 1395-405
- Dhaunsi GS, Yousif MH, Akhtar S, Chappell MC, Diz DI, Benter IF. 2010. Angiotensin-(1-7) prevents diabetes-induced attenuation in PPAR-gamma and catalase activities. *European journal of pharmacology* 638: 108-14
- Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26: 3279-90
- Di Fusco F, Anand-Srivastava MB. 2000. Enhanced expression of Gi proteins in non-hypertrophic hearts from rats with hypertension-induced by L-NAME treatment. *Journal of hypertension* 18: 1081-90
- Dimitropoulou C, White RE, Fuchs L, Zhang H, Catravas JD, Carrier GO. 2001. Angiotensin II relaxes microvessels via the AT(2) receptor and Ca(2+)-activated K(+) (BK(Ca)) channels. *Hypertension* 37: 301-7
- Dimmeler S, Zeiher AM. 2007. A "reductionist" view of cardiomyopathy. *Cell* 130: 401-2
- Domanski M, Mitchell G, Pfeffer M, Neaton JD, Norman J, et al. 2002. Pulse pressure and cardiovascular disease-related mortality: follow-up study of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *Jama* 287: 2677-83
- Dong LH, Wen JK, Liu G, McNutt MA, Miao SB, et al. 2010. Blockade of the Ras-extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in smooth muscle 22 alpha-mediated suppression of vascular smooth muscle cell proliferation and neointima hyperplasia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30: 683-91

- Dorer FE, Kahn JR, Lentz KE, Levine M, Skeggs LT. 1972. Purification and properties of angiotensin-converting enzyme from hog lung. *Circulation research* 31: 356-66
- Dorn GW, 2nd, Hahn HS. 2004. Genetic factors in cardiac hypertrophy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1015: 225-37
- Doronzo G, Viretto M, Russo I, Mattiello L, Di Martino L, et al. 2011. Nitric oxide activates PI3-K and MAPK signalling pathways in human and rat vascular smooth muscle cells: influence of insulin resistance and oxidative stress. *Atherosclerosis* 216: 44-53
- Dostal DE, Feng H, Nizamutdinov D, Golden HB, Afroze SH, et al. 2014. Mechanosensing and Regulation of Cardiac Function. *Journal of clinical & experimental cardiology* 5: 314
- Drin G, Scarlata S. 2007. Stimulation of phospholipase Cbeta by membrane interactions, interdomain movement, and G protein binding--how many ways can you activate an enzyme? *Cellular signalling* 19: 1383-92
- Du J, Meng XP, Delafontaine P. 1996. Transcriptional regulation of the insulin-like growth factor-I receptor gene: evidence for protein kinase C-dependent and -independent pathways. *Endocrinology* 137: 1378-84
- Du KL, Ip HS, Li J, Chen M, Dandre F, et al. 2003. Myocardin is a critical serum response factor cofactor in the transcriptional program regulating smooth muscle cell differentiation. *Molecular and cellular biology* 23: 2425-37
- Dupuis J, Stewart DJ, Cernacek P, Gosselin G. 1996. Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation* 94: 1578-84
- Dzau VJ. 1984. Vascular renin-angiotensin: a possible autocrine or paracrine system in control of vascular function. *Journal of cardiovascular pharmacology* 6 Suppl 2: S377-82
- Eckhart AD, Ozaki T, Tevæarai H, Rockman HA, Koch WJ. 2002. Vascular-targeted overexpression of G protein-coupled receptor kinase-2 in transgenic mice attenuates beta-adrenergic receptor signaling and increases resting blood pressure. *Molecular pharmacology* 61: 749-58
- Eddahibi S, Raffestin B, Clozel M, Levame M, Adnot S. 1995. Protection from pulmonary hypertension with an orally active endothelin receptor antagonist in hypoxic rats. *The American journal of physiology* 268: H828-35
- Eguchi S, Iwasaki H, Ueno H, Frank GD, Motley ED, et al. 1999. Intracellular signaling of angiotensin II-induced p70 S6 kinase phosphorylation at Ser(411) in vascular smooth muscle cells. Possible requirement of epidermal growth factor receptor, Ras, extracellular signal-regulated kinase, and Akt. *The Journal of biological chemistry* 274: 36843-51
- Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, Matsumoto T, Yamakawa T, et al. 1998. Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 273: 8890-6
- El-Armouche A, Singh J, Naito H, Wittkopper K, Didie M, et al. 2007. Adenovirus-delivered short hairpin RNA targeting PKCalpha improves contractile function in reconstituted heart tissue. *Journal of molecular and cellular cardiology* 43: 371-6
- El Mabrouk M, Touyz RM, Schiffrin EL. 2001. Differential ANG II-induced growth activation pathways in mesenteric artery smooth muscle cells from SHR. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 281: H30-9

- Engelmann GL, Vitullo JC, Gerrity RG. 1987. Morphometric analysis of cardiac hypertrophy during development, maturation, and senescence in spontaneously hypertensive rats. *Circulation research* 60: 487-94
- Erami C, Zhang H, Ho JG, French DM, Faber JE. 2002. Alpha(1)-adrenoceptor stimulation directly induces growth of vascular wall in vivo. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 283: H1577-87
- Esposito G, Prasad SV, Rapacciuolo A, Mao L, Koch WJ, Rockman HA. 2001. Cardiac overexpression of a G(q) inhibitor blocks induction of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase activity in in vivo pressure overload. *Circulation* 103: 1453-8
- Exton JH. 1996. Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. *Annual review of pharmacology and toxicology* 36: 481-509
- Faenza I, Bregoli L, Ramazzotti G, Gaboardi G, Follo MY, et al. 2008. Nuclear phospholipase C beta1 and cellular differentiation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13: 2452-63
- Fan CY, Katsuyama M, Yabe-Nishimura C. 2005. PKCdelta mediates up-regulation of NOX1, a catalytic subunit of NADPH oxidase, via transactivation of the EGF receptor: possible involvement of PKCdelta in vascular hypertrophy. *The Biochemical journal* 390: 761-7
- Feng J, Roberts MF, Drin G, Scarlata S. 2005. Dissection of the steps of phospholipase C beta 2 activity that are enhanced by G beta gamma subunits. *Biochemistry* 44: 2577-84
- Filtz TM, Grubb DR, McLeod-Dryden TJ, Luo J, Woodcock EA. 2009. Gq-initiated cardiomyocyte hypertrophy is mediated by phospholipase Cbeta1b. *FASEB J* 23: 3564-70
- Fischer OM, Hart S, Gschwind A, Ullrich A. 2003. EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochemical Society transactions* 31: 1203-8
- Fisher SA. 2010. Vascular smooth muscle phenotypic diversity and function. *Physiological genomics* 42A: 169-87
- Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, et al. 1999. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* 401: 493-7
- Flemming PK, Dedman AM, Xu SZ, Li J, Zeng F, et al. 2006. Sensing of lysophospholipids by TRPC5 calcium channel. *The Journal of biological chemistry* 281: 4977-82
- Folli F, Kahn CR, Hansen H, Bouchie JL, Feener EP. 1997. Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. *The Journal of clinical investigation* 100: 2158-69
- Fontes MA, Martins Lima A, Santos RA. 2015. Brain angiotensin-(1-7)/Mas axis: A new target to reduce the cardiovascular risk to emotional stress. *Neuropeptides*
- Fortuno A, San Jose G, Moreno MU, Diez J, Zalba G. 2005. Oxidative stress and vascular remodelling. *Experimental physiology* 90: 457-62
- Frasch SC, Henson PM, Kailey JM, Richter DA, Janes MS, et al. 2000. Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta. *The Journal of biological chemistry* 275: 23065-73
- Fridovich I. 1999. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Annals of the New York Academy of Sciences* 893: 13-8

- Frohlich ED. 1987. Cardiac hypertrophy in hypertension. *The New England journal of medicine* 317: 831-3
- Fujioka S, Niu J, Schmidt C, Sclabas GM, Peng B, et al. 2004. NF-kappaB and AP-1 connection: mechanism of NF-kappaB-dependent regulation of AP-1 activity. *Molecular and cellular biology* 24: 7806-19
- Fukuda N, Kishioka H, Satoh C, Nakayama T, Watanabe Y, et al. 1997. Role of long-form PDGF A-chain in the growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *American journal of hypertension* 10: 1117-24
- Fukuda N, Satoh C, Hu WY, Soma M, Kubo A, et al. 1999. Production of angiotensin II by homogeneous cultures of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19: 1210-7
- Fukumoto S, Nishizawa Y, Hosoi M, Koyama H, Yamakawa K, et al. 1997. Protein kinase C delta inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells by suppressing G1 cyclin expression. *The Journal of biological chemistry* 272: 13816-22
- Furge LL. 2008. Biochemistry of signal transduction and regulation, 4th Ed. by G. Krauss. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 36: 385-85
- Gallegos LL, Newton AC. 2008. Spatiotemporal dynamics of lipid signaling: protein kinase C as a paradigm. *IUBMB life* 60: 782-9
- Gangadharan V, Selvaraj D, Kurejova M, Njoo C, Gritsch S, et al. 2013. A novel biological role for the phospholipid lysophosphatidylinositol in nociceptive sensitization via activation of diverse G-protein signalling pathways in sensory nerves in vivo. *Pain* 154: 2801-12
- Ganten D, Hermann K, Bayer C, Unger T, Lang RE. 1983. Angiotensin synthesis in the brain and increased turnover in hypertensive rats. *Science* 221: 869-71
- Gao YZ, Saphirstein RJ, Yamin R, Suki B, Morgan KG. 2014. Aging impairs smooth muscle-mediated regulation of aortic stiffness: a defect in shock absorption function? *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 307: H1252-61
- Gasic S, Wagner OF, Vierhapper H, Nowotny P, Waldhausl W. 1992. Regional hemodynamic effects and clearance of endothelin-1 in humans: renal and peripheral tissues may contribute to the overall disposal of the peptide. *Journal of cardiovascular pharmacology* 19: 176-80
- Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK. 1988. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circulation research* 62: 749-56
- Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. 1992. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *The Journal of clinical investigation* 90: 456-61
- Gilman AG. 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annual review of biochemistry* 56: 615-49
- Gilman AG. 1995. Nobel Lecture. G proteins and regulation of adenylyl cyclase. *Bioscience reports* 15: 65-97
- Ginnan R, Guikema BJ, Singer HA, Jourde'heil D. 2006. PKC-delta mediates activation of ERK1/2 and induction of iNOS by IL-1beta in vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology. Cell physiology* 290: C1583-91
- Giorgione J, Hysell M, Harvey DF, Newton AC. 2003. Contribution of the C1A and C1B domains to the membrane interaction of protein kinase C. *Biochemistry* 42: 11194-202

- Girerd X, Mourad JJ, Acar C, Heudes D, Chiche S, et al. 1994a. Noninvasive measurement of medium-sized artery intima-media thickness in humans: in vitro validation. *Journal of vascular research* 31: 114-20
- Girerd X, Mourad JJ, Copie X, Moulin C, Acar C, et al. 1994b. Noninvasive detection of an increased vascular mass in untreated hypertensive patients. *American journal of hypertension* 7: 1076-84
- Goddard J, Johnston NR, Hand MF, Cumming AD, Rabelink TJ, et al. 2004. Endothelin-A receptor antagonism reduces blood pressure and increases renal blood flow in hypertensive patients with chronic renal failure: a comparison of selective and combined endothelin receptor blockade. *Circulation* 109: 1186-93
- Goel G, Makkar HP, Francis G, Becker K. 2007. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. *International journal of toxicology* 26: 279-88
- Goldblatt H. 1964. Hypertension of Renal Origin. Historical and Experimental Background. *American journal of surgery* 107: 21-5
- Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN. 2007. G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 26: 3122-42
- Gollasch M, Haase H, Ried C, Lindschau C, Morano I, et al. 1998. L-type calcium channel expression depends on the differentiated state of vascular smooth muscle cells. *FASEB J* 12: 593-601
- Gollasch M, Lohn M, Furstenau M, Nelson MT, Luft FC, Haller H. 2000. Ca²⁺ channels, Ca²⁺ sparks, and regulation of arterial smooth muscle function. *Zeitschrift für Kardiologie* 89 Suppl 2: 15-9
- Golovina VA. 1999. Cell proliferation is associated with enhanced capacitative Ca²⁺ entry in human arterial myocytes. *The American journal of physiology* 277: C343-9
- Gomez Sandoval YH, Anand-Srivastava MB. 2011. Enhanced levels of endogenous endothelin-1 contribute to the over expression of G α protein in vascular smooth muscle cells from SHR: Role of growth factor receptor activation. *Cellular signalling* 23: 354-62
- Gomez Sandoval YH, Levesque LO, Li Y, Anand-Srivastava MB. 2013. Role of epidermal growth factor receptor transactivation in endothelin-1-induced enhanced expression of G β protein and proliferation in A10 vascular smooth muscle cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 91: 221-7
- Goupil E, Fillion D, Clement S, Luo X, Devost D, et al. 2014. Angiotensin II type I and prostaglandin F₂ α receptors cooperatively modulate signaling in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*
- Graness A, Adomeit A, Heinze R, Wetzker R, Liebmann C. 1998. A novel mitogenic signaling pathway of bradykinin in the human colon carcinoma cell line SW-480 involves sequential activation of a Gq/11 protein, phosphatidylinositol 3-kinase beta, and protein kinase Cepsilon. *The Journal of biological chemistry* 273: 32016-22
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. 1994. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation research* 74: 1141-8
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. 2000. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circulation research* 86: 494-501
- Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander RW. 1997. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension* 29: 366-73

- Griffin SA, Brown WC, MacPherson F, McGrath JC, Wilson VG, et al. 1991. Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension* 17: 626-35
- Griol-Charhbili V, Fassot C, Messaoudi S, Perret C, Agrapart V, Jaisser F. 2011. Epidermal growth factor receptor mediates the vascular dysfunction but not the remodeling induced by aldosterone/salt. *Hypertension* 57: 238-44
- Gschwendt M, Muller HJ, Kielbassa K, Zang R, Kittstein W, et al. 1994. Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochemical and biophysical research communications* 199: 93-8
- Gusan S, Anand-Srivastava MB. 2013. cAMP attenuates the enhanced expression of Gi proteins and hyperproliferation of vascular smooth muscle cells from SHR: role of ROS and ROS-mediated signaling. *American journal of physiology. Cell physiology* 304: C1198-209
- Hackel PO, Zwick E, Prenzel N, Ullrich A. 1999. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Current opinion in cell biology* 11: 184-9
- Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. 1990. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiological reviews* 70: 1067-116
- Hahn AW, Resink TJ, Bernhardt J, Ferracin F, Buhler FR. 1991. Stimulation of autocrine platelet--derived growth factor AA-homodimer and transforming growth factor beta in vascular smooth muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications* 178: 1451-8
- Hahn AW, Resink TJ, Scott-Burden T, Powell J, Dohi Y, Buhler FR. 1990. Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell regulation* 1: 649-59
- Haley JE, Abogadie FC, Delmas P, Dayrell M, Vallis Y, et al. 1998. The alpha subunit of Gq contributes to muscarinic inhibition of the M-type potassium current in sympathetic neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18: 4521-31
- Haley JE, Delmas P, Offermanns S, Abogadie FC, Simon MI, et al. 2000. Muscarinic inhibition of calcium current and M current in Galpha q-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20: 3973-9
- Hall KJ, Jones ML, Poole AW. 2007. Coincident regulation of PKCdelta in human platelets by phosphorylation of Tyr311 and Tyr565 and phospholipase C signalling. *The Biochemical journal* 406: 501-9
- Hamet P, Hadrava V, Kruppa U, Tremblay J. 1991. Transforming growth factor beta 1 expression and effect in aortic smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 17: 896-901
- Hamet P, Tremblay J, Pang SC, Walter SV, Wen YI. 1985. Primary versus secondary events in hypertension. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 63: 380-6
- Hamm HE. 1998. The many faces of G protein signaling. *The Journal of biological chemistry* 273: 669-72
- Han M, Dong LH, Zheng B, Shi JH, Wen JK, Cheng Y. 2009. Smooth muscle 22 alpha maintains the differentiated phenotype of vascular smooth muscle cells by inducing filamentous actin bundling. *Life sciences* 84: 394-401

- Harding JW, Cook VI, Miller-Wing AV, Hanesworth JM, Sardinia MF, et al. 1992. Identification of an AII(3-8) [AIV] binding site in guinea pig hippocampus. *Brain research* 583: 340-3
- Hashim S, Anand-Srivastava MB. 2004. Losartan-induced attenuation of blood pressure in L-NAME hypertensive rats is associated with reversal of the enhanced expression of Gi alpha proteins. *Journal of hypertension* 22: 181-90
- Hayashi K, Naiki T. 2009. Adaptation and remodeling of vascular wall; biomechanical response to hypertension. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 2: 3-19
- Hayashi K, Saga H, Chimori Y, Kimura K, Yamanaka Y, Sobue K. 1998. Differentiated phenotype of smooth muscle cells depends on signaling pathways through insulin-like growth factors and phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* 273: 28860-7
- Heeneman S, Sluimer JC, Daemen MJ. 2007. Angiotensin-converting enzyme and vascular remodeling. *Circulation research* 101: 441-54
- Herring BP, Hoggatt AM, Burlak C, Offermanns S. 2014. Previously differentiated medial vascular smooth muscle cells contribute to neointima formation following vascular injury. *Vascular cell* 6: 21
- Hersch E, Huang J, Grider JR, Murthy KS. 2004. Gq/G13 signaling by ET-1 in smooth muscle: MYPT1 phosphorylation via ETA and CPI-17 dephosphorylation via ETB. *American journal of physiology. Cell physiology* 287: C1209-18
- Higuchi S, Ohtsu H, Suzuki H, Shirai H, Frank GD, Eguchi S. 2007. Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clinical science* 112: 417-28
- Hilenski LL, Clempus RE, Quinn MT, Lambeth JD, Griendling KK. 2004. Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24: 677-83
- Hirai Y, Adachi H, Fujiura Y, Hiratsuka A, Enomoto M, Imaizumi T. 2004. Plasma endothelin-1 level is related to renal function and smoking status but not to blood pressure: an epidemiological study. *Journal of hypertension* 22: 713-8
- Hirata Y, Takagi Y, Fukuda Y, Marumo F. 1989. Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 78: 225-8
- Hirschi KK, Majesky MW. 2004. Smooth muscle stem cells. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 276: 22-33
- Hokin LE, Hokin MR. 1953. The incorporation of ³²P into the nucleotides of ribonucleic acid in pigeon pancreas slices. *Biochimica et biophysica acta* 11: 591-2
- Hokin MR, Hokin LE. 1989. The Journal of Biological Chemistry, Volume 203, 1953: Enzyme secretion and the incorporation of ³²P into phospholipides of pancreas slices. *Nutrition reviews* 47: 170-2
- Homma Y, Sakamoto H, Tsunoda M, Aoki M, Takenawa T, Ooyama T. 1993. Evidence for involvement of phospholipase C-gamma 2 in signal transduction of platelet-derived growth factor in vascular smooth-muscle cells. *The Biochemical journal* 290 (Pt 3): 649-53
- Horgan MJ, Pinheiro JM, Malik AB. 1991. Mechanism of endothelin-1-induced pulmonary vasoconstriction. *Circulation research* 69: 157-64

- Horio T, Nishikimi T, Yoshihara F, Matsuo H, Takishita S, Kangawa K. 2000. Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. *Hypertension* 35: 19-24
- Hosokawa H, Aiuchi S, Kambe T, Hagiwara Y, Kubo T. 2002. Mechanical stretch-induced mitogen-activated protein kinase activation is mediated via angiotensin and endothelin systems in vascular smooth muscle cells. *Biological & pharmaceutical bulletin* 25: 1588-92
- Hou M, Pantev E, Moller S, Erlinge D, Edvinsson L. 2000. Angiotensin II type 1 receptors stimulate protein synthesis in human cardiac fibroblasts via a Ca²⁺-sensitive PKC-dependent tyrosine kinase pathway. *Acta physiologica Scandinavica* 168: 301-9
- Hsieh HL, Sun CC, Wang TS, Yang CM. 2008. PKC-delta/c-Src-mediated EGF receptor transactivation regulates thrombin-induced COX-2 expression and PGE(2) production in rat vascular smooth muscle cells. *Biochimica et biophysica acta* 1783: 1563-75
- Hsieh HL, Tung WH, Wu CY, Wang HH, Lin CC, et al. 2009. Thrombin induces EGF receptor expression and cell proliferation via a PKC(delta)/c-Src-dependent pathway in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29: 1594-601
- Hu WY, Fukuda N, Soma M, Izumi Y, Kanmatsuse K. 1998. Bunazosin hydrochloride inhibits exaggerated growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats by suppressing the response to growth factors. *Journal of cardiovascular pharmacology* 32: 975-82
- Hu ZW, Shi XY, Lin RZ, Hoffman BB. 1996. Alpha1 adrenergic receptors activate phosphatidylinositol 3-kinase in human vascular smooth muscle cells. Role in mitogenesis. *The Journal of biological chemistry* 271: 8977-82
- Hubbard KB, Hepler JR. 2006. Cell signalling diversity of the Gqalpha family of heterotrimeric G proteins. *Cellular signalling* 18: 135-50
- Humphries MJ, Limesand KH, Schneider JC, Nakayama KI, Anderson SM, Reyland ME. 2006. Suppression of apoptosis in the protein kinase Cdelta null mouse in vivo. *The Journal of biological chemistry* 281: 9728-37
- Hynynen MM, Khalil RA. 2006. The vascular endothelin system in hypertension--recent patents and discoveries. *Recent patents on cardiovascular drug discovery* 1: 95-108
- hypertension. WHOAgbo. 2013.
- Iglarz M, Touyz RM, Viel EC, Paradis P, Amiri F, et al. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and receptor-gamma activators prevent cardiac fibrosis in mineralocorticoid-dependent hypertension. *Hypertension* 42: 737-43
- Ihara E, Hirano K, Hirano M, Nishimura J, Nawata H, Kanaide H. 2002. Mechanism of down-regulation of L-type Ca(2+) channel in the proliferating smooth muscle cells of rat aorta. *J Cell Biochem* 87: 242-51
- Imamura T, Ishibashi K, Dalle S, Ugi S, Olefsky JM. 1999. Endothelin-1-induced GLUT4 translocation is mediated via Galpha(q/11) protein and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 274: 33691-5
- Ingelfinger JR. 2009. Angiotensin-converting enzyme 2: implications for blood pressure and kidney disease. *Current opinion in nephrology and hypertension* 18: 79-84
- Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyachi T, et al. 1989. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three

- separate genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 2863-7
- Intengan HD, Schiffrin EL. 2000. Disparate effects of carvedilol versus metoprolol treatment of stroke-prone spontaneously hypertensive rats on endothelial function of resistance arteries. *Journal of cardiovascular pharmacology* 35: 763-8
- Ishida M, Ishida T, Thomas SM, Berk BC. 1998. Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) by angiotensin II is dependent on c-Src in vascular smooth muscle cells. *Circulation research* 82: 7-12
- Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ. 1993. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *The Journal of clinical investigation* 91: 2268-74
- Ivy D, McMurtry IF, Yanagisawa M, Gariepy CE, Le Cras TD, et al. 2001. Endothelin B receptor deficiency potentiates ET-1 and hypoxic pulmonary vasoconstriction. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 280: L1040-8
- Ivy DD, Parker TA, Abman SH. 2000. Prolonged endothelin B receptor blockade causes pulmonary hypertension in the ovine fetus. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 279: L758-65
- Iwasaki H, Eguchi S, Ueno H, Marumo F, Hirata Y. 1999. Endothelin-mediated vascular growth requires p42/p44 mitogen-activated protein kinase and p70 S6 kinase cascades via transactivation of epidermal growth factor receptor. *Endocrinology* 140: 4659-68
- Jahan H, Kobayashi S, Nishimura J, Kanaide H. 1996. Endothelin-1 and angiotensin II act as progression but not competence growth factors in vascular smooth muscle cells. *European journal of pharmacology* 295: 261-9
- Jalili T, Takeishi Y, Song G, Ball NA, Howles G, Walsh RA. 1999. PKC translocation without changes in Galphaq and PLC-beta protein abundance in cardiac hypertrophy and failure. *The American journal of physiology* 277: H2298-304
- Jiang ZY, Zhou QL, Chatterjee A, Feener EP, Myers MG, Jr., et al. 1999. Endothelin-1 modulates insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase pathway in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 48: 1120-30
- Johansson GS, Arnqvist HJ. 2006. Insulin and IGF-I action on insulin receptors, IGF-I receptors, and hybrid insulin/IGF-I receptors in vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 291: E1124-30
- Johnstone SR, Kroncke BM, Straub AC, Best AK, Dunn CA, et al. 2012. MAPK phosphorylation of connexin 43 promotes binding of cyclin E and smooth muscle cell proliferation. *Circulation research* 111: 201-11
- Jones S, Brown DA, Milligan G, Willer E, Buckley NJ, Caulfield MP. 1995. Bradykinin excites rat sympathetic neurons by inhibition of M current through a mechanism involving B2 receptors and G alpha q/11. *Neuron* 14: 399-405
- Ju H, Zhao S, Tappia PS, Panagia V, Dixon IM. 1998. Expression of Gq alpha and PLC-beta in scar and border tissue in heart failure due to myocardial infarction. *Circulation* 97: 892-9
- Kagiyama S, Eguchi S, Frank GD, Inagami T, Zhang YC, Phillips MI. 2002. Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and hypertension are attenuated by epidermal growth factor receptor antisense. *Circulation* 106: 909-12

- Kagiyama S, Qian K, Kagiyama T, Phillips MI. 2003. Antisense to epidermal growth factor receptor prevents the development of left ventricular hypertrophy. *Hypertension* 41: 824-9
- Kahler J, Mendel S, Weckmuller J, Orzechowski HD, Mittmann C, et al. 2000. Oxidative stress increases synthesis of big endothelin-1 by activation of the endothelin-1 promoter. *Journal of molecular and cellular cardiology* 32: 1429-37
- Kassab S, Novak J, Miller T, Kirchner K, Granger J. 1997. Role of endothelin in mediating the attenuated renal hemodynamics in Dahl salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 30: 682-6
- Katada J, Majima M. 2002. AT(2) receptor-dependent vasodilation is mediated by activation of vascular kinin generation under flow conditions. *British journal of pharmacology* 136: 484-91
- Katsuyama M, Fan C, Yabe-Nishimura C. 2002. NADPH oxidase is involved in prostaglandin F2alpha-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells: induction of NOX1 by PGF2alpha. *The Journal of biological chemistry* 277: 13438-42
- Kawai-Kowase K, Owens GK. 2007. Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology. Cell physiology* 292: C59-69
- Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. 2005. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 365: 217-23
- Kehrer JP. 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical reviews in toxicology* 23: 21-48
- Kehrl JH. 1998. Heterotrimeric G protein signaling: roles in immune function and fine-tuning by RGS proteins. *Immunity* 8: 1-10
- Keys JR, Greene EA, Koch WJ, Eckhart AD. 2002. Gq-coupled receptor agonists mediate cardiac hypertrophy via the vasculature. *Hypertension* 40: 660-6
- Kikkawa U, Matsuzaki H, Yamamoto T. 2002. Protein kinase C delta (PKC delta): activation mechanisms and functions. *Journal of biochemistry* 132: 831-9
- Koch WJ, Rockman HA, Samama P, Hamilton RA, Bond RA, et al. 1995. Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor. *Science* 268: 1350-3
- Kohler N, Lipton A. 1974. Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Experimental cell research* 87: 297-301
- Koibuchi Y, Lee WS, Gibbons GH, Pratt RE. 1993. Role of transforming growth factor-beta 1 in the cellular growth response to angiotensin II. *Hypertension* 21: 1046-50
- Korsgaard N, Mulvany MJ. 1988. Cellular hypertrophy in mesenteric resistance vessels from renal hypertensive rats. *Hypertension* 12: 162-7
- Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Kirima K, Tamaki T. 2001. Antioxidants inhibit JNK and p38 MAPK activation but not ERK 1/2 activation by angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 24: 251-61
- Lappas G, Daou GB, Anand-Srivastava MB. 2005. Oxidative stress contributes to the enhanced expression of G1alpha proteins and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension* 23: 2251-61

- Lawes CM, Vander Hoorn S, Rodgers A, International Society of H. 2008. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *Lancet* 371: 1513-8
- Le Mellay V, Grosse B, Lieberherr M. 1997. Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol. *The Journal of biological chemistry* 272: 11902-7
- Leitges M, Mayr M, Braun U, Mayr U, Li C, et al. 2001. Exacerbated vein graft arteriosclerosis in protein kinase Cdelta-null mice. *The Journal of clinical investigation* 108: 1505-12
- Leszczynski D, Joenvaara S, Foegh ML. 1996. Protein kinase C-alpha regulates proliferation but not apoptosis in rat coronary vascular smooth muscle cells. *Life sciences* 58: 599-606
- Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. 1990. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *The New England journal of medicine* 322: 1561-6
- Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. 1998. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Advances in cancer research* 74: 49-139
- Li C, Wernig F, Leitges M, Hu Y, Xu Q. 2003a. Mechanical stress-activated PKCdelta regulates smooth muscle cell migration. *FASEB J* 17: 2106-8
- Li JS, Lariviere R, Schiffrin EL. 1994. Effect of a nonselective endothelin antagonist on vascular remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Evidence for a role of endothelin in vascular hypertrophy. *Hypertension* 24: 183-8
- Li L, Chu Y, Fink GD, Engelhardt JF, Heistad DD, Chen AF. 2003b. Endothelin-1 stimulates arterial VCAM-1 expression via NADPH oxidase-derived superoxide in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension* 42: 997-1003
- Li L, Watts SW, Banes AK, Galligan JJ, Fink GD, Chen AF. 2003c. NADPH oxidase-derived superoxide augments endothelin-1-induced vasoconstriction in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension* 42: 316-21
- Li Y, Anand-Srivastava MB. 2002. Inactivation of enhanced expression of G(i) proteins by pertussis toxin attenuates the development of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Circulation research* 91: 247-54
- Li Y, Levesque LO, Anand-Srivastava MB. 2010. Epidermal growth factor receptor transactivation by endogenous vasoactive peptides contributes to hyperproliferation of vascular smooth muscle cells of SHR. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 299: H1959-67
- Lin L, Liu X, Xu J, Weng L, Ren J, et al. 2015. Mas receptor mediates cardioprotection of angiotensin-(1-7) against Angiotensin II-induced cardiomyocyte autophagy and cardiac remodelling through inhibition of oxidative stress. *Journal of cellular and molecular medicine*
- Lin MJ, Leung GP, Zhang WM, Yang XR, Yip KP, et al. 2004. Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca²⁺ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. *Circulation research* 95: 496-505
- Lips DJ, deWindt LJ, van Kraaij DJ, Doevendans PA. 2003. Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *European heart journal* 24: 883-96

- Lipskaia L, del Monte F, Capiod T, Yacoubi S, Hadri L, et al. 2005. Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene transfer reduces vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat. *Circulation research* 97: 488-95
- Liu Q, Chen X, Macdonnell SM, Kranias EG, Lorenz JN, et al. 2009. Protein kinase C{alpha}, but not PKC{beta} or PKC{gamma}, regulates contractility and heart failure susceptibility: implications for ruboxistaurin as a novel therapeutic approach. *Circulation research* 105: 194-200
- Liu Q, Chen Y, Auger-Messier M, Molkentin JD. 2012. Interaction between NFkappaB and NFAT coordinates cardiac hypertrophy and pathological remodeling. *Circulation research* 110: 1077-86
- Liu R, O'Connell M, Johnson K, Pritzker K, Mackman N, Terkeltaub R. 2000. Extracellular signal-regulated kinase 1/extracellular signal-regulated kinase 2 mitogen-activated protein kinase signaling and activation of activator protein 1 and nuclear factor kappaB transcription factors play central roles in interleukin-8 expression stimulated by monosodium urate monohydrate and calcium pyrophosphate crystals in monocytic cells. *Arthritis and rheumatism* 43: 1145-55
- Lodish H. 2004. *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman.
- Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1990. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248: 1547-50
- London B. 2006. Natriuretic peptides and cardiac hypertrophy. *Journal of the American College of Cardiology* 48: 506-7
- Lu MH, Chao CF, Huang CG, Chang LT. 2003. Coculture of vascular endothelial cells and smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Clinical and experimental hypertension* 25: 413-25
- Luttrell LM, Daaka Y, Lefkowitz RJ. 1999. Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Current opinion in cell biology* 11: 177-83
- Lv P, Miao SB, Shu YN, Dong LH, Liu G, et al. 2012. Phosphorylation of smooth muscle 22alpha facilitates angiotensin II-induced ROS production via activation of the PKCdelta-P47phox axis through release of PKCdelta and actin dynamics and is associated with hypertrophy and hyperplasia of vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Circulation research* 111: 697-707
- Lyle AN, Deshpande NN, Taniyama Y, Seidel-Rogol B, Pounkova L, et al. 2009. Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells. *Circulation research* 105: 249-59
- Ma YH, Ling S, Ives HE. 1999. Mechanical strain increases PDGF-B and PDGF beta receptor expression in vascular smooth muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications* 265: 606-10
- Macian F, Lopez-Rodriguez C, Rao A. 2001. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 20: 2476-89
- Macmillan D, McCarron JG. 2010. The phospholipase C inhibitor U-73122 inhibits Ca(2+) release from the intracellular sarcoplasmic reticulum Ca(2+) store by inhibiting Ca(2+) pumps in smooth muscle. *British journal of pharmacology* 160: 1295-301
- Macrez-Lepretre N, Kalkbrenner F, Schultz G, Mironneau J. 1997. Distinct functions of Gq and G11 proteins in coupling alpha1-adrenoreceptors to Ca²⁺ release and Ca²⁺ entry in rat portal vein myocytes. *The Journal of biological chemistry* 272: 5261-8

- Majack RA, Majesky MW, Goodman LV. 1990. Role of PDGF-A expression in the control of vascular smooth muscle cell growth by transforming growth factor-beta. *The Journal of cell biology* 111: 239-47
- Majesky MW. 2007. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27: 1248-58
- Malek A, Izumo S. 1992. Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium. *The American journal of physiology* 263: C389-96
- Marc Y, Llorens-Cortes C. 2011. The role of the brain renin-angiotensin system in hypertension: implications for new treatment. *Progress in neurobiology* 95: 89-103
- Marchand A, Abi-Gerges A, Saliba Y, Merlet E, Lompre AM. 2012. Calcium signaling in vascular smooth muscle cells: from physiology to pathology. *Advances in experimental medicine and biology* 740: 795-810
- Marieb EN, Lachaine R, Moussakova L, Hoehn K. 2010. *Anatomie et physiologie humaines*. Pearson.
- Marrelli SP. 2001. Mechanisms of endothelial P2Y(1)- and P2Y(2)-mediated vasodilatation involve differential $[Ca^{2+}]_i$ responses. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 281: H1759-66
- Marrelli SP, Eckmann MS, Hunte MS. 2003. Role of endothelial intermediate conductance K_{Ca} channels in cerebral EDHF-mediated dilations. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 285: H1590-9
- Marrero MB, Paxton WG, Duff JL, Berk BC, Bernstein KE. 1994. Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 269: 10935-9
- Matassa AA, Carpenter L, Biden TJ, Humphries MJ, Reyland ME. 2001. PKCdelta is required for mitochondrial-dependent apoptosis in salivary epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 276: 29719-28
- Matchkov VV, Kudryavtseva O, Aalkjaer C. 2012. Intracellular Ca(2)(+) signalling and phenotype of vascular smooth muscle cells. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 110: 42-8
- Matrougui K, Loufrani L, Heymes C, Levy BI, Henrion D. 1999. Activation of AT(2) receptors by endogenous angiotensin II is involved in flow-induced dilation in rat resistance arteries. *Hypertension* 34: 659-65
- Meij JT. 1996. Regulation of G protein function: implications for heart disease. *Molecular and cellular biochemistry* 157: 31-8
- Mende U, Kagen A, Meister M, Neer EJ. 1999. Signal transduction in atria and ventricles of mice with transient cardiac expression of activated G protein alpha(q). *Circulation research* 85: 1085-91
- Mendelson K, Swendeman S, Saftig P, Blobel CP. 2010. Stimulation of platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFRbeta) activates ADAM17 and promotes metalloproteinase-dependent cross-talk between the PDGFRbeta and epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* 285: 25024-32
- Mikawa T, Gourdie RG. 1996. Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Developmental biology* 174: 221-32

- Millar JA, Lever AF. 2000. Implications of pulse pressure as a predictor of cardiac risk in patients with hypertension. *Hypertension* 36: 907-11
- Milstien S, Katusic Z. 1999. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochemical and biophysical research communications* 263: 681-4
- Miyazaki M, Okamura T, Okunishi H, Toda N. 1986. Vascular angiotensin converting enzyme in the development of renal hypertension. *Journal of cardiovascular pharmacology* 8 Suppl 10: S58-61
- Molkentin JD. 2004. *Calcineurin–NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs*. 467-75 pp.
- Montezano AC, Touyz RM. 2014. Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research. *Antioxidants & redox signaling* 20: 164-82
- Moreau P, Dao HH. 1999. Endothelin receptor antagonists: novel agents for the treatment of hypertension? *Expert opinion on investigational drugs* 8: 1807-21
- Moreland S, McMullen DM, Delaney CL, Lee VG, Hunt JT. 1992. Venous smooth muscle contains vasoconstrictor ETB-like receptors. *Biochemical and biophysical research communications* 184: 100-6
- Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Lee W, Zhang L, et al. 1994. Evidence for direct local effect of angiotensin in vascular hypertrophy. In vivo gene transfer of angiotensin converting enzyme. *The Journal of clinical investigation* 94: 978-84
- Morishita R, Higaki J, Miyazaki M, Ogihara T. 1992. Possible role of the vascular renin-angiotensin system in hypertension and vascular hypertrophy. *Hypertension* 19: II62-7
- Mourad JJ, Girerd X, Boutouyrie P, Safar M, Laurent S. 1998. Opposite effects of remodeling and hypertrophy on arterial compliance in hypertension. *Hypertension* 31: 529-33
- Mulvany MJ. 1993. Control of vascular structure. *The American journal of medicine* 94: 20S-23S
- Mulvany MJ. 1999. Vascular remodelling of resistance vessels: can we define this? *Cardiovascular research* 41: 9-13
- Nabha L, Garbern JC, Buller CL, Charpie JR. 2005. Vascular oxidative stress precedes high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Clinical and experimental hypertension* 27: 71-82
- Naftilan AJ, Pratt RE, Dzau VJ. 1989. Induction of platelet-derived growth factor A-chain and c-myc gene expressions by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *The Journal of clinical investigation* 83: 1419-24
- Nahmias C, Strosberg AD. 1995. The angiotensin AT2 receptor: searching for signal-transduction pathways and physiological function. *Trends in pharmacological sciences* 16: 223-5
- Nakai K, Yoneda K, Igarashi J, Moriue T, Kosaka H, Kubota Y. 2008. Angiotensin II enhances EGF receptor expression levels via ROS formation in HaCaT cells. *Journal of dermatological science* 51: 181-9
- Nakashima H, Frank GD, Shirai H, Hinoki A, Higuchi S, et al. 2008. Novel role of protein kinase C-delta Tyr 311 phosphorylation in vascular smooth muscle cell hypertrophy by angiotensin II. *Hypertension* 51: 232-8
- Neer EJ. 1995. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80: 249-57

- Negoro N, Kanayama Y, Haraguchi M, Umetani N, Nishimura M, et al. 1995. Blood pressure regulates platelet-derived growth factor A-chain gene expression in vascular smooth muscle cells in vivo. An autocrine mechanism promoting hypertensive vascular hypertrophy. *The Journal of clinical investigation* 95: 1140-50
- Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, et al. 1995. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* 270: 633-7
- Newton AC. 1997. Regulation of protein kinase C. *Current opinion in cell biology* 9: 161-7
- Newton AC. 2001. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chemical reviews* 101: 2353-64
- Neylon CB, Lang RJ, Fu Y, Bobik A, Reinhart PH. 1999. Molecular cloning and characterization of the intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel in vascular smooth muscle: relationship between K(Ca) channel diversity and smooth muscle cell function. *Circulation research* 85: e33-43
- Ng KK, Vane JR. 1967. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Nature* 216: 762-6
- Nguyen Dinh Cat A, Briones AM, Callera GE, Yogi A, He Y, et al. 2011. Adipocyte-derived factors regulate vascular smooth muscle cells through mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Hypertension* 58: 479-88
- Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. 2007. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiological reviews* 87: 165-217
- Noon JP, Rice PJ, Baldessarini RJ. 1978. Calcium leakage as a cause of the high resting tension in vascular smooth muscle from the spontaneously hypertensive rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75: 1605-7
- Ocharan E, Asbun J, Calzada C, Mendez E, Nunez M, et al. 2005. Caveolin scaffolding peptide-1 interferes with norepinephrine-induced PLC-beta activation in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Journal of cardiovascular pharmacology* 46: 615-21
- Offermanns S, Hashimoto K, Watanabe M, Sun W, Kurihara H, et al. 1997. Impaired motor coordination and persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking Galphaq. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 14089-94
- Offermanns S, Simon MI. 1996. Organization of transmembrane signalling by heterotrimeric G proteins. *Cancer surveys* 27: 177-98
- Offermanns S, Zhao LP, Gohla A, Sarosi I, Simon MI, Wilkie TM. 1998. Embryonic cardiomyocyte hypoplasia and craniofacial defects in G alpha q/G alpha 11-mutant mice. *The EMBO journal* 17: 4304-12
- Ogata N, Shinoda Y, Wettschureck N, Offermanns S, Takeda S, et al. 2011. G alpha(q) signal in osteoblasts is inhibitory to the osteoanabolic action of parathyroid hormone. *The Journal of biological chemistry* 286: 13733-40
- Ohanian V, Ohanian J, Shaw L, Scarth S, Parker PJ, Heagerty AM. 1996. Identification of protein kinase C isoforms in rat mesenteric small arteries and their possible role in agonist-induced contraction. *Circulation research* 78: 806-12
- Ohtsu H, Higuchi S, Shirai H, Eguchi K, Suzuki H, et al. 2008. Central role of Gq in the hypertrophic signal transduction of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 149: 3569-75
- Oligny-Longpre G, Corbani M, Zhou J, Hogue M, Guillon G, Bouvier M. 2012. Engagement of beta-arrestin by transactivated insulin-like growth factor receptor is needed for V2

- vasopressin receptor-stimulated ERK1/2 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: E1028-37
- Olson ER, Shamhart PE, Naugle JE, Meszaros JG. 2008. Angiotensin II-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation is mediated by protein kinase Cdelta and intracellular calcium in adult rat cardiac fibroblasts. *Hypertension* 51: 704-11
- Orlov S, Resink TJ, Bernhardt J, Ferracin F, Buhler FR. 1993. Vascular smooth muscle cell calcium fluxes. Regulation by angiotensin II and lipoproteins. *Hypertension* 21: 195-203
- Owens GK. 1995. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiological reviews* 75: 487-517
- Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. 2004. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiological reviews* 84: 767-801
- Owens GK, Schwartz SM. 1982. Alterations in vascular smooth muscle mass in the spontaneously hypertensive rat. Role of cellular hypertrophy, hyperploidy, and hyperplasia. *Circulation research* 51: 280-9
- Pai R, Szabo IL, Soreghan BA, Atay S, Kawanaka H, Tarnawski AS. 2001. PGE(2) stimulates VEGF expression in endothelial cells via ERK2/JNK1 signaling pathways. *Biochemical and biophysical research communications* 286: 923-8
- Palaniyandi SS, Sun L, Ferreira JC, Mochly-Rosen D. 2009. Protein kinase C in heart failure: a therapeutic target? *Cardiovascular research* 82: 229-39
- Papathanasiou G, Zerva E, Zacharis I, Papandreou M, Papageorgiou E, et al. 2015. Association of high blood pressure with body mass index, smoking and physical activity in healthy young adults. *The open cardiovascular medicine journal* 9: 5-17
- Parekh AB, Penner R. 1997. Store depletion and calcium influx. *Physiological reviews* 77: 901-30
- Parekh AB, Putney JW, Jr. 2005. Store-operated calcium channels. *Physiological reviews* 85: 757-810
- Parenti A, Brogelli L, Donnini S, Ziche M, Ledda F. 2001. ANG II potentiates mitogenic effect of norepinephrine in vascular muscle cells: role of FGF-2. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 280: H99-H107
- Paria BC, Malik AB, Kwiatek AM, Rahman A, May MJ, et al. 2003. Tumor necrosis factor-alpha induces nuclear factor-kappaB-dependent TRPC1 expression in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 278: 37195-203
- Parker SB, Wade SS, Prewitt RL. 1998. Pressure mediates angiotensin II-induced arterial hypertrophy and PDGF-A expression. *Hypertension* 32: 452-8
- Patterson RL, van Rossum DB, Nikolaidis N, Gill DL, Snyder SH. 2005. Phospholipase C-gamma: diverse roles in receptor-mediated calcium signaling. *Trends in biochemical sciences* 30: 688-97
- Paul M, Ganten D. 1992. The molecular basis of cardiovascular hypertrophy: the role of the renin-angiotensin system. *Journal of cardiovascular pharmacology* 19 Suppl 5: S51-8
- Peavy RD, Chang MS, Sanders-Bush E, Conn PJ. 2001. Metabotropic glutamate receptor 5-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in astrocytes depends on transactivation of the epidermal growth factor receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21: 9619-28

- Peavy RD, Hubbard KB, Lau A, Fields RB, Xu K, et al. 2005. Differential effects of Gq alpha, G14 alpha, and G15 alpha on vascular smooth muscle cell survival and gene expression profiles. *Molecular pharmacology* 67: 2102-14
- Pitulescu ME, Adams RH. 2014. Regulation of signaling interactions and receptor endocytosis in growing blood vessels. *Cell adhesion & migration* 8: 366-77
- Plato CF, Pollock DM, Garvin JL. 2000. Endothelin inhibits thick ascending limb chloride flux via ET(B) receptor-mediated NO release. *American journal of physiology. Renal physiology* 279: F326-33
- Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, et al. 1999. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402: 884-8
- Prigent SA, Lemoine NR. 1992. The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Progress in growth factor research* 4: 1-24
- Pugsley MK, Tabrizchi R. 2000. The vascular system. An overview of structure and function. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 44: 333-40
- Purcell C, Tennant M, McGeachie J. 1997. Neo-intimal hyperplasia in vascular grafts and its implications for autologous arterial grafting. *Annals of the Royal College of Surgeons of England* 79: 164-8
- Putney JW, Jr., Broad LM, Braun FJ, Lievremont JP, Bird GS. 2001. Mechanisms of capacitative calcium entry. *Journal of cell science* 114: 2223-9
- Quehenberger P, Exner M, Sunder-Plassmann R, Ruzicka K, Bieglmayer C, et al. 2002. Leptin induces endothelin-1 in endothelial cells in vitro. *Circulation research* 90: 711-8
- Rabelink TJ, Kaasjager KA, Boer P, Stroes EG, Braam B, Koomans HA. 1994. Effects of endothelin-1 on renal function in humans: implications for physiology and pathophysiology. *Kidney international* 46: 376-81
- Rahman MM, Gilmour S. 2014. Prevention and control of hypertension in different countries. *Jama* 311: 418-9
- Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, et al. 1996. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *The Journal of clinical investigation* 97: 1916-23
- Rao GN, Katki KA, Madamanchi NR, Wu Y, Birrer MJ. 1999. JunB forms the majority of the AP-1 complex and is a target for redox regulation by receptor tyrosine kinase and G protein-coupled receptor agonists in smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 274: 6003-10
- Rautureau Y, Schiffrin EL. 2012. Endothelin in hypertension: an update. *Current opinion in nephrology and hypertension* 21: 128-36
- Reaux A, Fournie-Zaluski MC, David C, Zini S, Roques BP, et al. 1999. Aminopeptidase A inhibitors as potential central antihypertensive agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 13415-20
- Rebecchi MJ, Pentyala SN. 2000. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiological reviews* 80: 1291-335
- Reyland ME, Anderson SM, Matassa AA, Barzen KA, Quissell DO. 1999. Protein kinase C delta is essential for etoposide-induced apoptosis in salivary gland acinar cells. *The Journal of biological chemistry* 274: 19115-23

- Rhee SG. 2001. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annual review of biochemistry* 70: 281-312
- Rice KM, Uddemarr S, Desai DH, Morrison RG, Harris R, et al. 2008. PGF₂α-associated vascular smooth muscle hypertrophy is ROS dependent and involves the activation of mTOR, p70S6k, and PTEN. *Prostaglandins & other lipid mediators* 85: 49-57
- Richard S, Neveu D, Carnac G, Bodin P, Travo P, Nargeot J. 1992. Differential expression of voltage-gated Ca²⁺-currents in cultivated aortic myocytes. *Biochimica et biophysica acta* 1160: 95-104
- Riley WA, Barnes RW, Evans GW, Burke GL. 1992. Ultrasonic measurement of the elastic modulus of the common carotid artery. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 23: 952-6
- Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. 1993. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *The New England journal of medicine* 328: 1450-6
- Robida AM, Xu K, Ellington ML, Murphy TJ. 2000. Cyclosporin A selectively inhibits mitogen-induced cyclooxygenase-2 gene transcription in vascular smooth muscle cells. *Molecular pharmacology* 58: 701-8
- Rockman HA, Choi DJ, Akhter SA, Jaber M, Giros B, et al. 1998. Control of myocardial contractile function by the level of beta-adrenergic receptor kinase 1 in gene-targeted mice. *The Journal of biological chemistry* 273: 18180-4
- Roman MJ, Saba PS, Pini R, Spitzer M, Pickering TG, et al. 1992. Parallel cardiac and vascular adaptation in hypertension. *Circulation* 86: 1909-18
- Ronson RS, Nakamura M, Vinten-Johansen J. 1999. The cardiovascular effects and implications of peroxynitrite. *Cardiovascular research* 44: 47-59
- Ross EM. 2011. Galpha(q) and phospholipase C-beta: turn on, turn off, and do it fast. *Science signaling* 4: pe5
- Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. 1974. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71: 1207-10
- Ruiz-Ortega M, Esteban V, Suzuki Y, Ruperez M, Mezzano S, et al. 2003. Renal expression of angiotensin type 2 (AT2) receptors during kidney damage. *Kidney international. Supplement*: S21-6
- Russell FD, Davenport AP. 1995. Characterization of endothelin receptors in the human pulmonary vasculature using bosentan, SB209670, and 97-139. *Journal of cardiovascular pharmacology* 26 Suppl 3: S346-7
- Rzucidlo EM, Martin KA, Powell RJ. 2007. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *Journal of vascular surgery* 45 Suppl A: A25-32
- Sacktor TC, Osten P, Valsamis H, Jiang X, Naik MU, Sublette E. 1993. Persistent activation of the zeta isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 8342-6
- Sadoshima J, Izumo S. 1996. The heterotrimeric G q protein-coupled angiotensin II receptor activates p21 ras via the tyrosine kinase-Shc-Grb2-Sos pathway in cardiac myocytes. *The EMBO journal* 15: 775-87

- Sadoshima J, Jahn L, Takahashi T, Kulik TJ, Izumo S. 1992. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. *The Journal of biological chemistry* 267: 10551-60
- Saha S, Li Y, Anand-Srivastava MB. 2008. Reduced levels of cyclic AMP contribute to the enhanced oxidative stress in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 86: 190-8
- Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, et al. 1990. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348: 732-5
- Salamanca DA, Khalil RA. 2005. Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. *Biochemical pharmacology* 70: 1537-47
- Sanchez A, Martinez P, Munoz M, Benedito S, Garcia-Sacristan A, et al. 2014. Endothelin-1 contributes to endothelial dysfunction and enhanced vasoconstriction through augmented superoxide production in penile arteries from insulin-resistant obese rats: role of ETA and ETB receptors. *British journal of pharmacology* 171: 5682-95
- Sandoval YH, Li Y, Anand-Srivastava MB. 2011. Transactivation of epidermal growth factor receptor by enhanced levels of endogenous angiotensin II contributes to the overexpression of G α proteins in vascular smooth muscle cells from SHR. *Cellular signalling* 23: 1716-26
- Santos RA, Ferreira AJ. 2007. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Current opinion in nephrology and hypertension* 16: 122-8
- Saphirstein RJ, Gao YZ, Jensen MH, Gallant CM, Vetterkind S, et al. 2013. The focal adhesion: a regulated component of aortic stiffness. *PloS one* 8: e62461
- Sato T, Amemiya T. 1995. [Endothelin receptors in bovine retinal vessels--quantitative receptor autographic analysis with radioluminography]. *Nippon Ganka Gakkai zasshi* 99: 546-51
- Satoh C, Fukuda N, Hu WY, Nakayama M, Kishioka H, Kanmatsuse K. 2001. Role of endogenous angiotensin II in the increased expression of growth factors in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Journal of cardiovascular pharmacology* 37: 108-18
- Savage DD, Levy D, Dannenberg AL, Garrison RJ, Castelli WP. 1990. Association of echocardiographic left ventricular mass with body size, blood pressure and physical activity (the Framingham Study). *The American journal of cardiology* 65: 371-6
- Savoia C, Burger D, Nishigaki N, Montezano A, Touyz RM. 2011. Angiotensin II and the vascular phenotype in hypertension. *Expert reviews in molecular medicine* 13: e11
- Sawaki K, Hiramatsu Y, Baum BJ, Ambudkar IS. 1993. Involvement of G α q/11 in m3-muscarinic receptor stimulation of phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate-specific phospholipase C in rat parotid gland membranes. *Archives of biochemistry and biophysics* 305: 546-50
- Saward L, Zahradka P. 1997. Angiotensin II activates phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *Circulation research* 81: 249-57
- Scheidegger KJ, Du J, Delafontaine P. 1999. Distinct and common pathways in the regulation of insulin-like growth factor-1 receptor gene expression by angiotensin II and basic fibroblast growth factor. *The Journal of biological chemistry* 274: 3522-30

- Schelling JR, Nkemere N, Konieczkowski M, Martin KA, Dubyak GR. 1997. Angiotensin II activates the beta 1 isoform of phospholipase C in vascular smooth muscle cells. *The American journal of physiology* 272: C1558-66
- Schiffirin EL. 1995. Endothelin: potential role in hypertension and vascular hypertrophy. *Hypertension* 25: 1135-43
- Schiffirin EL. 1999. State-of-the-Art lecture. Role of endothelin-1 in hypertension. *Hypertension* 34: 876-81
- Schiffirin EL, Lariviere R, Li JS, Sventek P, Touyz RM. 1995. Deoxycorticosterone acetate plus salt induces overexpression of vascular endothelin-1 and severe vascular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 25: 769-73
- Schiffirin EL, Touyz RM. 2003. Inflammation and vascular hypertrophy induced by angiotensin II: role of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species independently of blood pressure elevation? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23: 707-9
- Schlezinger JJ, Jensen BA, Mann KK, Ryu HY, Sherr DH. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated NF-kappa B activation and apoptosis in pre-B cells. *Journal of immunology* 169: 6831-41
- Schnabel P, Gas H, Nohr T, Camps M, Bohm M. 1996. Identification and characterization of G protein-regulated phospholipase C in human myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology* 28: 2419-27
- Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. 1991. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *The EMBO journal* 10: 2247-58
- Schreier B, Dohler M, Rabe S, Schneider B, Schwerdt G, et al. 2011. Consequences of epidermal growth factor receptor (ErbB1) loss for vascular smooth muscle cells from mice with targeted deletion of ErbB1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31: 1643-52
- Scott-Burden T, Resink TJ, Hahn AW, Vanhoutte PM. 1991. Induction of endothelin secretion by angiotensin II: effects on growth and synthetic activity of vascular smooth muscle cells. *Journal of cardiovascular pharmacology* 17 Suppl 7: S96-100
- Seals DR. 2003. Habitual exercise and the age-associated decline in large artery compliance. *Exercise and sport sciences reviews* 31: 68-72
- Shah BH, Soh JW, Catt KJ. 2003. Dependence of gonadotropin-releasing hormone-induced neuronal MAPK signaling on epidermal growth factor receptor transactivation. *The Journal of biological chemistry* 278: 2866-75
- Shah DI, Singh M. 2006. Possible role of exogenous cAMP to improve vascular endothelial dysfunction in hypertensive rats. *Fundamental & clinical pharmacology* 20: 595-604
- Shaw A, Xu Q. 2003. Biomechanical stress-induced signaling in smooth muscle cells: an update. *Current vascular pharmacology* 1: 41-58
- Shen J, Yang M, Ju D, Jiang H, Zheng JP, et al. 2010. Disruption of SM22 promotes inflammation after artery injury via nuclear factor kappaB activation. *Circulation research* 106: 1351-62
- Shi XZ, Pazdrak K, Saada N, Dai B, Palade P, Sarna SK. 2005. Negative transcriptional regulation of human colonic smooth muscle Cav1.2 channels by p50 and p65 subunits of nuclear factor-kappaB. *Gastroenterology* 129: 1518-32

- Shiota N, Miyazaki M, Okunishi H. 1992. Increase of angiotensin converting enzyme gene expression in the hypertensive aorta. *Hypertension* 20: 168-74
- Shirai H, Takahashi K, Katada T, Inagami T. 1995. Mapping of G protein coupling sites of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension* 25: 726-30
- Short D. 1966. The vascular fault in chronic hypertension with particular reference to the role of medial hypertrophy. *Lancet* 1: 1302-4
- Shyu YJ, Suarez CD, Hu CD. 2008. Visualization of AP-1 NF-kappaB ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 151-6
- Silva LC, Fontes MA, Campagnole-Santos MJ, Khosla MC, Campos RR, Jr., et al. 1993. Cardiovascular effects produced by micro-injection of angiotensin-(1-7) on vasopressor and vasodepressor sites of the ventrolateral medulla. *Brain research* 613: 321-5
- Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. 1991. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252: 802-8
- Singal T, Dhalla NS, Tappia PS. 2004. Phospholipase C may be involved in norepinephrine-induced cardiac hypertrophy. *Biochemical and biophysical research communications* 320: 1015-9
- Skalak TC, Price RJ. 1996. The role of mechanical stresses in microvascular remodeling. *Microcirculation* 3: 143-65
- Soltoff SP. 2001. Rottlerin is a mitochondrial uncoupler that decreases cellular ATP levels and indirectly blocks protein kinase Cdelta tyrosine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 276: 37986-92
- Son DJ, Lee HW, Shin HW, Lee JJ, Yoo HS, et al. 2008. Enhanced release of sphingosine-1-phosphate from hypercholesterolemic platelets: role in development of hypercholesterolemic atherosclerosis. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 78: 383-90
- Song H, Mowbray AL, Sykes MC, Jo H. 2007. Emerging role of IGF-1R in stretch-induced neointimal hyperplasia in venous grafts. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27: 1679-81
- Song Z, Li G. 2010. Role of specific microRNAs in regulation of vascular smooth muscle cell differentiation and the response to injury. *Journal of cardiovascular translational research* 3: 246-50
- Steinberg D. 1993. Antioxidant vitamins and coronary heart disease. *The New England journal of medicine* 328: 1487-9
- Steinberg SF. 2004. Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta. *The Biochemical journal* 384: 449-59
- Stelzner TJ, O'Brien RF, Yanagisawa M, Sakurai T, Sato K, et al. 1992. Increased lung endothelin-1 production in rats with idiopathic pulmonary hypertension. *The American journal of physiology* 262: L614-20
- Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. 1996. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 347: 781-6
- Stouffer GA, Owens GK. 1992. Angiotensin II-induced mitogenesis of spontaneously hypertensive rat-derived cultured smooth muscle cells is dependent on autocrine production of transforming growth factor-beta. *Circulation research* 70: 820-8

- Stouffer GA, Owens GK. 1994. TGF-beta promotes proliferation of cultured SMC via both PDGF-AA-dependent and PDGF-AA-independent mechanisms. *The Journal of clinical investigation* 93: 2048-55
- Stouffer GA, Patterson C, Madamanchi N, Runge MS. 2001. Role of reactive oxygen species in angiotensin ii signaling : the plot thickens. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 21: 471-2
- Strathmann M, Simon MI. 1990. G protein diversity: a distinct class of alpha subunits is present in vertebrates and invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 9113-7
- Suh PG, Park JI, Manzoli L, Cocco L, Peak JC, et al. 2008. Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB reports* 41: 415-34
- Suwanabol PA, Seedial SM, Shi X, Zhang F, Yamanouchi D, et al. 2012. Transforming growth factor-beta increases vascular smooth muscle cell proliferation through the Smad3 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinases pathways. *Journal of vascular surgery* 56: 446-54
- Suzuki H, Eguchi S. 2006. Growth factor receptor transactivation in mediating end organ damage by angiotensin II. *Hypertension* 47: 339-40
- Swales JD, Abramovici A, Beck F, Bing RF, Loudon M, Thurston H. 1983. Arterial wall renin. *Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension* 1: 17-22
- Swann K, Saunders CM, Rogers NT, Lai FA. 2006. PLCzeta(zeta): a sperm protein that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals. *Seminars in cell & developmental biology* 17: 264-73
- Sweeney M, McDaniel SS, Platoshyn O, Zhang S, Yu Y, et al. 2002. Role of capacitative Ca²⁺ entry in bronchial contraction and remodeling. *Journal of applied physiology* 92: 1594-602
- Swynghedauw B. 1999. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiological reviews* 79: 215-62
- Takahashi Y, Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Radovanovic M, et al. 2007. Involvement of transient receptor potential canonical 1 (TRPC1) in angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hypertrophy. *Atherosclerosis* 195: 287-96
- Takayanagi T, Kawai T, Forrester SJ, Obama T, Tsuji T, et al. 2015. Role of epidermal growth factor receptor and endoplasmic reticulum stress in vascular remodeling induced by angiotensin II. *Hypertension* 65: 1349-55
- Talior I, Tennenbaum T, Kuroki T, Eldar-Finkelman H. 2005. PKC-delta-dependent activation of oxidative stress in adipocytes of obese and insulin-resistant mice: role for NADPH oxidase. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 288: E405-11
- Tao W, Shi J, Dorn GW, 2nd, Wei L, Rubart M. 2012. Spatial variability in T-tubule and electrical remodeling of left ventricular epicardium in mouse hearts with transgenic Galphaq overexpression-induced pathological hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology* 53: 409-19
- Tappe-Theodor A, Constantin CE, Tegeder I, Lechner SG, Langeslag M, et al. 2012. Galpha(q/11) signaling tonically modulates nociceptor function and contributes to activity-dependent sensitization. *Pain* 153: 184-96

- Taylor SJ, Chae HZ, Rhee SG, Exton JH. 1991. Activation of the beta 1 isozyme of phospholipase C by alpha subunits of the Gq class of G proteins. *Nature* 350: 516-8
- Thompson LP, Bruner CA, Lamb FS, King CM, Webb RC. 1987. Calcium influx and vascular reactivity in systemic hypertension. *The American journal of cardiology* 59: 29A-34A
- Touyz RM. 2004. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 44: 248-52
- Touyz RM. 2005. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Experimental physiology* 90: 449-55
- Touyz RM, Berry C. 2002. Recent advances in angiotensin II signaling. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]* 35: 1001-15
- Touyz RM, Cruzado M, Tabet F, Yao G, Salomon S, Schiffrin EL. 2003a. Redox-dependent MAP kinase signaling by Ang II in vascular smooth muscle cells: role of receptor tyrosine kinase transactivation. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 81: 159-67
- Touyz RM, Deng LY, He G, Wu XH, Schiffrin EL. 1999. Angiotensin II stimulates DNA and protein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: role of extracellular signal-regulated kinases. *Journal of hypertension* 17: 907-16
- Touyz RM, He G, Wu XH, Park JB, Mabrouk ME, Schiffrin EL. 2001. Src is an important mediator of extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent growth signaling by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients. *Hypertension* 38: 56-64
- Touyz RM, Schiffrin EL. 2004. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochemistry and cell biology* 122: 339-52
- Touyz RM, Tabet F, Schiffrin EL. 2003b. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 30: 860-6
- Triggle CR, Samuel SM, Ravishankar S, Marei I, Arunachalam G, Ding H. 2012. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 90: 713-38
- Trippodo NC, Frohlich ED. 1981. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circulation research* 48: 309-19
- Tu H, Xu C, Zhang W, Liu Q, Rondard P, et al. 2010. GABAB receptor activation protects neurons from apoptosis via IGF-1 receptor transactivation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30: 749-59
- Ungerer M, Bohm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ. 1993. Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* 87: 454-63
- Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK. 1998a. p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *The Journal of biological chemistry* 273: 15022-9
- Ushio-Fukai M, Griendling KK, Akers M, Lyons PR, Alexander RW. 1998b. Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G protein subunits. *The Journal of biological chemistry* 273: 19772-7

- Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. 1996. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 271: 23317-21
- van Biesen T, Hawes BE, Luttrell DK, Krueger KM, Touhara K, et al. 1995. Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature* 376: 781-4
- Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. 2010. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11: 329-41
- Vaquero EC, Edderkaoui M, Pandol SJ, Gukovsky I, Gukovskaya AS. 2004. Reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 279: 34643-54
- Vasan RS, Levy D. 1996. The role of hypertension in the pathogenesis of heart failure. A clinical mechanistic overview. *Archives of internal medicine* 156: 1789-96
- Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, Kahn CR. 1996. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 12490-5
- Venkatachalam K, van Rossum DB, Patterson RL, Ma HT, Gill DL. 2002. The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nature cell biology* 4: E263-72
- Venkatachalam K, Zheng F, Gill DL. 2003. Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *The Journal of biological chemistry* 278: 29031-40
- Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, et al. 2002. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *The Journal of biological chemistry* 277: 14838-43
- Vignais PV. 2002. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 59: 1428-59
- Vlodavsky I, Fridman R, Sullivan R, Sasse J, Klagsbrun M. 1987. Aortic endothelial cells synthesize basic fibroblast growth factor which remains cell associated and platelet-derived growth factor-like protein which is secreted. *Journal of cellular physiology* 131: 402-8
- von Hayn K, Werthmann RC, Nikolaev VO, Hommers LG, Lohse MJ, Bunemann M. 2010. Gq-mediated Ca²⁺ signals inhibit adenylyl cyclases 5/6 in vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology. Cell physiology* 298: C324-32
- Wagner OF, Christ G, Wojta J, Vierhapper H, Parzer S, et al. 1992a. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 267: 16066-8
- Wagner OF, Vierhapper H, Gasic S, Nowotny P, Waldhausl W. 1992b. Regional effects and clearance of endothelin-1 across pulmonary and splanchnic circulation. *European journal of clinical investigation* 22: 277-82
- Waldo KL, Hutson MR, Ward CC, Zdanowicz M, Stadt HA, et al. 2005. Secondary heart field contributes myocardium and smooth muscle to the arterial pole of the developing heart. *Developmental biology* 281: 78-90
- Walter SV, Hamet P. 1986. Enhanced DNA synthesis in heart and kidney of newborn spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 8: 520-5

- Wamhoff BR, Bowles DK, Owens GK. 2006. Excitation-transcription coupling in arterial smooth muscle. *Circulation research* 98: 868-78
- Wang D, Passier R, Liu ZP, Shin CH, Wang Z, et al. 2002. Regulation of cardiac growth and development by SRF and its cofactors. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 67: 97-105
- Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Brasen JH, et al. 1999. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 99: 2027-33
- Weber DS, Rocic P, Mellis AM, Laude K, Lyle AN, et al. 2005. Angiotensin II-induced hypertrophy is potentiated in mice overexpressing p22phox in vascular smooth muscle. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 288: H37-42
- Weissberg PL, Cary NR, Shanahan CM. 1995. Gene expression and vascular smooth muscle cell phenotype. *Blood pressure. Supplement 2*: 68-73
- Welch WJ, Wilcox CS. 2001. AT1 receptor antagonist combats oxidative stress and restores nitric oxide signaling in the SHR. *Kidney international* 59: 1257-63
- Wettschureck N, Offermanns S. 2005. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological reviews* 85: 1159-204
- Wettschureck N, Rutten H, Zywietz A, Gehring D, Wilkie TM, et al. 2001. Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Galphaq/Galphi1 in cardiomyocytes. *Nature medicine* 7: 1236-40
- Wetzker R, Bohmer FD. 2003. Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4: 651-7
- Wilk-Blaszczak MA, Gutowski S, Sternweis PC, Belardetti F. 1994. Bradykinin modulates potassium and calcium currents in neuroblastoma hybrid cells via different pertussis toxin-insensitive pathways. *Neuron* 12: 109-16
- Wilkie TM, Scherle PA, Strathmann MP, Slepak VZ, Simon MI. 1991. Characterization of G-protein alpha subunits in the Gq class: expression in murine tissues and in stromal and hematopoietic cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 10049-53
- Wilkinson-Berka JL, Deliyanti D, Rana I, Miller AG, Agrotis A, et al. 2014. NADPH oxidase, NOX1, mediates vascular injury in ischemic retinopathy. *Antioxidants & redox signaling* 20: 2726-40
- Wong SL, Lau CW, Wong WT, Xu A, Au CL, et al. 2011. Pivotal role of protein kinase Cdelta in angiotensin II-induced endothelial cyclooxygenase-2 expression: a link to vascular inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31: 1169-76
- Wright JW, Harding JW. 1997. Important role for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system. *Brain research. Brain research reviews* 25: 96-124
- Wright JW, Krebs LT, Stobb JW, Harding JW. 1995. The angiotensin IV system: functional implications. *Frontiers in neuroendocrinology* 16: 23-52
- Wright JW, Morseth SL, Abhold RH, Harding JW. 1985. Pressor action and dipsogenicity induced by angiotensin II and III in rats. *The American journal of physiology* 249: R514-21
- Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber MJ, Sturgill TW. 1993. Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* 262: 1065-9

- Wu X, Cheng J, Li P, Yang M, Qiu S, et al. 2010. Mechano-sensitive transcriptional factor Egr-1 regulates insulin-like growth factor-1 receptor expression and contributes to neointima formation in vein grafts. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30: 471-6
- Xu SZ, Muraki K, Zeng F, Li J, Sukumar P, et al. 2006. A sphingosine-1-phosphate-activated calcium channel controlling vascular smooth muscle cell motility. *Circulation research* 98: 1381-9
- Yamada H, Akishita M, Ito M, Tamura K, Daviet L, et al. 1999. AT2 receptor and vascular smooth muscle cell differentiation in vascular development. *Hypertension* 33: 1414-9
- Yamakawa T, Tanaka S, Numaguchi K, Yamakawa Y, Motley ED, et al. 2000. Involvement of Rho-kinase in angiotensin II-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 35: 313-8
- Yamori Y, Igawa T, Kanbe T, Kihara M, Nara Y, Horie R. 1981. Mechanisms of structural vascular changes in genetic hypertension: analyses on cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Clinical science* 61 Suppl 7: 121s-23s
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, et al. 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-5
- Yang Z, Krasnici N, Luscher TF. 1999. Endothelin-1 potentiates human smooth muscle cell growth to PDGF: effects of ETA and ETB receptor blockade. *Circulation* 100: 5-8
- Yatani A, Frank K, Sako H, Kranias EG, Dorn GW, 2nd. 1999. Cardiac-specific overexpression of Galphaq alters excitation-contraction coupling in isolated cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 31: 1327-36
- Yoshida T, Hoofnagle MH, Owens GK. 2004. Myocardin and Prx1 contribute to angiotensin II-induced expression of smooth muscle alpha-actin. *Circulation research* 94: 1075-82
- Yoshida T, Inoue R, Morii T, Takahashi N, Yamamoto S, et al. 2006. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nature chemical biology* 2: 596-607
- Yoshida T, Sinha S, Dandre F, Wamhoff BR, Hoofnagle MH, et al. 2003. Myocardin is a key regulator of CARG-dependent transcription of multiple smooth muscle marker genes. *Circulation research* 92: 856-64
- Yoshiyama S, Chen Z, Okagaki T, Kohama K, Nasu-Kawaharada R, et al. 2014. Nicotine exposure alters human vascular smooth muscle cell phenotype from a contractile to a synthetic type. *Atherosclerosis* 237: 464-70
- Yu SM, Tsai SY, Guh JH, Ko FN, Teng CM, Ou JT. 1996. Mechanism of catecholamine-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 94: 547-54
- Zahradka P, Storie B, Wright B. 2009. IGF-1 receptor transactivation mediates Src-dependent cortactin phosphorylation in response to angiotensin II. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 87: 805-12
- Zampetaki A, Xu Q. 2009. Vascular remodeling in diabetes: don't leave without your STAT5. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29: 10-1
- Zhai P, Yamamoto M, Galeotti J, Liu J, Masurekar M, et al. 2005. Cardiac-specific overexpression of AT1 receptor mutant lacking G alpha q/G alpha i coupling causes hypertrophy and bradycardia in transgenic mice. *The Journal of clinical investigation* 115: 3045-56
- Zhang JC, Kim S, Helmke BP, Yu WW, Du KL, et al. 2001. Analysis of SM22alpha-deficient mice reveals unanticipated insights into smooth muscle cell differentiation and function. *Molecular and cellular biology* 21: 1336-44

- Zhang K, Meng X, Li D, Yang J, Kong J, et al. 2015. Angiotensin(1-7) attenuates the progression of streptozotocin-induced diabetic renal injury better than angiotensin receptor blockade. *Kidney international* 87: 359-69
- Zhao Q, Lee FS. 1999. Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor-kappaB through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase-beta. *The Journal of biological chemistry* 274: 8355-8
- Zhou Y, Sondek J, Harden TK. 2008. Activation of human phospholipase C-eta2 by Gbetagamma. *Biochemistry* 47: 4410-7
- Zhou Y, Wing MR, Sondek J, Harden TK. 2005. Molecular cloning and characterization of PLC-eta2. *The Biochemical journal* 391: 667-76
- Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, et al. 1996. trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry. *Cell* 85: 661-71
- Zieman SJ, Melenovsky V, Kass DA. 2005. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25: 932-43
- Zimmerman RS, Frohlich ED. 1990. Stress and hypertension. *Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension* 8: S103-7
- Zordoky BN, Robertson IM, Dyck JR. 2014. Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases. *Biochimica et biophysica acta*