

Université de Montréal

**Régulation de la Prolifération des Cellules Musculaires
Lisses Vasculaires par l'Activation *in vivo* du Récepteur
Natriurétique de Type C**

Par

Sofiane RAHALI

**Département de physiologie moléculaire et intégrative
Faculté de médecine**

**Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise ès Sciences (M.Sc.) en Physiologie Moléculaire, Cellulaire et Intégrative**

Août 2016

© Sofiane RAHALI, 2016 Université de Montréal

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :

**Régulation de la Prolifération des Cellules Musculaires Lisses Vasculaires par l'Activation
in vivo du Récepteur Natriurétique de Type C**

**Présenté par
Sofiane RAHALI**

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Réjean Couture (président-rapporteur)

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

Dr Denis deBlois (membre du jury)

Résumé

Le remodelage vasculaire dû à l'hyper-prolifération cellulaire des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) observé chez les rats spontanément hypertendus (RSH) est associé à l'hypertension artérielle. Nous avons précédemment démontré que le traitement *in vivo* des RSH par l'agoniste spécifique du récepteur du peptide natriurétique de type C (NPR-C), le C-ANP₄₋₂₃ atténue l'hyper-prolifération des CMLVs. Nous avons entrepris cette étude afin d'investiguer si l'effet antiprolifératif du C-ANP₄₋₂₃ agit par l'entremise de l'inhibition de la surexpression des protéines du cycle cellulaire, et afin d'en explorer les mécanismes sous-jacents. Pour cette étude, des RSH et des rats Wistar Kyoto (WKYs) âgés de deux semaines ont été injectés en intrapéritonéale par le C-ANP₄₋₂₃ de 2 jusqu'à 8 semaines d'âge, deux fois par semaine et sacrifiés à la 9^{ème} semaine. La pression artérielle a été mesurée par méthode Queue-coiffe, la prolifération des CMLVs a été déterminée par incorporation de thymidine et par test MTT, et l'expression des protéines a été quant à elle déterminée par technique d'immunobuvardage de type Western. Les CMLVs des RSH ont démontré une prolifération élevée en comparaison avec celles des WKYs, et le traitement par le C-ANP₄₋₂₃ a atténué l'hyperprolifération à un niveau de contrôle. De plus, la surexpression des cyclines D1/A/E, des kinases cyclines dépendantes 2 et 4 (cdk2, cdk4), de la forme phosphorylée de la protéine du rétinoblastome et des protéines G α i des CMLV des RSH a été atténuée à un niveau de contrôle. Par ailleurs, l'hyperphosphorylation d'ERK1/2, AKT, EGF-R, PDGF-R, IGF-R et de c-Src a significativement diminué par le traitement au C-ANP₄₋₂₃. En outre, le niveau élevé de l'anion superoxyde (O₂⁻), l'activité de la NADP(H) oxydase et de ses sous unités chez les RSH ont été atténués par le C-ANP₄₋₂₃. Ces résultats indiquent que l'activation *in vivo* de NPR-C atténue la surexpression des protéines du cycle cellulaire via l'inhibition de l'activité élevée du stress oxydatif, de c-Src et de l'activation de EGF-R, PDGF-

R, IGF-R, de la signalisation de MAPK et la surexpression des protéines G α i résultant ainsi en l'inhibition de l'hyperprolifération des CMLVs des RSH. Ainsi, il peut être suggéré que le C-ANP₄₋₂₃ pourrait être utilisé comme agent thérapeutique pour le traitement des complications vasculaires associées à l'hypertension et à l'athérosclérose.

Mots-clés: hypertension, RSH, NPR-C, cycle cellulaire, stress oxydatif, NO, récepteurs des facteurs de croissance, c-Src, AKT, MAPK, PI3-K, protéines G α i.

Abstract

Vascular remodeling due to hyper-proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) from spontaneously hypertensive rats (SHR) is associated with hypertension. We previously showed that in vivo treatment of SHR with natriuretic peptide receptor type C (NPR-C) specific agonist C-ANP₄₋₂₃ attenuates the hyper-proliferation of VSMC. We undertook the present study to investigate if the anti-proliferative effect of C-ANP₄₋₂₃ treatment is mediated through the inhibition of the over-expression of cell cycle proteins and explore the signaling molecules contributing to this effect. For this study, two-week-old SHR and age-matched Wistar Kyoto rats (WKY) rats were injected intraperitoneally with C-ANP₄₋₂₃ twice per week for 6 weeks and sacrificed at the end of the 9th week. Blood pressure measurements were done by tail cuff method, proliferation of VSMC was determined by thymidine incorporation and MTT assay, and Western blotting was used to measure the levels of proteins. VSMC from SHR exhibited enhanced proliferation as compared to WKY and C-ANP₄₋₂₃ treatment attenuated the hyper-proliferation to control levels. In addition the overexpression of cyclin D1, cyclin A, cyclin E, cyclin dependent kinase 2 and 4 (cdk2, cdk4), phosphorylated retinoblastoma protein (pRb) and G α proteins exhibited by VSMC from SHR was attenuated to control levels. Furthermore, the enhanced phosphorylation of ERK1/2, AKT, EGF-R, PDGF-R, IGF-R and c-Src was significantly decreased by C-ANP₄₋₂₃ treatment. Moreover, the enhanced levels of superoxide anion (O₂⁻), NADPH oxydase activity, and the enhanced expression of NOX4 and P47phox in SHRs were attenuated by C-ANP₄₋₂₃. These results indicate that in vivo NPR-C activation attenuates the over-expression of cell cycle proteins through the inhibition of the enhanced oxidative stress, c-Src and EGF-R, PDGF-R, IGF-R activation, MAPK signaling and over-expression of G α proteins resulting in the inhibition of the hyper-proliferation of VSMC from SHR. Thus, it can be suggested that C-ANP₄₋₂₃ may be used as a therapeutic agent for the treatment of vascular complications associated with hypertension and atherosclerosis.

Key words: Hypertension, SHR, cell cycle proteins, oxidative stress, NO, growth factor receptors, c-Src, AKT, MAPK, PI3-K, G α proteins.

Table des matières

Résumé	III
Abstract	V
Table des matières.....	VI
Liste des figures	X
Liste des sigles et des abréviations	XII
Dédicace	XV
Remerciements.....	XVI
Chapitre I : Introduction et revue de la littérature	1
1 .Le système cardiovasculaire	2
1.1 Le système cardiaque	2
1.2 Le système vasculaire	2
1.2.1 Les vaisseaux sanguins	3
1.2.1.1 Artères et artérioles.....	4
1.2.1.2 Les capillaires.....	4
1.2.1.3. Veines et veinules.....	4
1.3 La pression artérielle	5
1.3.1 Mécanismes de contrôle de la pression artérielle	6
1.3.1.1 Régulation à court terme.....	7
1.3.1.1.1 Mécanismes nerveux.....	7

1.3.1.2 Régulation à moyen et long terme.....	8
2. L'hypertension artérielle.....	9
2.1 Physiopathologie de l'hypertension artérielle.....	11
2.2 L'hyperprolifération des cellules musculaires lisses vasculaires et le remodelage vasculaire.....	12
2.3 Les rats spontanément hypertendus : un modèle d'hypertension.....	14
3. Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypertension et le remodelage vasculaire	15
3.1 Les peptides vasoactifs	15
3.1.1 Les récepteurs à l'angiotensine et leurs voies de signalisation	15
3.1.2 Les voies de signalisation des récepteurs à Endothéline 1	18
3.1.3 Rôle des peptides dans la prolifération cellulaire	19
3.2 Les récepteurs couplés aux protéines G.....	19
3.2.1 Les protéines G	20
3.2.2 Classification des protéines G	22
3.2.3 Rôle des protéines G dans l'hypertension artérielle	23
3.3 La voie de signalisation des récepteurs des facteurs de croissance.....	24
3.3.1 Les récepteurs des facteurs de croissance	24
3.3.1.1 Description générale	24
3.3.2 La voie des MAPK.....	27

3.3.3 La voie de la Phosphoinositide 3-Kinase –AKT	28
3.3.4 La voie de c-Src	29
3.3.5 Les récepteurs des facteurs de croissance et la prolifération cellulaire	30
3.3.6 La transactivation des récepteurs des facteurs de croissance	31
3.4. Le stress oxydatif	32
3.4.1 Les espèces réactives oxygénées	32
3.4.2. Les sources d'EROs.....	33
3.4.2.1 Les sources enzymatiques des EROs	34
3.4.2.1.1 La NADP(H) oxydase	34
3.4.2.1.2 Structure de la NADP(H) oxydase	35
3.4.3 L'implication du stress oxydatif dans les voies de signalisation.....	36
3.4.3.1 Les peptides vasoactifs et le stress oxydatif	36
3.4.3.2 Les EROs et les récepteurs des facteurs de croissance.....	37
3.4.3.2.1 Les EROs et la voie des MAPK	38
3.4.4 L'implication du stress oxydatif dans la prolifération cellulaire	39
4. Les peptides natriurétiques	40
4.1 Les récepteurs des peptides natriurétiques.....	42
5. Les récepteurs natriurétiques de type C et leur distribution	43
5.1 Signalisation du récepteur natriurétique de type C	45

5.2 Le récepteur natriurétique de type C et la prolifération cellulaire	47
6. Le cycle cellulaire	49
6.1 Les protéines du cycle cellulaire	50
6.2 La phase G1	51
6.3 La phase de transition G1-S	52
6.4 La phase G2 et M	52
6.5 Les voies de signalisation impliquées dans le cycle cellulaire	53
6.6 Rôle du cycle cellulaire dans l'hypertension artérielle	56
7. Hypothèse et Objectifs	58
Chapitre II- Article scientifique	61
Chapitre III -Discussion, conclusion et perspectives	103
8. Discussion.....	104
9. Conclusion	109
10. Perspectives	111
11. Bibliographie.....	114

LISTES DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1 : Structure d'une artère.	5
Figure 2 : Les mécanismes physiopathologiques de l'hypertension.....	14
Figure 3 : Voies de signalisation de l'Ang II.....	17
Figure 4 : Activation du RCPG	22
Figure 5 : Voies de signalisation des EROs	39
Figure 6 : Les récepteurs natriurétiques	43
Figure 7 : Les voies de signalisation couplées au NPR-C	47
Figure 8 : Régulation du cycle cellulaire par les complexes cyclines/cdk et leurs inhibiteurs	53
Figure 9 : Schéma illustratif des objectifs	59

Chapitre 2

Figure 1: Effect of in vivo C-Atrial Natriuretic peptide (ANP) ₄₋₂₃ treatment on DNA synthesis in Vascular Smooth Muscle Cells (VSMC) from SHR and WKY	92
Figure 2: Effect of in vivo C-Atrial Natriuretic peptide (ANP) ₄₋₂₃ treatment on the expression of cell cycle proteins in Vascular Smooth Muscle Cells (VSMC) from SHR and WKY	93
Figure 3: Effect in vivo C-ANP ₄₋₂₃ treatment on the levels of pRb, p21 and p27 proteins	94
Figure 4: Effect of in vivo C-ANP ₄₋₂₃ treatment on NADPH oxidase activity and O ₂ -production.....	95
Figure 5: In vivo C-Atrial Natriuretic peptide (ANP) ₄₋₂₃ treatment on the enhanced levels of NADPH oxidase subunits p47 ^{phox} and Nox4 in Vascular Smooth Muscle Cells (VSMC) from 9 week-old SHR and WKY	96
Figure 6: Effect of in vivo C-Atrial Natriuretic peptide (ANP) ₄₋₂₃ treatment on c-Src activation in Vascular Smooth Muscle Cells (VSMC) from SHR.....	97
Figure 7: Effect of in vivo C-Atrial Natriuretic peptide (ANP) ₄₋₂₃ treatment on the hyperphosphorylation of epidermal growth factor receptor (EGF-R), Platelet derived growth	

factor receptor (PDGF-R) and Insulin growth factor receptor (IGF-R) in Vascular Smooth Muscle Cells (VSMC) from SHR..... 98

Figure 8: Effect of in vivo C-Atrial Natriuretic peptide (ANP) ₄₋₂₃ treatment on the enhanced phosphorylation of Extracellular signal-regulated kinase ERK1/2 and AKT in Vascular Smooth Muscle Cells (VSMC) from Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) 99

Figure 9: effect of in vivo Natriuretic Peptide type C activation on the augmented levels of G α 2 and G α 3 in Vascular Smooth Muscle Cells (VSMC) from SHR 100

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Aa	Acide aminé
AC	Adénylate cyclase
ADH	Hormone anti-diurétique
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADP	Adénosine biphosphate
AKT/PKB	Protéine kinase B
AMPc3', 5'	Adénosine monophosphate cyclique
Ang II	Angiotensine II
ANP	Peptide natriurétique auriculaire
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AT1	Récepteur à l'angiotensine de type 1
ATP	Adénosine triphosphate
AVP	Arginine-vasopressine
BNP	Peptide natriurétique cérébral
Ca ²⁺	Calcium
CDK	Kinase dépendante des cyclines
CKI	Inhibiteur des cdk
CMLV	Cellule du muscle lisse vasculaire
CNP	Peptide natriurétique de type C
DAG	Diacylglycérol
DOCA	Modèle de rats hypertendus après traitement au sel et à la déoxycorticostérone
EGF	Facteur de croissance épidermique
EGF-R	Récepteur au facteur de croissance épidermique
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase
ERO	Espèce réactive oxygénée
ET-1	Endothéline-1
ET _A	Récepteur de l'endothéline de type A
ET _B	Récepteur de l'endothéline de type B

GDP	Guanosine biphosphate
G α i	Protéine G inhibitrice
GPCR	Récepteurs couplés aux protéines G
G α s	Protéine G stimulatrice
GTP	Guanosine triphosphate
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HB-EGF	Facteur de croissance analogue à l'EGF liant l'héparine
HO ⁻	Anion hydroxyde
IGF	Facteur de croissance apparenté à l'insuline
IGF-R	Récepteur du facteur de croissance apparenté à l'insuline
IP3	Inositol triphosphate
JAK	Kinase de la famille janus
JNK	Kinase N-terminale c-jun
kDa	Kilo Dalton
MAPK	Protéines kinases activées par les mitogènes
NAD(P)H	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NO	Monoxyde d'azote
NPR-A	Récepteur natriurétique de type A
NPR-B	Récepteur natriurétique de type B
NPR-	Récepteur natriurétique de type C
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
ONOO-	Peroxynitrite
PDGF-R	Récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes
PIP2	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
pRB	Forme phosphorylée de la protéine Rb
Rb	Protéine du rétinoblastome
RCPG	Récepteur couplé à la protéine G

RTK	Récepteur tyrosine kinase
SOS	Protéine Son of sevenless
WKY	Rat Wistar Kyoto

À mes très chers parents sans qui je ne serai rien, mon éternelle petite sœur Imene, mon adorable
petit frère Mohammed et à la personne sans qui rien n'aurait été possible, Mon amour de
toujours, mon épouse Souâd.

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers la Dre Madhu Anand-Srivastava et la remercie d'avoir cru en moi et de m'avoir guidé durant ce projet. Je lui serai à jamais reconnaissant de m'avoir accueilli dans son laboratoire que je considère à présent comme une seconde famille.

Un très grand merci à notre assistante de recherche, Dre Yuan Li pour ses précieux conseils et d'avoir partagé avec moi sa riche expérience.

Je veux remercier mes collègues de laboratoire et amis : Ashish, Sarah, Mehdi et Hossain avec qui j'ai passé des moments formidables.

Je tiens également à remercier tous les membres du Département de physiologie, les professeurs, les assistants de recherche, les étudiants et les secrétaires pour leur gentillesse, leur grande disponibilité, et leur sourire indéfectible.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION ET REVUE DE LITTÉRATURE

1. Le système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire confère aux différents tissus de l'organisme un apport continu de nutriments, d'oxygène mais également une évacuation des déchets afin de maintenir un environnement adéquat à leur bon fonctionnement. Il est arrangé en un réseau de distribution incluant une pompe (le cœur) et un système de "canalisations" (les vaisseaux sanguins) et qui a pour but le maintien d'un flux de sang ininterrompu à toutes les parties du corps. Ce système doit être capable de s'adapter dépendamment des besoins des tissus. Pour que faire se peut, il doit maintenir un gradient de pression de base et par la suite avoir la possibilité de réguler ce dernier (Boron 2012).

1.1 Le système cardiaque

Véritable pompe, le cœur est un organe creux à la formidable capacité contractile. Il est en fait composé de 4 chambres : 2 oreillettes et 2 ventricules, les oreillettes se contractant un sixième de seconde avant les ventricules leurs permettant ainsi de se remplir avant d'expulser le sang dans la circulation périphérique. Pesant environs 300 g mais pouvant atteindre 800g dans certaines conditions pathologiques, le cœur est capable de pomper 5000 ml/min de sang chez un adulte au repos et près de 35000 ml/min lors d'un exercice intense. Cette capacité de changement de débit confère au cœur un rôle primordial dans le contrôle du gradient de pression transmis au système vasculaire (Boron 2012).

1.2 Le système vasculaire

Ce système peut être abordé du point de vue anatomique en circulation systémique et circulation pulmonaire. Il permet le transport du flux sanguin à toutes les parties du corps. Il est également très malléable, et il se doit de l'être, car les besoins de notre organisme ne sont pas

immuables, lorsque l'on considère les demandes en oxygène lors de l'exercice, ou encore les variations de la température corporelle (Hall 2006).

1.2.1 Les vaisseaux sanguins

Excepté les capillaires qui possèdent seulement une lame basale sur laquelle repose une couche de cellules endothéliales, tous les vaisseaux sanguins sont constitués de trois tuniques: l'intima, la media et l'adventice (figure 1). La media joue un rôle important dans la vasorelaxation ainsi que la vasoconstriction car composée essentiellement de cellules musculaires lisses. Bayliss a remarqué que lors d'une augmentation de la pression intraluminale, il y avait une contraction de l'artère et une relaxation lorsque cette pression diminuait (Bayliss 1902). C'est cette propriété contractile des cellules musculaires lisses vasculaires qui détermine le tonus myogénique et qui permet une régulation rapide de la pression. Ayant constaté que lors de manœuvres prudentes afin de conserver l'intima intact durant la préparation tissulaire, l'acétylcholine provoquait une vasodilatation au lieu d'une vasoconstriction, Robert Furchgott suggéra le rôle de l'endothélium dans la relaxation des cellules musculaires lisses (Furchgott and Zawadzki 1980). L'endothélium qui caractérise l'intima est en contact direct avec le flux sanguin et possède des propriétés sécrétoires entre autres, l'endotheline 1, la thromboxane A2, le peptide natriurétique de type C (CNP) ou encore, le monoxyde d'azote (NO) qui vont agir sur le diamètre vasculaire. Quant à l'adventice, elle est constituée d'un réseau de collagènes et de fibres élastiques. Dans de plus gros vaisseaux, l'adventice contient les vasa vasorum, qui servent de support nutritif aux structures éloignées du flux sanguin, et les nervi vasorum qui permettent l'innervation des vaisseaux.

1.2.1.1 Artères et artérioles

Le calibre de l'artère détermine sa composition en fibre élastique, fibre de collagène, endothélium et en CMLV. L'aorte qui est une artère de gros calibre est composée d'environ 40% d'élastine (Hosoda, Kawano et al. 1984, Brown and Zuo 1994) ce qui lui permet d'amortir le débit sanguin élevé arrivant du cœur. Cela lui permet également de maintenir vers la périphérie, un flot sanguin continu en emmagasinant le sang durant la systole, et en le redistribuant pendant la diastole. Les artères de petit calibre sont principalement composées de cellules musculaires lisses, et de ce fait jouent un rôle essentiel dans la régulation de la pression artérielle et par là même le flot sanguin, afin qu'il soit distribué selon les besoins des tissus (Hall 2006, Boron 2012).

1.2.1.2. Les capillaires

Ils sont le site principal pour les échanges de gaz, de nutriments et l'évacuation des déchets. Le schéma classique artériole-réseau de capillaire-veinule peut varier d'un organe à un autre selon les besoins particuliers de chaque tissu. À noter que leurs fonctions ne se résument pas seulement aux mentions sus-citées, mais également dans d'autres fonctions clés de l'organisme comme par exemple la signalisation cellulaire ou encore la néovascularisation. Leurs fonctions peuvent différer, dans le rein par exemple, les capillaires ont une fonction de filtration glomérulaire (Hall 2006, Boron 2012).

1.2.1.3. Veines et veinules

Chez un individu pesant dans les 155 livres, la distribution du volume total de sang serait de 85% dans la circulation systémique et 15 % dans le cœur et la circulation pulmonaire. 65% du sang de la circulation systémique est principalement contenue dans les veines et les veinules.

Elles agissent ainsi comme étant un réservoir capable de redistribuer le sang selon les besoins de la circulation (Hall 2006, Boron 2012).

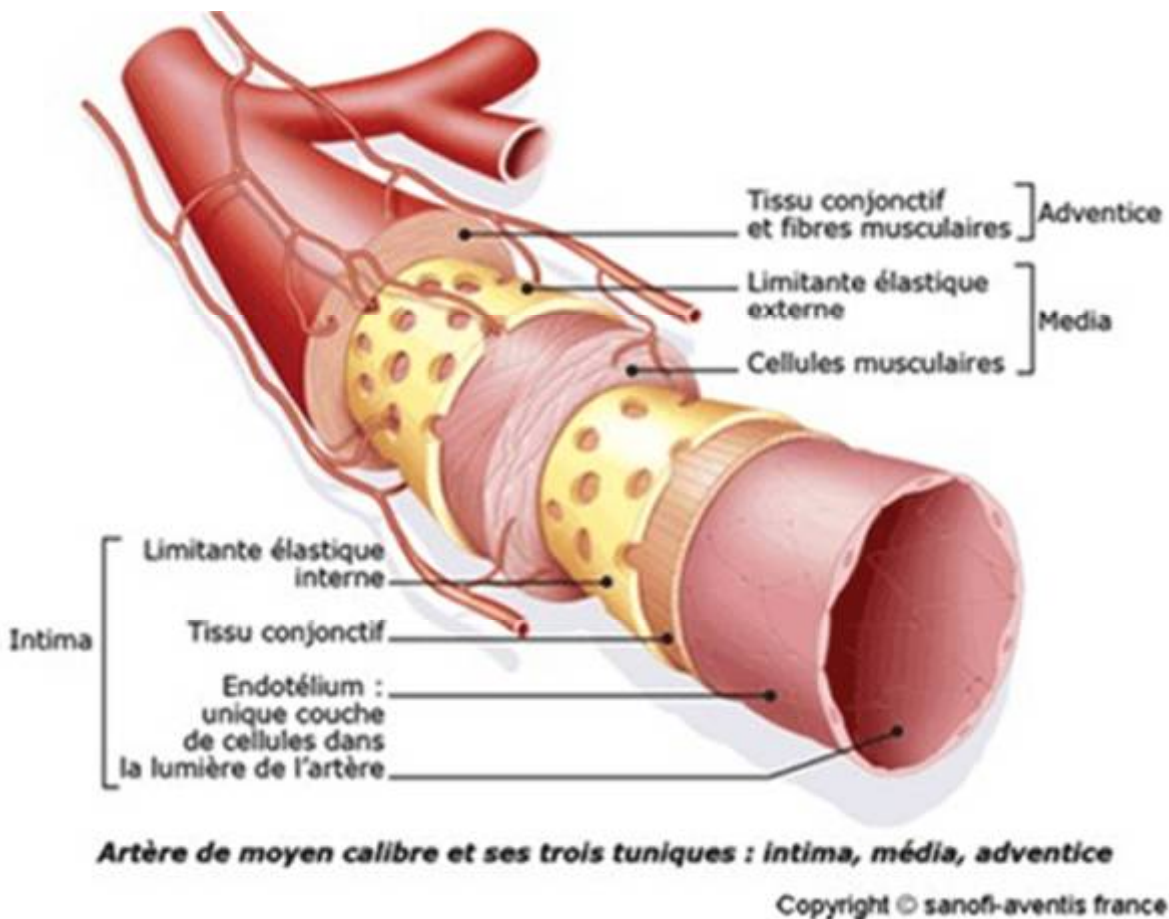


Figure 1: Structure d'une artère.

Référence : (Sanofi Aventis)

1.3 La pression artérielle

La pression artérielle est une force dont se sert notre corps afin de propulser le sang dans les différents tissus. Elle est régie par le débit sanguin, ainsi que la somme des résistances se trouvant dans tous les vaisseaux qui est la résistance périphérique totale. L'une des bases

fondamentales pour la compréhension du système hémodynamique, et du débit du flux sanguin continu qui régissent cette pression est la loi d'Ohms pour les liquides :

$$F = \frac{\Delta P}{R}$$

Où F représente le flux sanguin, ΔP la différence entre 2 points de pression, l'un en amont (P_1) et l'autre en aval (P_2), et R la résistance entre ces deux points. En réalité, le système vasculaire n'est pas un réseau de tubes rigides, d'autres facteurs entrent dans sa composition, entre autres, la consistance du liquide qui y coule, le changement du diamètre des tubes qui le composent et leur longueur. La loi de Poiseuille prend justement en considération ces facteurs et se présente comme suit :

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

De cette équation, nous pouvons constater que plus la longueur d'un vaisseau (l) et la viscosité sanguine (n) sont élevées moins le débit sanguin sera important (car la résistance R sera augmentée) et inversement pour le rayon (r) (Badeer 2001).

1.3.1 Mécanismes de contrôle de la pression artérielle

Notre organisme est en perpétuel changement et de par là même le sont nos besoins. Nos exigences selon que nous soyons endormis, lors du sport, ou soyons en train de rédiger un mémoire, ne sont pas les mêmes. De ce fait, il existe des systèmes régulateurs permettant le

contrôle de ces variations : le système de régulation à court terme et le système de régulation à moyen et long terme (Boron 2012).

1.3.1.1 Régulation à court terme

1.3.1.1.1 Mécanismes nerveux

Ce contrôle s'effectue presque entièrement via le système nerveux autonome. Il fait appel au centre vasomoteur, aux barorécepteurs, aux chémorécepteurs et aux muscles lisses vasculaires. Le centre vasomoteur est situé dans la formation réticulée du bulbe rachidien. Ce centre contrôle le cœur par des influx parasympathiques via le nerf vague et tous les vaisseaux sanguins par des influx sympathiques via la moelle épinière et les nerfs périphériques. Il peut être divisé en trois aires importantes: 1) l'aire vasoconstrictrice, comme son nom l'indique a pour principale fonction d'exciter les fibres vasoconstrictrices préganglionnaires du système sympathique, 2) l'aire vasodilatatrice, dont les fibres inhibent l'aire vasoconstrictrice et enfin 3) l'aire sensitive qui reçoit principalement des signaux du nerf glossopharyngien et du nerf vague contrôle l'aire vasoconstrictrice et vasodilatatrice. L'aire sensitive est également responsable du réflexe des barorécepteurs (Boron 2012).

Lors du passage de la position couchée à la position debout, il s'en suit une fluctuation rapide et importante de la distribution du sang dans notre corps. Cette brusque variation va activer le centre vasomoteur bulbaire et inhiber le centre vagal, ce qui va provoquer une vasoconstriction et une augmentation de la contraction du cœur. Ces mécanismes sont orchestrés par les barorécepteurs, qui se situent au niveau du sinus carotidien et de la crosse aortique. Ce sont des mécanorécepteurs sensibles aux variations d'étirements des parois vasculaires, ce qui explique la présence de canaux cationiques non sélectifs de type TRP1 (Boron 2012). Ces récepteurs induisent un feedback négatif lors de l'augmentation de pression artérielle moyenne

avec vasodilatation et bradycardie, et un feedback positif lors de la baisse de la pression artérielle moyenne avec une vasoconstriction et tachycardie. Les chémorécepteurs sont également situés dans la crosse aortique et le sinus carotidien, ils sont sensibles aux variations de la pression partielle d'oxygène et de dioxyde de carbone ainsi que celle du pH. Dans le cas d'une baisse de la pression partielle en oxygène (P_{O_2}), d'une diminution du pH ou d'une augmentation de la P_{CO_2} , la stimulation des chémorécepteurs va entraîner une vasoconstriction et une bradycardie (Boron 2012).

1.3.1.2 Régulation à moyen et long terme

En 1972, Guyton et Coleman ont érigé les fondements du modèle informatique du contrôle de la circulation sanguine qui a permis l'exploration de la régulation de la pression artérielle et du débit cardiaque. Ce modèle fut primordial pour l'étude du lien entre la pression artérielle, l'équilibre sodique et a démontré l'importance cruciale du maintien de la balance hydro-sodée rénale dans l'ajustement de la pression artérielle à long terme (Guyton, Coleman et al. 1972).

En plus du rôle du rein dans la régulation de la pression artérielle par le contrôle du liquide extra cellulaire, on lui reconnaît des propriétés endocrines telles que: la conversion de la 25-hydroxyvitamine D en 1,25-dihydroxyvitamine D qui est le métabolite actif de la vitamine D, formation de prostaglandines et de kinines, et l'érythropoïétine qui est un facteur de croissance impliqué dans la formation des érythrocytes (Hall 2006).

Le rein contrôle également la pression artérielle via la libération d'une enzyme qui est la rénine. Cette dernière entre en jeu dans le système rénine-angiotensine-aldostérone, et est stockée dans les cellules granulaires de l'appareil juxta-glomérulaire. Lors de la baisse de la pression artérielle, de la diminution de la concentration de NaCl, ou encore de baisse de la perfusion rénale, la rénine libérée dans la circulation va cliver l'angiotensinogène, ce qui produira de

l'angiotensine I. L'Ang I sera ensuite transformée en Ang II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine. L'Ang II va palier à la baisse de la pression artérielle en induisant une vasoconstriction des vaisseaux rénaux et systémiques, en augmentant la réabsorption rénale du Na^+ , en diminuant le taux de filtration glomérulaire et en agissant sur la relâche de l'hormone anti-diurétique (ADH) aussi connue sous le nom de arginine vasopressine au niveau de la pituitaire (Hall 2006, Boron 2012).

Les neurones magnocellulaires situés au niveau des noyaux supraoptiques et paraventriculaires, sécrètent et transportent la vasopressine jusqu'à la posthypophyse pour y être sécrétée. Ces neurones sont également sensibles aux variations de fluides et d'électrolytes et vont libérer de la vasopressine, tout en augmentant les afférences sympathiques rénales afin de corriger la balance (Bourque 2008, Toney and Stocker 2010). Les peptides natriurétiques, l'endothéline, les catécholamines (adrénaline et noradrénaline), l'histamine, la sérotonine et le monoxyde d'azote (NO) entrent également en jeu lors de la régulation de la pression artérielle (Hall 2006, Boron 2012).

2. L'hypertension artérielle

L'augmentation chronique de la valeur de la pression artérielle systolique \geq à 140 mm Hg et de la pression diastolique \geq à 90 mm Hg définit l'hypertension artérielle. Environ 20% de la population canadienne adulte souffre d'hypertension artérielle (McAlister, Wilkins et al. 2011, Robitaille, Dai et al. 2012) et affecte 40% de la population adulte mondiale (Chow, Teo et al. 2013) et compte pour environ 13 % des décès.(WHO 2002, WHO 2009)

Si non traitée, l'hypertension artérielle peut mener entre autres à des risques de maladies coronariennes (Amery, Birkenhager et al. 1985), des accidents vasculaires cérébraux (NIH)(1991), des insuffisances cardiaques (Kearney, Whelton et al. 2005) et rénales (Bakris,

Ritz et al. 2009) et à des rétinopathies (Walsh 1982). Les risques de souffrir de l'hypertension artérielle augmentent avec l'âge. Comme l'a démontré la Framingham Heart study, la probabilité que des individus d'âge moyen ou plus développent à un moment ou à un autre de leur vie de l'hypertension artérielle est de 90%, ce qui représente un problème de santé publique non négligeable.

Il existe deux types d'hypertension artérielle, l'hypertension essentielle et l'hypertension secondaire. L'hypertension secondaire a des causes identifiables, pour n'en citer que quelques-unes : l'apnée du sommeil, les pathologies rénales, l'hyperaldostéronisme primaire, les atteintes thyroïdiennes, le phéochromocytome et la coarctation de l'aorte. L'hypertension essentielle quant à elle constitue la vaste majorité des hypertensions environ 95%. Bien qu'il existe des mesures préventives qui tendent à diminuer les risques du développement de l'hypertension, comme la diminution de l'apport en sel, une activité physique régulière, une consommation modérée d'alcool, l'arrêt du tabac ou encore une meilleure gestion du stress, ces mesures sont fastidieuses et ne sont pas toujours définitives, de plus un traitement pharmacologique doit être instauré lorsque les valeurs de la pression artérielle sont à un stade dangereux.

Les médicaments antihypertenseurs sont adaptés selon les différents facteurs impliqués dans la régulation de la pression artérielle. On compte parmi les différentes classes médicamenteuses : 1) les diurétiques : incluant les diurétiques thiazidiques et les diurétiques de l'anse ; 2) les bêta bloquants dit cardio-sélectifs qui antagonisent préférentiellement les récepteurs beta 1 adrénergiques ; 3) les inhibiteurs calciques qui peuvent être divisés en dihydropyridines et non- dihydropyridines, et qui agissent en diminuant la résistance vasculaire périphérique ; 4) les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine qui sont donnés en premier choix lorsqu'il existe des pathologies associées, comme le diabète ou encore l'insuffisance cardiaque

et 5) les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II qui jouent un rôle particulier dans la réduction du risque d'accidents vasculaires cérébraux et ainsi que dans la réduction de l'hypertrophie du ventricule gauche (Brunner and Gavras 2002).

2.1 Physiopathologie de l'hypertension artérielle

On compte parmi les principaux mécanismes physiopathologiques de l'hypertension artérielle :

- 1) Une hyperactivité du système nerveux sympathique, qui en engendrant une augmentation de la résistance périphérique vasculaire, du débit cardiaque et une rétention liquidienne contribue au développement et au maintien de l'hypertension artérielle (Grassi, Bertoli et al. 2012).
- 2) Une hyperréactivité vasculaire chez les patients souffrants d'hypertension artérielle, et qui se traduit par une résistance vasculaire, ainsi qu'une augmentation de la pression artérielle exagérée, lors d'une injection par de la norépinephrine (Ziegler, Mills et al. 1991).
- 3) Le système rénine-angiotensine-aldostérone par la sécrétion d'Ang II, provoque la contraction des vaisseaux, augmente la stimulation sympathique, induit la sécrétion d'aldostérone et d'hormones antidiurétiques ainsi que la réabsorption sodique. De plus l'Ang II peut également créer une hyperprolifération des cellules cardiaques et vasculaires via la stimulation de différents facteurs de croissance et de kinases (McConnaughey, McConnaughey et al. 1999).
- 4) Le syndrome métabolique est une association d'insulino-résistance, de dyslipidémie et d'hypertension artérielle. Ces facteurs de risques sont concomitants et augmentent la probabilité de maladies cardiovasculaires (Yanai, Tomono et al. 2008).
- 5) L'augmentation de la rigidité artérielle avec l'âge qui traduit un manque d'élasticité dû, entre autres, à des dépôts de collagènes et à une altération des fibres d'élastines au niveau de la media (Oparil, Zaman et al. 2003).

6) Le remodelage vasculaire, par l'atteinte des structures, des fonctions et des propriétés mécaniques des artérioles, est au centre même de l'augmentation des résistances vasculaires périphériques qui caractérisent l'hypertension artérielle (Schiffrin 2012).

7) L'hérédité est également impliquée dans le développement de l'hypertension artérielle de par le fait que plusieurs mutations génétiques causent un trouble de la régulation de la pression artérielle (Lifton, Gharavi et al. 2001, Wilson, Disse-Nicodeme et al. 2001). Le syndrome de Liddle qui en est un exemple, rare mais cliniquement primordial, induit une rétention sodique importante et qui est dû à une mutation des canaux sodiques (Shimkets, Warnock et al. 1994).

Les mécanismes physiopathologiques complexes qui régentent l'élévation de la pression artérielle comme le démontre la figure 2, font en sorte qu'une approche basée sur une thérapie antihypertensive sélective, est rarement fructueuse chez les patients hypertendus.

2.2 L'hyperprolifération des cellules musculaires lisses et le remodelage vasculaire

Le remodelage vasculaire est un phénomène complexe qui implique un changement structurel au niveau de nombreux processus cellulaires tels que: la croissance, la migration, la prolifération et l'apoptose. Ce dernier, qui est un mécanisme de mort cellulaire régulé par des gènes promoteurs/inhibiteurs (Elmore 2007), est un aspect non négligeable dans le mécanisme du remodelage vasculaire et l'hypertension. En effet, ce phénomène est accru dans les différents tissus des modèles d'hypertension (Intengan and Schiffrin 2000). De nombreuses études lient le remodelage vasculaire à l'apoptose des CMLVs et peut être observée à partir de la huitième semaine chez certains modèles (Rizzoni, Rodella et al. 2000). Ce phénomène est d'autant plus intéressant car il implique des stimuli tels que les peptides vasoactifs ainsi que le stress oxydatif (Yamada, Horiuchi et al. 1996, Cattaruzza, Dimigen et al. 2000, Irani 2000). De plus, les effets thérapeutiques de nombreux anti-hypertenseurs comme les inhibiteurs calciques et les inhibiteurs

de l'enzyme de conversion ont été liés à une action apoptotique (Goldenberg, Grossman et al. 2001, Bishopric 2002, Harr and Distelhorst 2010). Bien que ce phénomène soit probablement impliqué dans le remodelage vasculaire, il ne sera pas abordé en détails dans cette étude.

Les changements liés au remodelage vasculaire, sont le résultat d'une interaction entre des substances vasoactives, des facteurs de croissances, des stimuli hémodynamiques et qui peuvent par la suite contribuer à la physiopathologie des maladies vasculaires (Intengan and Schiffrin 2001). Une augmentation de la résistance vasculaire principalement au niveau des petites artères et des artérioles, car elles sont plus sensibles aux stimuli vasoconstricteurs, est au cœur de la théorie du remodelage vasculaire et de l'apparition de l'hypertension artérielle (Berne 2001). Les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) sont prépondérantes au niveau de ces vaisseaux pré-capillaires, et sont capitales dans le développement de la résistance périphérique. En effet, les CMLVs subissent une hyperplasie, qui est l'augmentation de la division cellulaire et qui est associée à un accroissement de la synthèse d'ADN, et une hypertrophie, qui est associée à l'augmentation du volume cellulaire, et qui auront pour conséquence de conduire à un diamètre luminal plus étroit (Mulvany, Baandrup et al. 1985, Korsgaard, Aalkjaer et al. 1993). Le rôle des CMLVs dans l'hypertension artérielle n'est plus à démontrer (Intengan and Schiffrin 2001) et plusieurs études ont rapporté que les changements phénotypiques des CMLVs étaient à la base même du remodelage vasculaire (Contard, Sabri et al. 1993, Li, Simon et al. 2000, Umemoto, Kawahara et al. 2006, Shinzato, Ohya et al. 2007). S'ajoute à cela le fait que de nombreuses études ont démontré une augmentation de la prolifération des CMLVs dans des modèles d'hypertension artérielle (Jing, Zhang et al. 2006, Iyer, Chan et al. 2010, Liu, Hitomi et al. 2010). Cependant les mécanismes de signalisation cellulaire menant à ces changements demeurent incertains.

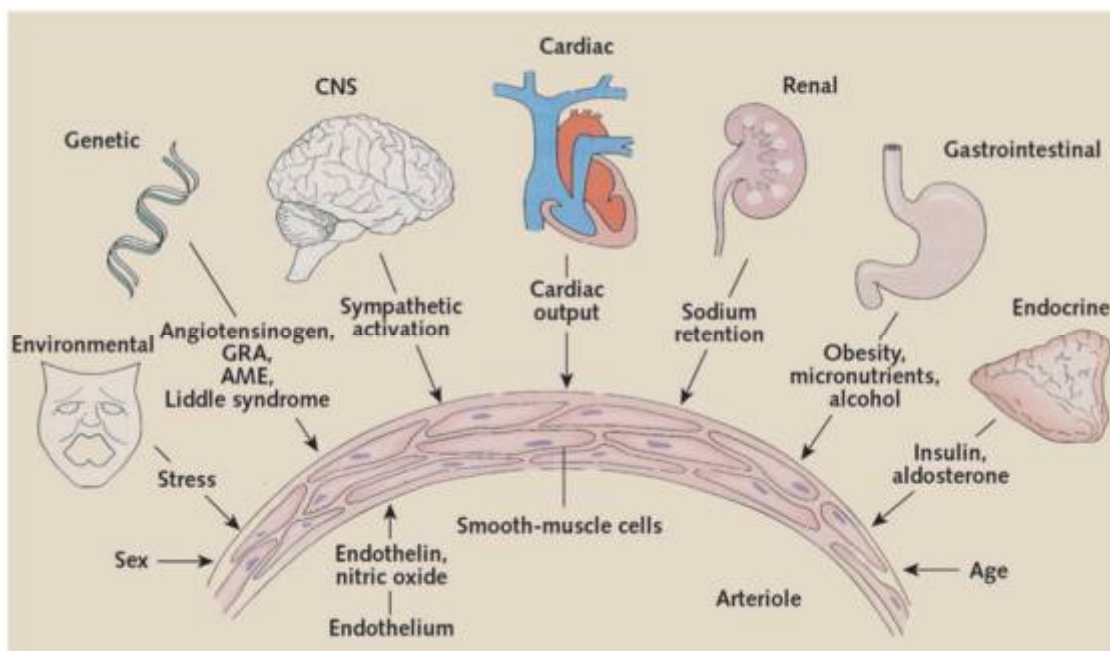


Figure 2 : Les mécanismes physiopathologiques de l'hypertension
Source : (Oparil, Zaman et al. 2003)

2.3 Les rats spontanément hypertendus : un modèle d'hypertension

Le modèle de rats spontanément hypertendus (RSH) est un modèle analogue à l'hypertension essentielle chez l'humain. Ce modèle génétique a été créé à la suite de croisement de rats Wistar kyoto (WKY) ayant des valeurs élevées de pression artérielle (Okamoto and Aoki 1963). Notons l'intérêt d'utiliser les modèles de rats WKY comme groupe contrôle. Les modifications artérielles que subissent les humains entre autres, le remodelage vasculaire, l'augmentation du ratio media/lumière ont également été observées chez les RSH (Intengan and Schiffrin 2000, Hughes and Bund 2004). Ces similitudes rendent très intéressante l'étude des mécanismes menant au remodelage vasculaire sous toutes ses perspectives, autant du point de vue de l'hyperprolifération que celui de l'hypertrophie des CMLVs.

3. Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypertension et le remodelage vasculaire

L'homéostasie est le contrôle et le maintien d'un équilibre de nos paramètres vitaux, et la régulation de la pression artérielle en est le parfait exemple. Ce système permet une adaptabilité relativement flexible. Cela étant dit, si les stimuli tendent plus d'un côté de la balance que de l'autre, le déséquilibre aura éventuellement lieu. En effet, les molécules pro-hypertensives favorisent la vasoconstriction, ainsi que l'hypertrophie et la prolifération des CMLVs, via différents mécanismes. Elles agissent soit directement à l'intérieur de la cellule, soit sur des récepteurs situés à la surface cellulaire. Ces récepteurs vont par la suite traduire le message en activant différentes voies de signalisation cellulaire (Berne 2001, Voet 2008).

3.1 Les peptides vasoactifs

Ce sont des peptides qui peuvent réguler la pression artérielle en agissant sur le tonus vasculaire des artères et des veines. Parmi les principaux vasoactifs, l'on compte l'angiotensine et l'endothéline. Ces molécules ne sont pas libérées dans leur forme active mais plutôt en tant que précurseur. Afin de pouvoir agir sur leurs cibles, une enzyme procède au clivage des peptides vasoactifs, les rendant ainsi capables de produire leurs effets avant d'être dégradés. Plusieurs études ont démontré un niveau élevé de ces vasoactifs dans des modèles d'hypertension (Morishita, Higaki et al. 1992, Iglarz and Schiffrin 2003, Kirchengast, Witte et al. 2005, Jesmin, Zaedi et al. 2006) et la majorité des récepteurs de ces vasoactifs sont couplés à des protéines G (Callera, Tostes et al. 2007).

3.1.1 Les récepteurs à l'angiotensine et leurs voies de signalisation

Le système rénine-angiotensine-aldostérone (RAA) contrôle la production systémique d'Ang II qui est considérée comme le principal effecteur de ce système. L' α 2-globuline angiotensinogène, qui est clivée par la rénine dans la circulation sanguine va produire le

précurseur inactif Ang I. Ce dernier sera transformé en Ang II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) qui est un ectoenzyme transmembranaire très présent au niveau de la vascularisation pulmonaire (Caldwell, Seegal et al. 1976). Il existe également une sécrétion endogène de l'angiotensine II par les vaisseaux (Toda, Ayajiki et al. 2007). En effet, toutes les composantes du système RAA, à l'exception de la rénine, sont présents au niveau des vaisseaux, et la conversion de Ang I en Ang II peut être catalysée par des enzymes autres que l'ECA comme la cathepsine G, la chymase mastocytaire ou encore l'enzyme génératrice d'Ang II sensible à la chymostatine (CAGE). D'autres molécules sont également capables de cliver l'Ang I depuis l'angiotensinogène comme l'activateur tissulaire du plasminogène et les tonines. Jusqu'à présent, deux récepteurs à l'Ang II ont pu être identifiés : AT1 et AT2. Les récepteurs AT1 et AT2 sont les mieux connus et les plus étudiés. Le récepteur AT1 a été cloné initialement dans les CMLVs des RSH (Murphy, Alexander et al. 1991, Sasaki, Yamano et al. 1991) tandis que le récepteur AT2 a été cloné dans des tissus fœtaux de rats ainsi que dans une lignée cellulaire de phéochromocytome chez le rat (Kambayashi, Bardhan et al. 1993, Mukoyama, Nakajima et al. 1993). Le récepteur AT1 est principalement exprimé au niveau des CMLVs mais également au niveau cardiaque, pulmonaire, rénal et cérébral. L'expression de ce récepteur est régulée par de nombreux facteurs qui jouent un rôle dans la fonction cardiovasculaire, comme les facteurs de croissance, les interleukines, l'hypoxie, l'hyperglycémie et bien d'autres. L'hypercholestérolémie induit également une surexpression du récepteur AT1 (Strehlow, Wassmann et al. 2000), contribuant d'avantage dans l'hypertension artérielle.

Le récepteur AT1 est couplé aux protéines G et peut interagir avec G α i et G α q. Son activation par l'Ang II lorsqu'il est couplé à G α i inhibe l'activité de l'adénylate cyclase (Anand-Srivastava 1983) et peut réguler certains canaux calciques voltages-dépendants de type L et T

(Lu et al., 1996; Maturana et al., 1999). Quand le récepteur AT1 est lié à Gq, il se produit une activation de la phospholipase C menant à la production de DAG et IP3 et à la relâche de calcium intracellulaire. Ces derniers activent la protéine kinase C (Sayeski, Ali et al. 1998, Mehta and Griendling 2007). De plus, l'activation du récepteur AT1 induit une phosphorylation des tyrosines kinases responsables de la prolifération et de la croissance cellulaire. La liaison de l'Ang II à son récepteur AT1 induit une suite de signalisation comme le montre la figure 3, aboutissant à une prolifération excessive (Kaschina and Unger 2003), et au développement de l'hypertension artérielle.

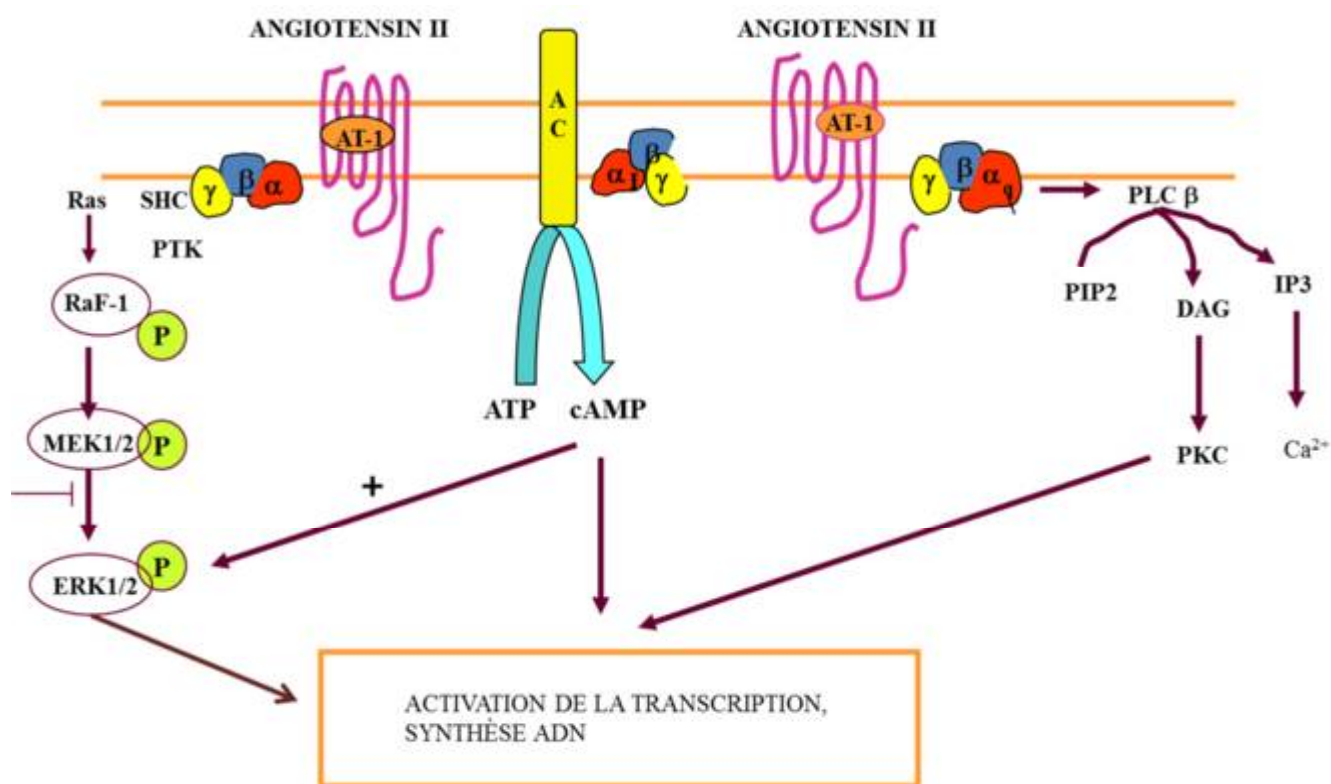


Figure 3: Voies de signalisation de l'Ang II

3.1.2 Les voies de signalisation des récepteurs à l'endothéline 1

L'endothéline (ET) est une hormone vasoactive polypeptidique composée de 21 acides aminés, produite par les cellules endothéliales vasculaires. Puissant vasoconstricteur, l'endothéline agit via deux types de récepteurs couplés aux protéines G : ET_A et ET_B (Pollock 2005). Le récepteur ET_A est couplé aux protéines G_q, G₁₂ / G₁₃ et G_{αi} et agit sur les voies de la PLC, de la RhoA et inhibe l'adénylate cyclase, respectivement. Il est exprimé en grande partie au niveau des CMLVs. Le récepteur ET_B quant à lui, est exprimé au niveau des CMLVs, où il est couplé à G_q et G_{αi}, et au niveau des cellules endothéliales. Cependant, son activation au niveau des cellules endothéliales entraîne une production de monoxyde d'azote et une vasorelaxation (Hynynen and Khalil 2006). L'endothélium vasculaire et les CMLVs produisent à la fois le précurseur de l'ET-1, la pré-pro-endothéline qui est clivée en pro-endothéline, mais aussi l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) qui convertit la pro-endothéline en endothéline (Hahn, Resink et al. 1990, Shimada, Takahashi et al. 1994, D'Orleans-Juste, Plante et al. 2003). Plusieurs pathologies cardiovasculaires incluant l'athérosclérose, l'hypercholestérolémie, ainsi que l'hypertension artérielle sont associées à un excès de production de l'ET-1 (Stow, Jacobs et al. 2011).

Des niveaux élevés d'endothéline-1 plasmatique sont retrouvés dans des modèles d'hypertension artérielle (Schiffrin 1995, Schiffrin 2001). Ces derniers, ont démontré une augmentation dans la résistance des artères périphériques, ainsi que des modifications de l'architecture vasculaire. Les antagonistes du récepteur de l'ET_A ont induit une diminution de la pression artérielle systolique, et s'avèrent être une possible approche thérapeutique dans l'hypertension artérielle (Epstein 2008).

3.1.3 Rôle des peptides dans la prolifération cellulaire

De nombreuses études attribuent aux vaso-peptides tels que l'Ang II et l'ET-1, en plus de leurs actions vasomotrices, de effets prolifératifs sur les CMLVs impliquant ainsi leur rôle dans le remodelage vasculaire (Li, Tong et al. 2010, Thorin and Clozel 2010, Kitada, Ohkita et al. 2012, Bhaskaran, Zaluski et al. 2014, Yang, Liu et al. 2014). En effet, des niveaux augmentés d'Ang II et d'ET-1 ont été rapportés dans différents modèles d'hypertension (Morishita, Higaki et al. 1992, Jesmin, Zaedi et al. 2006). Le traitement des cellules de types A10 par l'Ang II a démontré une augmentation de leurs proliférations. De plus, l'utilisation de l'antagoniste du récepteur AT-1, le losartan, a induit une diminution de la prolifération des CMLVs des RSH (Bravo, Somoza et al. 2001, Li, Levesque et al. 2010). Les effets prolifératifs de l'endothéline-1 sur les CMLVs ont été rapportés (Yogi, Callera et al. 2007, Ljuca and Drevensek 2010) et ont impliqués l'activation des voies MAPK et la PI3K (Hashim, Li et al. 2006). L'ET-1 induit également une activation du PKB et augmente l'expression du régulateur de transcription (Erg-1) qui joue un rôle important dans la prolifération des CMLVs (Battistini, Chailler et al. 1993, Bouallegue, Daou et al. 2007). Cette implication par ailleurs, a été démontrée par Lu et ses collègues lors de l'utilisation d'anticorps anti ET-1 ainsi que de BQ123 et BQ788 qui sont des antagonistes des récepteurs ET-A et ET-B, respectivement, lesquels ont atténué la prolifération élevée des CMLVs des RSH (Lu, Chao et al. 2006).

3.2 Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

Avec près de 800 gènes codants, la famille des récepteurs à 7 passages transmembranaires est la plus grande et la plus ubiquitaire des familles de protéines membranaires (DeVree, Mahoney et al. 2016). Ces récepteurs sont aussi connus sous le nom de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) car la plus part d'entre eux activent des protéines G afin de transmettre leurs

signaux. Plusieurs signaux peuvent activer les RCPG tels que des acides aminés, des glycoprotéines, la lumière, des peptides et des phospholipides. Les RCPG sont constitués d'une succession d'acides aminés, formant au niveau extracellulaire une partie N-terminale glycosilée et contenant des ponts disulfures servant à stabiliser le récepteur et le domaine de liaison du ligand, et des boucles intracellulaires qui jouent un rôle dans l'interaction avec les protéines G et qui aboutissent à une partie C-terminale. Leur but est de traduire l'information fournie par le milieu extracellulaire, en modifiant leur configuration spatiale qui se transmet jusqu'aux boucles intracellulaires, et à la partie C-terminale. Ce changement aboutit à la production de seconds messagers intracellulaire via les protéines G. La partie C-terminale et les boucles intracellulaires sont également le site de phosphorylation par des seconds messagers protéines kinases dépendants ainsi que par des kinases régulatrices des protéines G au niveau de résidus sérines et thréonines. Ces phosphorylations mènent à la désensibilisation qui est un mécanisme de feedback important qui permet de prévenir une sur-stimulation du récepteur (Ferguson 2001, Pierce, Premont et al. 2002, Krauss 2008).

3.2.1 Les protéines G

Les *guanine nucleotide binding proteins* ou protéines G, sont essentielles à la transduction des voies de signalisation et jouent un rôle primordial dans la spécificité et la durée de la réponse cellulaire. Les protéines G existent sous trois classes différentes : hétérotrimériques, monomériques et facteurs d'élongation. Les protéines G hétérotrimériques sont couplées aux RCPG et sont composées de trois sous-unités $\alpha \beta \gamma$. Les différentes structures cristallisées de la sous-unité $G\alpha$ démontrent des structures tridimensionnelles similaires composées d'un domaine GTP ase et d'un domaine hélicoïdal. Le domaine GTP ase est similaire chez tous les membres de la famille des protéines G incluant les protéines G monomériques et facteurs d'élongation

(Sprang 1997, Oldham and Hamm 2006). Ce domaine est composé de six feuillets β entourés par cinq hélices α . Il permet d'hydrolyser la GTP et offre un site de liaison pour le dimer $G\beta\gamma$, pour les protéines effectrices ainsi que les RCPG. Le domaine GTP ase contient également trois boucles flexibles dénommées switch I, II, III qui ont permis de mettre en évidence des changements conformationnels significatifs entre les sous-unités $G\alpha$ liés au GDP et ceux liés au GTP (Noel, Hamm et al. 1993, Coleman, Berghuis et al. 1994, Lambright, Noel et al. 1994, Mixon, Lee et al. 1995).

Quant au domaine hélicoïdal, il est composé de six hélices alpha formant un véritable socle au-dessus du site de liaison nucléotidique. Il a pour principales fonctions d'augmenter l'affinité de $G\alpha$ pour les guanines nucléotides ainsi que l'activité GTP hydrolytique de la protéine (Warner, Weng et al. 1998, Remmers, Engel et al. 1999). Les sous-unités β et γ de la protéine G forment une unité fonctionnelle qui n'est dissociable que par dénaturation (Schmidt, Thomas et al. 1992). Malgré que l'interaction de la plus part des sous-unités β peut s'effectuer avec les sous-unités γ , les différentes combinaisons des 60 dimères ne sont pas toutes possibles (Clapham and Neer 1997), et les multiples dimères $G\beta\gamma$ peuvent interagir avec le même isoforme de $G\alpha$ (Graf, Mattera et al. 1992), ce qui porte à croire que la localisation subcellulaire ou encore l'expression différentielle pourrait déterminer la spécificité de la signalisation.

Comme démontré dans la figure 4, lors de la stimulation du RCPG par un ligand, la protéine G subit un changement conformationnel qui va substituer son GDP par un GTP au niveau de $G\alpha$, ce qui va provoquer une dissociation de la protéine G en deux sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$. Ces deux composantes vont par la suite interagir avec des effecteurs afin de contribuer à la production et l'activation des seconds messagers. La sous-unité $G\alpha$ possède une activité GTP ase intrinsèque lui permettant d'hydrolyser la GTP en GDP et en phosphate inorganique ce qui met

fin à son état actif et la réassocie à $G\beta\gamma$ ainsi qu'au RCPG dans l'attente d'une nouvelle stimulation (Neer 1995).

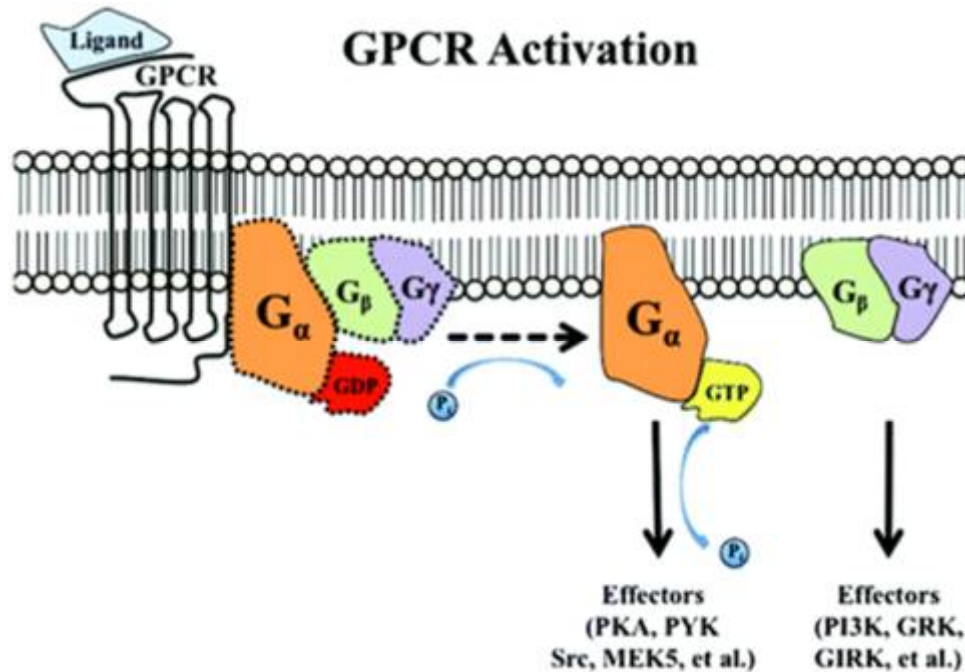


Figure 4 : Activation du RCPG
Source : (Belmonte and Blaxall 2011)

3.2.2 Classification des protéines G

Les protéines G hétérotrimériques sont généralement divisées en quatre grandes catégories dépendamment de leur sous-unité $G\alpha$ qui leur confèrent leur spécificité: $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$ et $G_{\alpha 12}$ (Simon, Strathmann et al. 1991).

La protéine $G_{\alpha s}$ est, comme son nom l'indique, stimulatrice et selon le clonage moléculaire, peut être divisée en quatre formes : $G_{\alpha s-1}$, $G_{\alpha s-2}$, $G_{\alpha s-3}$, $G_{\alpha s-4}$ (Zou, Shi et al. 1996). Lorsque $G_{\alpha s}$ est activée, elle stimule positivement l'adénylate cyclase (AC) qui à son tour provoque une augmentation du taux d'AMPC qui interagira avec différentes protéines en aval pour produire de multiples effets. La toxine du choléra (CT) induit une stimulation soutenue de

l'activité de la G α s en provoquant une ADP-ribosylation (Offermanns 2003). La protéine G α i est composée de trois sous familles G α i-1, G α i-2, G α i-3. À l'inverse de G α s, la G α i inhibe l'activité de l'AC, réduisant ainsi le niveau d'AMPc intracellulaire et tous les effets qui s'en suivent. La protéine G α i interagit également avec d'autres voies de signalisation comme la phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), mitogen-activated protein kinase (MAPK) ou encore la phospholipase A2 (PLA2). Cette protéine est sensible à l'ADP-ribosylation par la toxine pertussique (PTX) qui va inactiver G α i (Hsia, Moss et al. 1984).

La protéine G α q entraîne une stimulation de la phospholipase C (PLC) qui va par la suite transformer le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) en inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG). Le IP3 via son récepteur situé sur la membrane du réticulum endoplasmique (IP(3)R) mobilise les réserves de Ca²⁺ (Mikoshiya 2007), et le DAG active une protéine kinase calcium-dépendante (PKC) (Hendriks-Balk, Peters et al. 2008). Bien que les protéines G12 ont démontré un rôle dans l'inhibition de la survie cellulaire (Berestetskaya, Faure et al. 1998, Radhika and Dhanasekaran 2001), leurs mécanismes demeurent à être éclairci (Wu, Tam et al. 2006).

3.2.3 Rôle des protéines G dans l'hypertension artérielle

Plusieurs études ont démontré une relation entre l'hypertension artérielle et un niveau de protéine G altéré au niveau des cellules cardiaques (Thibault and Anand-Srivastava 1992, Brinks and Eckhart 2010). En effet, les tissus aortiques et cardiaques de RSH ainsi que d'autres modèles de rats hypertendus ont démontré une expression élevée des protéines G α i2 et G α i3 en comparaison à des rats normotendus (Anand-Srivastava, Picard et al. 1991, Bohm, Gierschik et al. 1992, Ge, Garcia et al. 1999, Ge, Garcia et al. 2006), par contre les niveaux de protéines G α s n'étaient pas affectés chez les RSH et chez les rats 1K1C (Anand-Srivastava, Picard et al. 1991,

Anand-Srivastava 1992). Il est intéressant de noter que des études ont démontré que la surexpression des protéines *Gai2* et *Gai3* précède l'apparition de l'hypertension (Marcil, Thibault et al. 1997). Les résultats de Triggle et Tabrizchi ont démontré que le traitement de RSH adultes par la toxine pertussique résultait en une diminution de la pression artérielle (Triggle and Tabrizchi 1993). De plus, Li et Anand-Srivastava ont prouvé qu'une simple injection de toxine pertussique prévenait contre l'apparition de l'hypertension chez des rats pré-hypertendus âgés de 2 semaines, et que cette diminution de pression était associée également à une baisse de surexpression de protéines *Gai2* et *Gai3* (Li and Anand-Srivastava 2002). Li et Anand-Srivastava ont également démontré que l'hyperprolifération des CMLVs observée chez les RSH en comparaison avec les WKY, était liée à une surexpression de protéines *Gai2* et *Gai3*, car le traitement par la toxine pertussique a diminué le niveau d'expression de protéines *Gai* et a réduit la surprolifération des CMLVs chez les RSH (Bou Daou, Li et al. 2016). Ce lien entre prolifération cellulaire et protéines *Gai* a également été démontré entre autres par Moxham et al. ainsi que par McKillop et al. (Moxham, Hod et al. 1993, McKillop, Schmidt et al. 1999, Minetti, Feige et al. 2014).

3.3 La voie de signalisation des récepteurs des facteurs de croissance

3.3.1 Les récepteurs des facteurs de croissance

3.3.1.1 Description générale

Les récepteurs des facteurs de croissance font partie de la famille des récepteurs tyrosines kinases (RTK). Ce sont des protéines à un seul passage transmembranaire, avec au niveau de la partie extracellulaire un domaine N-terminal pour la liaison du ligand, à la partie membranaire une seule hélice alpha, et au niveau intracellulaire un domaine C-terminal ayant une activité tyrosine (Alberts 2002, Karp 2013). Les récepteurs des facteurs de croissance sont capables

d'engendrer la prolifération, la différenciation cellulaire et la croissance. Lors de la liaison du ligand à son récepteur, ce dernier va subir une homo- ou une hétérodimérisation qui va d'une part stimuler son activité catalytique intrinsèque, et de l'autre part phosphoryler des tyrosines qui servent de site de reconnaissance et de recrutement pour des protéines adaptatrices (Kazlauskas and Cooper 1989, Roepstorff, Grovdal et al. 2008). Ces protéines adaptatrices contiennent des domaines de reconnaissance des tyrosines phosphorylées tels que le domaine SH2 (SrcHomology 2) ou le Grb2 (de l'anglais Growth factor receptor-bound protein 2) et sont nécessaires à la transduction du signal. Parmi ces protéines adaptatrices on peut trouver : PLC γ 1, PI3K, GRB2 ou encore le Shc (Kelly, Haldeman et al. 1991, Ferguson, Berger et al. 2003). Une fois le récepteur activé, une cascade de signalisation va s'en suivre, qui aboutira au contrôle des facteurs de transcription responsables, entre autres, de la prolifération de la cellule (Alberts 2002).

Les récepteurs des facteurs de croissance épidermique (EGF-R de l'anglais epidermal growth factor receptor) sont des glycoprotéines de 170 kDA et peuvent être divisés en quatre membres: ErbB1, ErbB2, ErbB3 et ErbB4 (Roepstorff, Grovdal et al. 2008). L'EGF-R peut être activé par tous les membres de la grande famille de EGF : l'EGF, le facteur de croissance transformant α (TGF- α) et le facteur de croissance analogue à l'EGF liant l'héparine (HB-EGF) (Lee, Fenton et al. 1995). La protéine adaptatrice Grb2 est recrutée lors de l'activation du récepteur EGF-R. La Grb2 via son domaine SH2 se connecte sur les séquences phosphotyrosines. La Grb2, dans son état inactif, est souvent associée et liée à une autre protéine appelée SOS. La protéine SOS agit en tant que transducteur du signal du récepteur EGF-R à la voie des MAPK, via la protéine Ras (Dhillon, Hagan et al. 2007, Tidyman and Rauen 2009). Parmi les cellules qui expriment ce récepteur l'on trouve les fibroblastes, les cellules

endothéliales et les CMLVs (Cohen 1960). L'activation de l'EGF-R résulte entre autres, à l'activation de la MAPK, la voie de PLC, de PI3K et de c-Src, aboutissant ainsi à la réplication cellulaire (Prenzel, Fischer et al. 2001).

Les facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF) exercent leurs effets sur deux récepteurs tyrosines kinases de ~ 170 et 180 kDa, le PDGF-R- α et PDGF-R- β respectivement. Les PDGF dont les isoformes PDGF-AA, PDGF-BB, PDGFAB, PDGF-CC et PDGF-DD sont dimériques et composés de chaînes polypeptidiques, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C et PDGF-D, ils peuvent donc lier deux récepteurs simultanément. Le PDGF-R- α a une grande affinité pour les chaînes A et B du PDGF, tandis que PDGF-R- β a une grande affinité pour les chaînes B seulement. La partie extracellulaire des PDGF-R contient cinq domaines similaires à l'hémoglobine et au niveau de la partie intracellulaire un domaine tyrosine kinase avec une séquence caractéristique sans homologie aux autres kinases (Heldin and Westermark 1999, Bergsten, Uutela et al. 2001, Gilbertson, Duff et al. 2001, Fredriksson, Li et al. 2004).

Les CMLVs expriment en grande partie les PDGF-R- β (Raines 1990, Heldin and Westermark 1999). Les PDGF-R peuvent activer plusieurs voies de signalisation telles que PI3K, MAPK, c-Src (Millette, Rauch et al. 2005, Chen, Zhou et al. 2007).

Le récepteur IGF-1R, de l'anglais insulin-like growth factor-1 est un tétramère qui contient deux chaînes α extracellulaires et deux chaînes β intracellulaires qui partagent des fonctions et des structures homologues avec les récepteurs à l'insuline (Hernandez-Sanchez, Werner et al. 1997). Le domaine tyrosine kinase, situé au niveau des chaînes β , est autophosphorylé lors de la liaison de l'IGF (de l'anglais insulin growth factor). Lors de la transduction du signal, les substrats des récepteurs à insuline tels que IRS-1 ou IRS-2 et le Shc, qui sont des protéines adaptatrices, sont phosphorylés et peuvent activer les voies de signalisation des MAPK ou

encore de PI3K (Oldham and Hafen 2003, Machado-Neto, Favaro et al. 2011, Hemmings and Restuccia 2012).

3.3.2 La voie des MAPK

Les kinases des protéines activées par les mitogènes (mitogen-activated protein kinases MAPK) sont une famille de protéines serines/thréonines activées par des facteurs mitogènes. Les MAPK sont constituées de trois voies de signalisation : la voie de ERK de l'anglais extracellular-regulated kinase (avec ses isoformes p42 et p44), la voie de p38 et la voie de c-Jun N-terminal kinase (Cargnello and Roux 2011). La voie de signalisation de MAPK est impliquée dans plusieurs phénomènes tels que la croissance, la prolifération, la migration, la différenciation et l'apoptose (Mii, Khalil et al. 1996, Force and Bonventre 1998). Par ailleurs, une forte corrélation entre la pathogénèse ou la progression de plusieurs pathologies cardiovasculaires et une activation inadéquate de cette voie a été évoquée dans de nombreuses publications (Muslin 2008, Gehart, Kumpf et al. 2010, Ocaranza and Jalil 2010, Plotnikov, Zehorai et al. 2011). Les MAPK peuvent être activées par de nombreux stimuli comme par exemple les facteurs de croissance, les peptides vasoactifs tels que l'Ang II, les cytokines et différents stress cellulaires (Seger and Krebs 1995, Kyriakis and Avruch 1996, Srivastava 2002, Blanc, Pandey et al. 2003). L'activation de la MAPK aura pour effet de phosphoryler une petite protéine G, contenant une chaîne de 150 acides aminés et une masse de 21 kDa, la protéine Ras (Takai, Sasaki et al. 2001). Cette phosphorylation est effectuée grâce à un facteur d'échange de guanine, le SOS (Son of sevenless), qui stimule l'échange de Ras-GDP avec Ras-GTP (Li, Batzer et al. 1993). La Ras GTP liée à la membrane va à son tour activer la protéine Raf qui est une MAPKKK. La Raf va phosphoryler une MAPKK qui elle phosphoryle une MAPK comme le ERK1/2 (Haystead, Dent et al. 1992, Moodie, Willumsen et al. 1993, McCormick 1994, Toney and Stocker 2010) .

L'activation de la cascade de signalisation Ras-Raf-MEK-ERK aboutit à la phosphorylation et à la translocation de ERK1/2 au niveau du noyau, afin de majorer l'activité transcriptionnelle des protéines de croissance menant ainsi à l'augmentation de la prolifération cellulaire (Duff, Marrero et al. 1995, Brunet, Roux et al. 1999, Mebratu and Tesfaigzi 2009).

3.3.3 La voie de la Phosphoinositide 3-Kinase –AKT

Les phosphatidylinositol 3 kinases (PI3K) sont des lipides kinases qui contribuent à la croissance, la prolifération, la différenciation, la mobilité cellulaire, l'angiogenèse et à la transformation oncogénique.

Les PI3K sont divisées en trois classes : I, II et III. Les PI3Ks de classe I sont des protéines hétérotrimériques comptant une sous-unité régulatrice (p85 α ou β , p55 γ ou p101) et une sous-unité catalytique (p110 α , β , δ ou γ) (Leevers, Vanhaesebroeck et al. 1999, Cantrell 2001, Oudit, Sun et al. 2004). Cette classe est ubiquitaire et prédominante au niveau du système vasculaire et peut être activée par les récepteurs tyrosines kinases et par les RCPG. Un modèle d'activation type de la PI3K a été conçu pour la première fois sur des fibroblastes. Dans ce modèle, la sous-unité adaptatrice p85 recrute la sous-unité catalytique p110, qui à son tour interagit avec un récepteur tyrosine kinase activé au niveau de la membrane plasmatique. Cette interaction du complexe s'effectue grâce à la haute affinité entre le domaine d'homologie SH2 du p85 et une séquence de tyrosine phosphorylée au niveau du récepteur (Kazlauskas 1994, Pawson 1995). Une fois le domaine catalytique p110 recruté, il va phosphoryler la phosphatidylinositol (PtdIns)(4,5)P₂ en PtdIns (3,4,5)P₃.

Le phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate (PIP₃) est un important second messenger qui conduit à l'activation de plusieurs protéines kinases dont la protéine AKT aussi connue sous le nom de protéine kinase B (PKB) ou encore la protéine ribosomale S6 kinase de 70 kDa

(p70S6K) (Rameh and Cantley 1999, Oudit, Sun et al. 2004). L'AKT joue un rôle important dans l'inhibition de la mort cellulaire et la stimulation de la prolifération des CMLVs en contrôlant également l'expression de Bcl-2 et de c-Myc et en inhibant les caspases (Coffer, Jin et al. 1998).

3.3.4 La voie de c-Src

C-Src tyrosine kinase est un membre important de la famille des tyrosines kinases cytoplasmiques non-réceptrices. Elle est composée de deux domaines de liaisons, le SH2 et SH3, d'une séquence de myristoylation au niveau N-terminal, d'un domaine kinase et d'un domaine non catalytique à la partie C-terminale (Bolen, Rowley et al. 1992). Dans un modèle humain, lors de son état inactif la Tyr530 au niveau C-terminal de c-Src est phosphorylée et liée au domaine SH2. Cette interaction ainsi que l'interaction avec le domaine SH3 diminuent l'accès des substrats au domaine kinase. L'activation complète de c-Src requière la suppression de la phosphotyrosine de la partie C-terminale, l'ouverture de la structure c-Src et la phosphorylation de la Tyr419 (Yeatman 2004).

La c-Src joue un rôle important dans plusieurs fonctions cellulaires incluant la prolifération, la différenciation, la migration et la survie cellulaire par sa contribution à plusieurs voies de signalisation comme celles de la PI3K, PLC, MAPK et celles des récepteurs des facteurs de croissance (Bolen, Rowley et al. 1992, Prenzel, Zwick et al. 2000, Leu and Maa 2003, Touyz, Cruzado et al. 2003, Yeatman 2004, Scaltriti and Baselga 2006). En effet, il a déjà été démontré non seulement que la phosphorylation de c-Src par l'Ang II via le récepteur AT1 peut par la suite activer à son tour la PI3K, la PLC mais également la MAPK et la NAD(P)H oxydase qui contribuent à la prolifération cellulaire des CMLVs (Touyz, He et al. 2001) mais aussi que l'inhibition de c-Src par PP2 peut réduire la synthèse d'ADN au niveau des CMLVs

des RSH suggérant ainsi son implication dans les phénomènes prolifératifs (Bou Daou, Li et al. 2016).

3.3.5 Les récepteurs des facteurs de croissance et la prolifération cellulaire

Les voies de signalisation des facteurs de croissance ont longtemps été étudiées pour leurs implications dans le développement et le maintien de la prolifération cellulaire (Brown and Sacks 2008). En effet, les effets de la signalisation ERK1/2 au niveau des CMLVs contribuent au remodelage vasculaire de par leurs effets migratoires et prolifératifs (Jing, Zhang et al. 2011, Su, Xu et al. 2015). Comme l'a démontré Force et al., l'activation d'ERK1/2 joue un rôle central dans l'augmentation de la prolifération des CMLVs en cas d'hypertension (Force and Bonventre 1998). Les RSH qui démontrent des niveaux de peptides vasoactifs endogènes, comme l'Ang II et l'ET1, plus élevés que chez WKY, démontrent également un taux de phosphorylation d'ERK1/2 plus important au niveau des CMLVs (Lappas, Daou et al. 2005). Cette augmentation des niveaux des peptides vasoactifs stimule l'hyperplasie des CMLVs par l'activation des voies de la MAPK (Touyz, Deng et al. 1999, Touyz and Schiffrin 2004) qui sont impliquées dans la prolifération cellulaire (Xu, Liu et al. 1996). Par ailleurs, Hashim et ses collègues ont démontré que le traitement par l'inhibiteur de MEK1, le PD98059, réduit l'hyperprolifération induite par l'Ang II dans un modèle de cellules A10 (Hashim, Li et al. 2006).

Les voies de signalisation de PI3K/AKT sont aussi impliquées dans la prolifération cellulaire et dans la transduction du signal impliquant l'Ang II (Takahashi, Taniguchi et al. 1999, Xu, Ouk Kim et al. 2000, Liu, Su et al. 2010). Etant donné que PI3K est capable de réguler en amont ERK1/2, son activation est également importante dans la prolifération des CMLVs (Saward and Zahradka 1997, Jiang, Li et al. 2014, Li, Chen et al. 2015). D'autres études ont suggéré que la voie de PI3K/AKT est impliquée dans la promotion du passage des CMLVs d'un

état quiescent à un état prolifératif (Liu, Su et al. 2010). De plus, la voie des PI3K peut être activée par les récepteurs tyrosines kinases, soit de manière directe, soit à travers le recrutement de la petite protéine G Ras (Katz, Amit et al. 2007).

La voie de c-Src participe également à la transduction du signal des facteurs de croissance et est elle-même impliquée dans la prolifération cellulaire par l'activation de ERK1/2 (Bolen, Rowley et al. 1992, Touyz 2003, Marcotte, Smith et al. 2012). c-Src participe à la médiation de la transactivation des récepteurs des facteurs de croissance par les RCPG (Yang, Lee et al. 2013, Yang, Lin et al. 2015). Notons que les RCPG peuvent eux même faire partie de l'assemblage d'un complexe, qui aboutira à l'activation des voies de signalisation mitogènes, comme dans le complexe récepteur- β -arrestin-c-Src (DeWire, Ahn et al. 2007, Kim, Ahn et al. 2009). De plus, de nombreuses études ont aussi suggéré que les RCPG nécessite la formation du complexe Shc-Grb2-SOS, ainsi que l'activation des récepteurs tyrosines kinases, comme l'EGF-R et le PDGF-R, afin de pouvoir activer les MAPK (Goldsmith and Dhanasekaran 2007, Little 2013).

3.3.6 La transactivation des récepteurs des facteurs de croissance

L'Ang II en activant les RCPG qui à leurs tour peuvent activer des tyrosines kinases comme le EGF-R le PDGF-R et l'IGF-R ou encore des tyrosines kinases non réceptrices telles que c-Src (Rozengurt, Sinnott-Smith et al. 2010, Magalhaes, Dunn et al. 2012, Cattaneo, Guerra et al. 2014, Sur and Agrawal 2014). Ce phénomène de "cross talk" entre RCPG et RTK est connu sous le nom de transactivation. La transactivation de ces tyrosines kinases stimule plusieurs voies de signalisation comme la MAPK, la PI3K et la PKB. Plusieurs études ont déjà démontré la transmission du signal par les récepteurs des facteurs de croissance EGF-R et PDGF-R suite à une stimulation des CMLVs par l'ET-1 ou l'activation du récepteur AT1 (Shichiri, Yokokura et al. 2000, Pierce, Tohgo et al. 2001, Gao, Hansen et al. 2006, Ohtsu, Dempsey et al. 2006). En

effet, l'Ang II et l'ET-1 induisent une transactivation des récepteurs des facteurs de croissance par la voie des MAPK (Li and Anand-Srivastava 2014), et au niveau des CMLVs des RSH ils contribuent à la surexpression de Gαi par l'entremise du stress oxydatif qui lui-même transactive les récepteurs des facteurs de croissance et la MAPK (Gomez Sandoval and Anand-Srivastava 2011, Sandoval, Li et al. 2011). La transactivation des récepteurs des facteurs de croissance via c-Src est également induite par l'ET-1 via les récepteurs ET_A et ET_B (Gomez Sandoval and Anand-Srivastava 2011). De plus, les RCPG peuvent provoquer un clivage protéolytique de pro-hormones liées à la membrane tel que le facteur de croissance analogue à l'EGF liant l'héparine (HB-EGF) (Liebmann 2011, George, Hannan et al. 2013, Cattaneo, Guerra et al. 2014, Overland and Insel 2015).

3.4 Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre molécules oxydantes et anti-oxydantes en faveur des oxydants. Ce déséquilibre se produit lors de l'augmentation des réactions de réduction-oxydation (REDOX) aboutissant à une surproduction d'espèces réactives oxygénées (ERO) alors trop importantes pour pouvoir être éliminées par les antioxydants (Lyle and Griendling 2006). Bien que les EROs soient importants dans la régulation de la transduction des signaux, leur accumulation stimule une cascade enzymatique qui peut entraîner au niveau de la cellule des changements pathologiques (Thannickal and Fanburg 2000, Bonnefont-Rousselot 2002, Lassegue and Griendling 2004).

3.4.1 Les espèces réactives oxygénées

Les EROs sont produites à la suite du métabolisme aérobie cellulaire. Ces molécules qui sont dérivées de l'oxygène, possèdent des propriétés oxydantes, qui les rendent hautement réactives par le fait d'avoir un électron non apparié (Alberts 2002, Lyle and Griendling 2006).

Les EROs sont responsables de la phosphorylation de plusieurs protéines kinases et de facteurs de transcriptions (Kamata 2009, Son, Kim et al. 2013, Holl, Koziel et al. 2016). Cette propriété leur confère le rôle de messager second capable d'intervenir dans plusieurs mécanismes de signalisation cellulaire comme l'apoptose, la prolifération des CMLVs, l'hypertrophie, la migration cellulaire, et l'agrégation plaquettaire (Taniyama and Griendling 2003). Cependant lorsque la surproduction des EROs dépasse les défenses antioxydantes de l'organisme, l'ADN, les protéines et les lipides subissent des effets délétères (Laplane and de Champlain 2006, Jena 2012, Imlay 2013), aboutissant à la modification des fonctions cellulaires (Lyle and Griendling 2006).

3.4.2 Les sources d'EROs

Les EROs agissent comme radicaux libres de par leur électron non-apparié comme l'anion superoxyde (O_2^-), l'anion hydroxyle (HO^-), ou encore le peroxyde d'azote ($ONOO^-$) et se lie à d'autres molécules pour en modifier les fonctions. Ils peuvent également endosser eux-mêmes le rôle de molécules oxydantes comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L'anion superoxyde (O_2^-) joue un rôle physiologique central dans la signalisation cellulaire (Lyle and Griendling 2006). La conversion de la molécule d'oxygène en anion superoxyde au niveau vasculaire commence par la réduction d'un électron sur la molécule d'oxygène par des oxydases en utilisant comme donneur d'électrons le nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NAD(P)H) (Taniyama and Griendling 2003). L'anion superoxyde sera transformé par la suite en dioxygène et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) soit spontanément soit en étant catalysé par un groupe d'enzymes qui sont les superoxydes dismutases (SOD) et qui sont divisées en quatre familles selon le cofacteur métallique qui se trouve au site actif : Les SOD au cuivre et au zinc (Cu/Zn-SOD) qui sont localisées dans le cytosol, les SOD au fer (Fe-SOD) dans le milieu extracellulaire, les SOD au

manganèse (Mn-SOD) dans la mitochondrie et les SOD au nickel (Ni-SOD) (Fridovich 1974, Faraci and Didion 2004). L' H_2O_2 est plus stable que l'anion superoxyde, il possède une demi-vie plus longue, mais il est également liposoluble, ce qui lui permet de pénétrer la membrane cellulaire plus facilement (Han, Antunes et al. 2003). L' H_2O_2 peut être converti par la suite en H_2O par la catalase et la glutathionne peroxydase ou alors après une réaction avec le Fe^{2+} en HO^\cdot qui est hautement réactif (Fridovich 1974, Schafer and Buettner 2001). L'anion superoxyde peut également engendrer le peroxynitrite (ONOO^\cdot) en interagissant avec le monoxyde d'azote (NO) (Moncada, Palmer et al. 1991, Lassegue and Griendling 2004). Le ONOO^\cdot diminue la disponibilité du NO au niveau des CMLVs entraînant ainsi une augmentation du tonus vasculaire et un dysfonctionnement endothélial (Lassegue and Griendling 2004). Dans le système biologique, les EROs ont de multiples sources enzymatiques et non enzymatiques (Touyz and Schiffrin 2004).

3.4.2.1 Les sources enzymatiques des EROs

Au niveau des CMLVs, les EROs sont produites à des degrés différents et par des sources différentes comme la NAD(P)H oxydase, la xanthine oxydase, la chaîne respiratoire des mitochondries et les synthèses du monoxyde d'azote (*nitric oxide synthase*, NOS) découplées (Tsutsui 2004). Toutes ces enzymes contribuent à la genèse des EROs, cependant de nombreuses études impliquent la NAD(P)H oxydase comme étant l'initiateur de la production des EROs par les autres enzymes (Landmesser, Dikalov et al. 2003).

3.4.2.1.1 La NAD(P)H oxydase

La NADP(H) oxydase vasculaire est composée d'un complexe protéique multimérique qui catalyse la production de O_2^\cdot et H_2O_2 à partir de la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) (Griendling, Sorescu et

al. 2000, Laplante and de Champlain 2006). La NAD(P)H oxydase a été premièrement décrite dans les phagocytes (les neutrophiles, les granulocytes, les monocytes et les macrophages) et les tissus vasculaires (Fridovich 1974, Babior, Lambeth et al. 2002).

3.4.2.1.2 Structure de la NADP(H) oxydase

La NADP(H) oxydase vasculaire est composée de quatre sous-unités majeures : 1) deux composantes membranaires le gp91^{phox} aussi appelé NOX2 (contient six domaines transmembranaires, deux hèmes et le site de liaison pour le NAD(P)H) (Brandes and Kreuzer 2005) et la p22^{phox} qui ensemble forment un hétérodimère, le cytochrome b558 aussi appelé flavocytochrome b558 à cause de l'association avec la flavine adénine dinucleotide (FAD) (Touyz and Schiffrin 2004) 2) ainsi que deux sous-unités cytosoliques le p47^{phox} et le p67^{phox} (Babior, Lambeth et al. 2002, Vignais 2002). Une petite protéine G Rac participe à l'assemblage et à l'activation de l'enzyme (Griendling, Sorescu et al. 2000, Ceolotto, Papparella et al. 2006, Lyle and Griendling 2006) qui a lieu comme suit: Rac lorsqu'il est lié au GDP se trouve sous une forme inactive, avec sa queue géranylgeranyle liée au GDI (de l'anglais Guanine nucleotide dissociation inhibitor). p47^{phox} est inactivée via la région auto-inhibitrice (AIR) couvrant les domaines d'interactions. L'activation a lieu par l'échange du GDP pour le GTP au niveau de Rac et de la phosphorylation de p47^{phox} sur les sérines aux positions 303, 304 et 328 résultant en un changement de conformation de p47^{phox} qui relâche AIR, exposant ainsi les domaines d'interactions. Le nouvellement formé Rac-GTP s'ancre à la membrane et interagit avec l'oxydase via le motif tétratricopeptide repeat (TRP) de la partie N-terminale de p67^{phox}.

Par la suite, le domaine bis-SH3 de p47^{phox} lie p22^{phox}, alors que le domaine PX permet l'ancrage de p47^{phox} à la membrane. p67^{phox} via son domaine SH3 agit avec la région riche en proline de p47^{phox}. Ces interactions induisent le contact du côté d'activation (S) de gp91^{phox} avec

p67^{phox} via un domaine d'activation (AD) localisé dans la partie N-terminale de p67^{phox}. p47^{phox} agit comme une protéine adaptatrice qui facilite l'association de gp91^{phox} et de p67^{phox} (Brandes and Kreuzer 2005).

3.4.3 L'implication du stress oxydatif dans les voies de signalisation

3.4.3.1 Les peptides vasoactifs et le stress oxydatif

Le stress oxydatif est associé entre autres, à l'inflammation des cellules, au dépôt de collagène, et à la prolifération et la croissance qui sont des facteurs importants dans le remodelage vasculaire observé dans plusieurs pathologies cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle (Khansari, Shakiba et al. 2009, Shimokawa 2013, Montezano and Touyz 2014, Oliveira, de Oliveira et al. 2014, Salzano, Checconi et al. 2014). Ce remodelage est fortement lié à la présence de niveaux élevés d'Ang II et d'ET-1 (Barton, d'Uscio et al. 1998, Touyz and Schiffrin 2000). L'exposition des CMLVs à l'Ang II et l'ET-1 entraîne une augmentation de l'anion superoxyde par l'activation de la NADP(H) oxydase associée à la membrane ainsi qu'une surexpression des sous-unités Nox4 et p47^{phox} de la NADP(H) oxydase (Griendling, Minieri et al. 1994, Li, Fink et al. 2003, Callera, Tostes et al. 2006, Saha, Li et al. 2008b). Au niveau des CMLVs de rats Sprague-Dawley, Sedeek et al. ont démontré une augmentation dose-dépendante des niveaux d'O₂⁻ et des doses d'ET-1 infusées (Sedeek, Llinas et al. 2003). Griendling et ses collègues ont démontré que l'Ang II induit une croissance cellulaire qui met en jeu le peroxyde d'hydrogène et qui peut être inhibée par des antioxydants (Nakamura, Fushimi et al. 1998). Anand-Srivastava et al. ont également démontré que le traitement de CMLVs de RSH par le losartan induisait une diminution des niveaux d'anion superoxyde (Anand-Srivastava 2010). Ces études soulignent l'importance du stress oxydatif dans la médiation des signaux des peptides vasoactifs.

De manière réciproque, des générateurs d'EROs peuvent induire l'augmentation de l'ET-1, ainsi que de son enzyme de conversion (Ruef, Moser et al. 2001, Lopez-Ongil, Saura et al. 2002). Il est intéressant de noter que dans les CMLVs, l'Ang II possède deux phases durant lesquelles elle produit l' O_2^- . La première qui fait intervenir seulement l'Ang II et la deuxième qui se produit lors de la relâche de l'ET-1, ce qui laisse à suggérer l'intervention des deux peptides afin de produire l' O_2^- (Laplante, Wu et al. 2005).

3.4.3.2 Les EROs et les récepteurs des facteurs de croissance

Les récepteurs des facteurs de croissance activent leurs tyrosines kinases intrinsèques menant à l'autophosphorylation de leurs résidus tyrosines (Lemmon and Schlessinger 2010). Les travaux de Sundaresan M et al. ont démontré que les facteurs de croissance comme l'EGF et le PDGF engendraient une augmentation rapide et transitoire des EROs via l'activation de la NADP(H) oxydase et que ces EROs étaient nécessaires pour la phosphorylation des tyrosines des récepteurs des facteurs de croissance (Sundaresan, Yu et al. 1995). Il a été démontré par la suite que la production de H_2O_2 par l'EGF induit l'oxydation de la protéine tyrosine phosphatase menant à son inactivation et à l'augmentation subséquente de la phosphorylation de la tyrosine de l'EGF-R (Bae, Kang et al. 1997). Une autre explication pour ce déséquilibre de phosphorylation crée par les EROs a également été proposée et qui met en jeu la protéolyse de la protéine régulatrice qui bloque l'activité de la protéine tyrosine kinase, menant à l'augmentation de l'activité de cette dernière (Adrain and Freeman 2014). Alternativement, les EROs peuvent activer les tyrosines kinases en générant la production de facteurs de croissance tels que le facteur de croissance analogue à l'EGF liant l'héparine (HB-EGF). Les métalloprotéases activées par le H_2O_2 vont cliver la pro-HB-EGF en HB-EGF activant ainsi l'EGF-R (Prenzel, Zwick et al. 1999). Une autre voie d'activation des PTK a été suggérée. Celle-

ci est indépendante de l'inhibition de la tyrosine phosphatase et de la kinase intrinsèque du récepteur. Elle nécessite cependant l'activation de deux protéines kinases, PKC δ et c-Src, ce qui implique le rôle de ces deux molécules dans l'activation des RTK induites par le stress oxydatif (Eguchi, Iwasaki et al. 1999, Saito, Frank et al. 2002). De plus, cette production de H₂O₂ par les facteurs de croissance nécessite l'implication de la PI3K qui procure la phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate. La PI(3,4,5)P₃ recrute et active un facteur d'échange de nucléotides guanyliques de Rac aboutissant à l'activation de la NADP(H) oxydase (Rhee, Chang et al. 2003).

3.4.3.2.1 Les EROs et la voie des MAPK

Les oxydants entraînent de nombreuses phosphorylation qui aboutissent à l'activation des MAPK (Son, Cheong et al. 2011). Les MAPK, sont à leur tour responsables de la phosphorylation de nombreuses protéines incluant les facteurs de transcription qui agissent au niveau des noyaux cellulaires et peuvent engendrer une réplication d'ADN. Cependant, certaines sont plus sensibles à des stimuli que d'autres, de telle sorte que l'ERK a démontré une activation plus élevée aux stimuli mitotiques que les autres membres des MAPK (Waskiewicz and Cooper 1995, Robinson and Cobb 1997). Plusieurs travaux ont démontré la phosphorylation d'ERK par les EROs, aussi bien de sources endogènes que de sources exogènes, dans différents systèmes et son implication dans la survie et la prolifération cellulaire (Guyton, Liu et al. 1996, Wang, Martindale et al. 1998, Lappas, Daou et al. 2005). Sur des CMLVs de type A10, Li et ses collègues ont démontré que les niveaux élevés de phosphorylation d'ERK induits par un traitement à l'Ang II étaient réduits par le Diphenyleneiodonium (DPI) qui est un inhibiteur de la NADP(H) oxydase, ce qui suggère également le rôle du stress oxydatif dans l'augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 (Li, Lappas et al. 2007).

La figure 5 suivante montre les différentes voies de signalisation des EROs et leurs interactions :

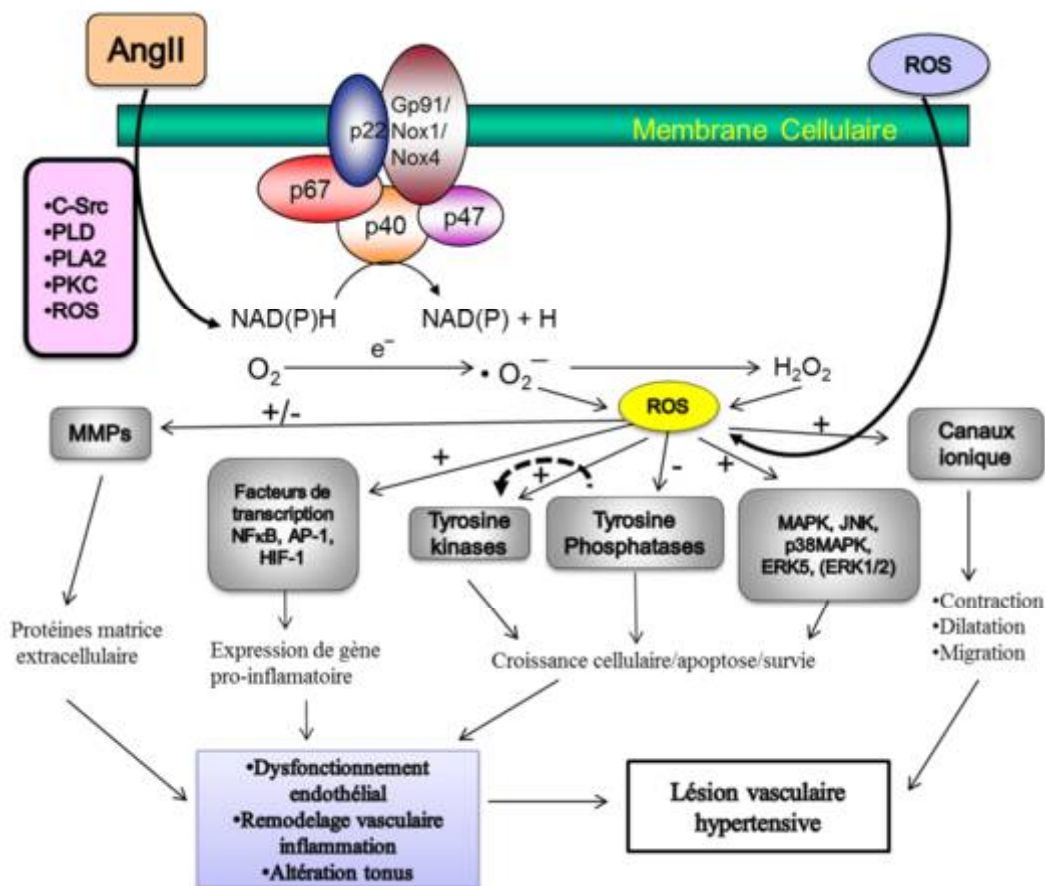


Figure 5: Voies de signalisation impliquant les EROs.

Source : Modifié de (Touyz 2005)

PLD: phospholipase D, PLA2: phospholipaseA2, PKC : protéine kinase C

ROS: reactive Oxygen species, AP-1: activator protein-1, MAP: mitogen activated protein, NFκ-B: nuclear factor beta, AP-1:activator protein-1, HIF-1: hypoxia-inducible factor-1, MMP: matrix metallo proteinase, +: effets stimulateurs, -: effets inhibiteurs.

3.4.4 L'implication du stress oxydatif dans la prolifération cellulaire

Les modèles génétiques d'hypertension comme les RSH ont démontré un taux d'expression de la NADP(H) oxydase élevé (Zalba, San Jose et al. 2001). Par ailleurs, le stress oxydatif est

considéré comme le principal effecteur du remodelage vasculaire chez les RSH prédisposés aux accidents vasculaires cérébraux (Park, Touyz et al. 2002). De plus, les sous-unités de la NADP(H) oxydase, p47^{phox} et Nox4 ont une expression élevée au niveau des CMLVs des RSH (Saha, Li et al. 2008a). Rao et ses collègues ont démontré que l'augmentation du stress oxydatif stimule la synthèse d'ADN au niveau des CMLVs (Rao and Berk 1992). Wedgwood et al. quant à eux ont démontré que l'action prolifératrice de l'ET-1 sur les CMLVs se faisait également à travers la production des EROs (Wedgwood, Dettman et al. 2001). Des études effectuées par Boscoboinik ont démontré que le traitement de CMLVs par des antioxydants inhibait leur prolifération (Boscoboinik, Szewczyk et al. 1991). Par ailleurs, d'autres molécules antioxydantes comme l'hème oxygénase peuvent diminuer le taux de prolifération des CMLVs chez les RSH. Les régimes thérapeutiques qui ont pour but de diminuer la production d'EROs ou d'augmenter les mécanismes de défense antioxydante ont démontré un effet protecteur sur la vasculature. Les effets prolifératifs des EROs peuvent également se produire par l'inhibition du NO, provoquant ainsi une diminution de sa biodisponibilité et une augmentation de la résistance vasculaire périphérique (Hsieh, Liu et al. 2014).

4. Les peptides natriurétiques

Il y a plus de 55 ans que les premières observations biologiques ayant prédit l'existence des peptides natriurétiques ont été faites. Kish a remarqué que les cellules des oreillettes et non pas des ventricules, contenaient un réseau d'appareil de Golgi significativement développé, similaire à celui retrouvé au niveau des cellules sécrétoires (Kisch 1956). Jamieson et Palade ont également remarqué que les myocytes des oreillettes mais pas des ventricules contenaient des granules opaques (Jamieson and Palade 1964). Durant la même période des expériences effectuées par Henry et ses collègues ont démontré que la distension pneumatique de l'oreillette

chez les chiens entraînait une augmentation du débit urinaire (Henry, Gauer et al. 1956). de Bold et ses collègues ont constaté que ces granules de l'oreillette changeaient leurs contenus par rapport au contenu d'eau et d'électrolytes (de Bold, Borenstein et al. 1981). La découverte des peptides natriurétiques par de Bold a donné suite à de nombreuses études qui ont mené à la purification et au séquençage de peptides des oreillettes de différentes tailles ayant des propriétés diurétiques, et pour certaines relaxantes (Flynn, de Bold et al. 1983, Currie, Geller et al. 1984, Kangawa, Tawaragi et al. 1984, Misono, Grammer et al. 1984). La famille des peptides natriurétiques comprend trois hormones peptidiques : le peptide natriurétique auriculaire (ANP), le peptide natriurétique de type B appelé à son origine Brain natriuretic peptide (BNP) car purifié et séquencé à partir de tissu cérébral de porc (Sudoh, Kangawa et al. 1988) et qui s'est avéré par la suite en plus grande concentration dans les ventricules cardiaques de patients avec insuffisance cardiaque (Mukoyama, Nakao et al. 1990, Mukoyama, Nakao et al. 1991). Le dernier membre de la famille est le peptide natriurétique de type C (CNP), qui a aussi été purifié à partir de tissu cérébral de porc (Sudoh, Minamino et al. 1990) et qui induit une relaxation du muscle lisse. Ces peptides sont relâchés dans la circulation sanguine lors d'une distension de l'oreillette ou d'une stimulation neuro-humorale (Dietz 1984, Mukoyama, Nakao et al. 1991). L'ANP est sécrété dans sa forme mature (ANP₁₋₂₈), et régule de nombreuses fonctions physiologiques comme la pression artérielle, la relâche de rénine, de vasopressine, d'endothéline et la sécrétion de progestérone. L'ANP agit sur son récepteur membranaire soit en altérant le niveau de messenger second comme l'AMPc ou le GMPc, ou alors en altérant les canaux ioniques. Le BNP, est sécrété sous la forme proBNP₁₋₁₀₈ et est ensuite clivé par corin ou furin en BNP mature (BNP₁₋₃₂) et en fragment N-terminal proBNP₁₋₇₆ (Sawada, Suda et al. 1997, Yan, Wu et al. 2000, Ichiki, Huntley et al. 2011). L'expression de CNP se fait principalement au

niveau vasculaire, neuronal et au niveau des cellules de Leydig. Son précurseur, le proCNP₁₋₁₀₃ est clivé par furin en CNP₁₋₅₃ et ensuite en CNP₁₋₂₂ par une protéase, et c'est sous cette forme qu'il circule dans le sang. Le BNP et le CNP agissent comme des antagonistes de la vasopressine, de l'endothéline et du système rénine-angiotensine-aldostérone. La découverte de ces facteurs natriurétiques a permis le développement de nouvelles stratégies de lutte contre l'hypertension artérielle.

4.1 Les récepteurs des peptides natriurétiques

Il existe à ce jour trois types de récepteurs pour les facteurs natriurétiques (Figure 6). Tous contiennent un domaine ligand extracellulaire de ~ 450 acides aminés et un passage transmembranaire. Les récepteurs natriurétiques de types A et B (NPR-A et NPR-B) possèdent une homologie de 64 % entre eux et contiennent un domaine intracellulaire d'homologie kinase, un domaine de dimérisation et un domaine guanylate cyclase au niveau carboxyl-terminal. L'activation de la guanylate cyclase augmente les taux intracellulaires de cGMP qui agit sur de nombreuses molécules comme les phosphodiésterases, les canaux ioniques ou sur les kinases comme la PKG qui inhibe la PLC et entraîne une relaxation musculaire (Rapoport 1986). La concentration des peptides natriurétiques est contrôlée par le NPR-C qui procède à leur internalisation et dégradation (Rose and Giles 2008, Potter, Yoder et al. 2009) et ceci a été pendant longtemps la seule fonction attribuée à ce récepteur.

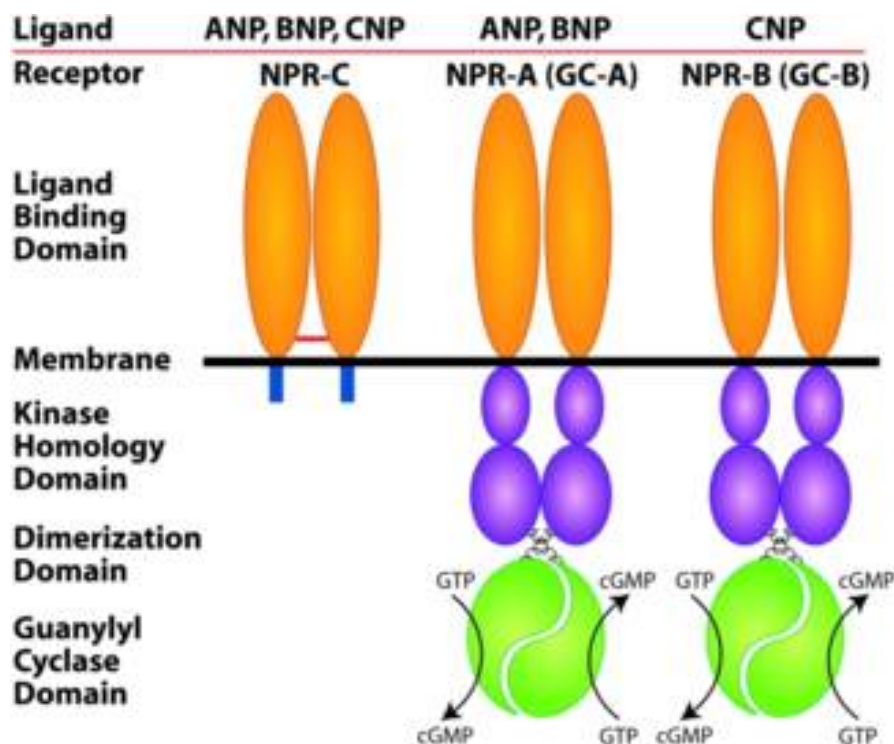


Figure 6 : Les récepteurs natriurétiques.

Source : (Potter, Abbey-Hosch et al. 2006)

5. Les récepteurs natriurétiques de type C et leur distribution

Le NPR-C est le récepteur le plus abondant et le plus ubiquitaire des récepteurs natriurétiques, il constitue par exemple plus de 90 % des sites de liaison de l'ANP au niveau des cellules endothéliales (Leitman, Andresen et al. 1986). Le NPR-C et/ou leur ARNm sont exprimés au niveau des glandes surrénales, des reins, des plaquettes du cortex cérébral, du tissu cardiaque, des fibres de Purkinje, des cellules ganglionnaires de la rétine et au niveau des CMLVs (Porter, Arfsten et al. 1990, Wilcox, Augustine et al. 1991, Suga, Nakao et al. 1992, Nagase, Katafuchi et al. 1997, Anand-Srivastava 2005, Zhang, Tian et al. 2010). Le récepteur natriurétique de type C est capable de lier les facteurs natriurétiques avec la même affinité que le NPR-A et B (Anand-Srivastava 2005, Rose and Giles 2008). Contrairement aux autres NPRs, le

NPR-C ne possède pas de domaine guanylate cyclase et est incapable de moduler directement les variations de concentration du GMPc (Anand-Srivastava 2005). C'est partiellement dû à cette observation que lui vient le nom de récepteur de clairance et qu'aucune fonction de signalisation ne lui a été attribuée (Maack, Suzuki et al. 1987). L'hypothèse a été que le NPR-C avait comme fonction d'éliminer les facteurs natriurétiques de la circulation afin de les internaliser et de les dégrader, et moduler ainsi la concentration des facteurs natriurétiques qui se lient au NPR-A et B. Le NPR-C contient un seul passage transmembranaire, un domaine extracellulaire de ~ 440 acides aminés et un domaine cytoplasmique de 37 acides aminés (Anand-Srivastava 2005). Il contient 30-35% d'homologie avec le NPR-A et le NPR-B, et contrairement à ces récepteurs, le NPR-C contient un à deux ponts disulfures intermoléculaires. Il contient également trois sites de glycosylation à son niveau N-terminal (Pandey 2014). Il lie les facteurs natriurétiques avec une stœchiométrie de deux molécules de récepteur pour une molécule de ligand (Ammarguella, Larouche et al. 2001). La liaison des peptides natriurétiques avec le NPR-C suit un ordre de préférence: ANP>BNP>CNP (Sellitti, Koles et al. 2011, Gruden, Landi et al. 2014). Cependant, il se lie avec une très haute affinité à l'analogue tronqué de forme cyclique [des(Glu18, Ser19, Glu20, Leu21, Gly22)ANP4–23-NH2] du C-ANP, le C-ANP4-23 (Maack, Suzuki et al. 1987). Le gène codant du NPR-C chez l'humain se trouve sur le chromosome 5p13–14 et contient 8 exons et 7 introns de 65 kilobases (Rahmutula, Nakayama et al. 2002, Potter, Yoder et al. 2009). Cependant, Nunez et ses collègues ont identifié 2 ADN complémentaires codants pour le NPR-C au niveau des veines ombilicales humaines avec une délétion de 123 nucléotides sur l'une des deux transcripts (Nunez, Dickson et al. 1992, Potter, Yoder et al. 2009). De plus, les travaux effectués par Savoie et al. ont suggéré que l'interaction des peptides CNP et BNP avec le récepteur NPR-C s'effectuait dans deux sites différents ou qu'elle impliquait deux sous-types de

NPR-C (Savoie, de Champlain et al. 1995). Les études de Trachte et al. ont aussi suggéré l'existence de 2 sous-types de NPR-C (Nonoyama, Masuda et al. 1976). Brown et Zuo ont identifié au niveau de la membrane glomérulaire du rat, deux récepteurs NPR-C like, l'un de 67 kDa et l'autre de 77 kDa. Ces deux protéines ont une haute affinité pour ANP₁₋₂₈ et C-ANP, cela dit l'affinité pour le CNP₁₋₂₂ était beaucoup plus grande pour le récepteur de 67 kDa (Brown and Zuo 1994). La protéine de 67 kDa diminue les niveaux d'AMPc au niveau des glomérules du rat et en présence de l'isobutylmethylxanthine (IBMX), un inhibiteur de phosphodiésterase de l'AMPc et de GMPc, ce qui suggère que cette protéine inhibe la synthèse de l'AMPc (Brown and Zuo 1994).

5.1 Signalisation du récepteur natriurétique de type C

Il est bien connu à présent que le NPR-C est couplé à l'inhibition de l'AC (Tseng, Lahiri et al. 1990, Anand-Srivastava and Trachte 1993) et les travaux de Anand-Srivastava et al. concernant l'effet de l'ANP sur le NPR-C au niveau des cardiomyocytes l'ont démontré (Anand-Srivastava and Cantin 1986). Plusieurs études sont venues par la suite corroborer le rôle signalétique du récepteur natriurétique de type C. Le domaine cytoplasmique de 37 aa du récepteur NPR-C chez le rat a démontré une séquence d'activation de la protéine G α i qui inhibe l'AC (Anand-Srivastava, Sehl et al. 1996, Murthy and Makhlouf 1999, Pagano and Anand-Srivastava 2001), mais ne contient pas de domaine à sept passages transmembranaires habituellement observé chez les récepteurs couplés aux protéines G (Lefkowitz 2007). Cette propriété du NPR-C à inhiber l'AC a été impliquée dans la diminution de la prolifération des astrocytes (Levin and Frank 1991), la production et la relâche d'endothéline des cellules endothéliales (Hu, Levin et al. 1992). L'utilisation d'un oligonucléotide anti-sens du récepteur NPR-C par Anand-Srivastava et al. a démontré une diminution de l'inhibition de l'AC sans

modifier la stimulation de l'AC par le récepteur β -adrénergique (Palaparti, Li et al. 2000). Il a également été démontré que le C-ANP₄₋₂₃ induisait une augmentation de la production de l'IP3 et que cette dernière a été encore plus amplifiée par l'inhibiteur de l'AMPc, le dideoxyadenosine (DDA), et a été inhibée par la forskolin (FSK) qui est un agent inducteur (Mouawad, Li et al. 2004). Au niveau du model A10 des CMLVs, Mouawad et Anand-Srivastava ont démontré que l'inhibition de l'AC par l'activation du NPR-C provoquait une stimulation du turnover de la phosphatidylinositol suggérant un possible cross-talk entre la voie de signalisation de l'adénylate cyclase et celle de la PLC (Mouawad, Li et al. 2004). De plus, le NPR-C a également été impliqué dans la modulation d'autres voies de signalisation, comme l'activation de la NOS endothéliale via *Gai1* et *Gai2* au niveau des cellules musculaires lisses gastro-intestinales (Murthy, Teng et al. 1998, Zeng, Nystrom et al. 2000, Costa, Elesgaray et al. 2006, Zois, Bartels et al. 2014). Ce même agoniste spécifique du NPR-C inhibe le facteur de croissance dérivé des plaquettes et l'activité de la MAPK stimulée par l'ET-3 dans les astrocytes (Prins, Weber et al. 1996).

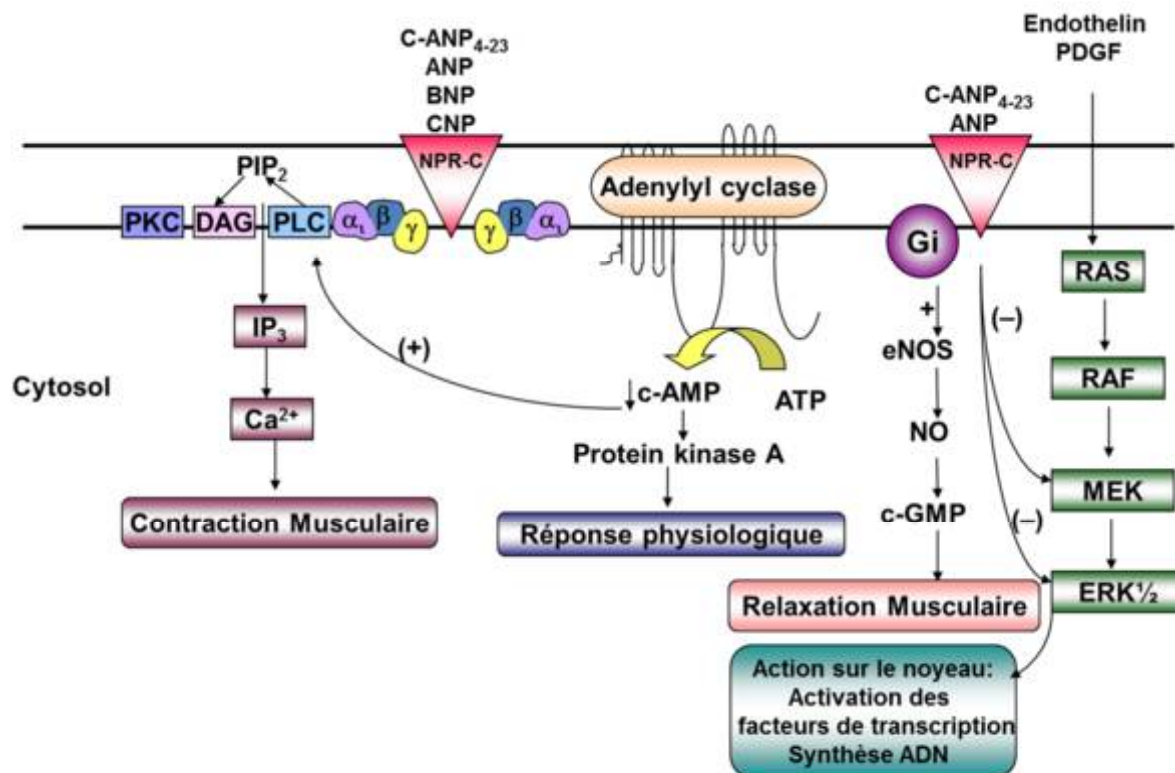


Figure 7 : Les voies de signalisation couplées au NPR-C

Source : (Anand-Srivastava 2005)

5.2 Le récepteur natriurétique de type C et la prolifération cellulaire

Le couplage du NPR-C à différentes voies de signalisation a contribué à une meilleure compréhension de ses fonctions, notamment en conditions pathologiques artérielles (Figure 7). De nombreux rapports ont été publiés suggérant le rôle antiprolifératif de NPR-C (Gower, Carter et al. 2006, Rubattu, Sciarretta et al. 2010).

Des études ont montré que les effets inhibiteurs de l'ANP sur la prolifération des cellules astrogliales se faisait à travers le NPR-C (Nussenzveig, Lewicki et al. 1990, Levin and Frank 1991, Rubattu, Sciarretta et al. 2010). Les résultats de Lelièvre ont montré un effet antiprolifératif du C-ANP₄₋₂₃ sur les trois lignées cellulaires du neuroblastome (Lelièvre, Pineau

et al. 2001). Yoshimoto et ses collègues quant à eux ont démontré que le niveau d'expression de l'ARNm du NPR-C dans l'aorte des RSH prédisposés aux accidents vasculaires cérébraux était régulé à la baisse en comparaison à leurs homologues WKY. Cette même étude a mis en évidence que le traitement de ces rats hypertendus par un antagoniste du récepteur AT1 a restauré les niveaux d'expression du NPR-C aux niveaux contrôles des rats WKY, suggérant le rôle de l'Ang II dans la régulation à la baisse du NPR-C vasculaire (Yoshimoto, Naruse et al. 1996). La prolifération des CMLVs et des cellules endothéliales par l'ANP est également inhibée par le NPR-C (Cahill and Hassid 1991, Levin and Frank 1991, Itoh, Pratt et al. 1992). L'implication du NPR-C dans le remodelage vasculaire et l'angiogenèse a été évoquée, et ceci par le fait que le C-ANP₄₋₂₃ inhibe, au niveau des CMLVs, les effets du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire lors d'une stimulation par l'ET et lors de l'hypoxie (Pedram, Razandi et al. 1997). En 1991, Cahill et son équipe ont démontré les effets inhibiteurs du NPR-C sur la mitogenèse et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires aortiques chez le rat (Cahill and Hassid 1991). L'activation du NPR-C par le C-ANP₄₋₂₃ a réduit les niveaux des ERO aux niveaux d'astrocytes traités par l'ammoniac suggérant son rôle protecteur lors de l'encéphalopathie hépatique (Skowronska, Zielinska et al. 2010). Le C-ANP₄₋₂₃ a également démontré *in vivo*, des effets inhibiteurs sur l'angiogenèse (Almeida, Cardoso et al. 2014). Les effets antiprolifératifs lors de l'activation du NPR-C font intervenir plusieurs voies de signalisation intracellulaires. En effet, Prins et al. ont montré que les effets d'agents mitogènes tels que ET-3, PDGF et le phorbol 12 myristate 13 acetate (PMA), étaient inhibés par l'ANP et le C-ANP₄₋₂₃, et que cette inhibition était due à une réduction du niveau de phosphorylation de MAPK (Prins, Weber et al. 1996). De plus, Hashim et al. ont démontré une diminution de la prolifération des CMLVs par un traitement au C-ANP₄₋₂₃ qui était réduite par les inhibiteurs de la

voie de MEK1/2 et de la PI3K, le PD-98059 et la wortmannin respectivement, ce qui suggère le rôle de ces voies dans la médiation des effets antiprolifératifs du NPR-C (Li, Hashim et al. 2006). De plus, une étude récente effectuée par El Andaloussi et al. a démontré que le traitement *in vivo* de RSH induisait une diminution de la prolifération des CMLVs. Cette observation s'est faite lors de la mesure de la synthèse de l'ADN par incorporation à la Thymidine radioactive. L'ADN des CMLVs des RSH traités par le C-ANP₄₋₂₃ était diminué en comparaison à celui des RSH non traités (El Andaloussi, Li et al. 2013).

Les EROs sont responsables de la phosphorylation de nombreuses protéines kinases et de facteurs de transcription qui sont impliqués dans la prolifération cellulaire (Wang, Martindale et al. 1998, Gauron, Rampon et al. 2013, Hole, Zabkiewicz et al. 2013, Ogrunc, Di Micco et al. 2014, Cheung, Lee et al. 2016). Une étude effectuée par Simon et al. a démontré que les cellules épithéliales mutantes dominantes négatives pour le p47^{phox} démontraient une diminution de la production des EROs ainsi qu'une diminution de la prolifération (Simon and Stutzin 2008). L'activation du NPR-C dans la médiation de la signalisation du stress oxydatif a été démontrée par Li et al. lors du traitement de RSH par l'activateur du NPR-C. Cette équipe a observé une diminution de la production de l'anion superoxyde, de l'activité de la NADPH oxydase ainsi que de ces sous-unités NOX4 et p47^{phox}, lors du traitement *in vivo* des RSH par le C-ANP₄₋₂₃, ce qui suggère que l'activation du NPR-C implique la réduction du stress oxydatif (Li, Sarkar et al. 2014).

6. Le cycle cellulaire

Le cycle de la vie cellulaire aussi appelé le cycle cellulaire est un processus nécessaire pour la régénération, la croissance et la prolifération cellulaire. Ces processus de réplication cellulaire aboutissent à deux cellules filles issues d'une cellule mère.

Chez les cellules eucaryotes, le cycle cellulaire comprend quatre phases distinctes : G1, S, G2 et M. La phase de synthèse S est celle de la réplication d'ADN, la phase M ou phase de mitose est celle de la séparation de la cellule. Les phases G1 et G2 sont appelées phases GAP. Durant la G1, la cellule subit une série de vérifications avant d'entrer en phase S. Par la suite, durant la phase G2 la cellule subit d'autres vérifications afin de procéder à la Mitose. Les phases G1, S, G2 sont connues sous le nom de période d'interphase. Cette période est significativement plus longue que la phase de mitose.

6.1 Les protéines du cycle cellulaire

Les altérations qui peuvent nuire au bon fonctionnement de la cellule, ne résultent pas seulement en une prolifération excessive de la cellule, mais à une augmentation de susceptibilité aux modifications génétiques qui contribuent à la pathogénèse de nombreuses maladies. Ces modifications génomiques et chromosomiques se produisent par l'entremise de régulateurs : les kinases dépendantes des cyclines (CDK) et leurs partenaires les cyclines (Morgan 1997).

La progression du cycle cellulaire se fait par le passage à travers des points de contrôle qui s'assurent qu'il n'y ait pas de défauts de synthèse d'ADN ou de ségrégations chromosomiques. L'activation de ces points de contrôle induit un arrêt de progression de la division cellulaire par la modification de l'activité des CDK. Cet arrêt permet à la cellule de réparer les dommages d'ADN afin de ne pas les transmettre aux cellules filles. Ces points de contrôle sont orchestrés par la formation de complexes CDK-Cyclines (figure 8).

Quatre groupes majeurs de cyclines ont été identifiés chez les mammifères : cycline B de localisation principalement cytoplasmique, les cyclines A, E et D de localisation nucléaire (Casimiro, Crosariol et al. 2012, Lim and Kaldis 2013). Selon le modèle classique de régulation du cycle cellulaire, les différents types de CDK : cdk2, cdk4 et cdk6 forment un complexe avec

leurs cyclines spécifiques à des stades bien précis du cycle afin de coordonner la progression du cycle cellulaire (Satyanarayana and Kaldis 2009). Alors que la plupart des cyclines contribuent à l'activation des CDK, les inhibiteurs des cyclines kinases (CKI) diminuent cette activation. Les CKI sont divisées en deux classes dépendamment de leur structure et de la spécificité au CDK. Les membres de la famille ink4 [p16^{INK4a} (Cdkn2a), p15^{INK4b} (Cdkn2b), p18^{INK4c} (Cdkn2c) et p19^{INK4d} (Cdkn2d)] visent principalement les cdk4 et cdk6. Tandis que les membres de la famille Cip/Kip [p21^{Cip1} (Cdkn1a), p27^{Kip1} (Cdkn1b) and p57^{Kip2} (Cdkn1c)] interagissent avec les complexes kinases D, E, A et B dépendants (Asghar, Witkiewicz et al. 2015).

6.2 La phase G1

Le signal de la progression du cycle cellulaire depuis la phase de quiescence G0 vers la phase G1 se produit sous le contrôle de cyclines et de kinases associées, en intégrant des stimuli extracellulaires. Lors de cette progression les cyclines D lient les Cdk4 et Cdk6 et les cyclines E lient les cdk2 (Hwang and Clurman 2005, Bryja, Pachernik et al. 2008).

Les deux types de cyclines E et D et leurs kinases sont nécessaires pour le contrôle et la progression dans la phase G1. Dans les cellules de culture, une expression élevée de cycline D durant la phase G1 est nécessaire afin que la cellule procède à la synthèse d'ADN (Yang, Hitomi et al. 2006). L'atténuation de l'activité de cdk4 par un inhibiteur polypeptidique de la famille du gène INK4 (Serrano, Hannon et al. 1993) ou encore par des drogues sélectives au cdk4 (Tetsu and McCormick 2003) a induit un arrêt de la phase G1. Des micro-injections d'anticorps ou de codons non-sens dirigés contre les cyclines D interfèrent avec la progression dans la phase G1 mais sont sans conséquence au niveau des autres phases du cycle (Baldin, Lukas et al. 1993, Quelle, Ashmun et al. 1993, Lukas, Pagano et al. 1994). La surexpression de cycline E peut également accélérer la progression de la phase G1 (Ekholm-Reed, Mendez et al.

2004, Mailand and Diffley 2005). Par ailleurs, un prolongement voir un arrêt de la phase G1 peut être obtenue par des inhibiteurs de cdk2 (Koledova, Kafkova et al. 2010). Plusieurs études démontrent que les complexes cyclines/cdk séquestrent les protéines inhibitrices comme la p27^{Kip1} et p21^{Cip1} lors de la phase G1 (Coqueret 2003, Orlando, Gallastegui et al. 2015). La fin de la phase G1 est accompagnée par un point de restriction (R) après lequel la cellule se doit de procéder à la réplication d'ADN durant la phase S (Pardee 1974, Foster, Yellen et al. 2010).

6.3 La phase de transition G1-S

La transition depuis la phase G1 à la phase S est cruciale à la prolifération des cellules eucaryotes. La formation des différents complexes cyclines/cdk est impliquée dans l'inhibition d'une protéine qui bloque la progression du cycle cellulaire. Les complexes cyclines D-Cdk4/Cdk6 et cycline E-Cdk2 sont responsables de la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Rb). Cette dernière est liée au facteur d'élongation 2 (E2F) lorsque la cellule n'est pas en division et que la protéine Rb est hypophosphorylée (Hiebert, Chellappan et al. 1992, Johnson, Schwarz et al. 1993, Schwarz, Devoto et al. 1993). Son hyperphosphorylation par le complexes cyclines/cdk entraîne une relâche de l'E2F qui va induire le passage de la cellule en phase S et poursuivre vers la prolifération cellulaire (Flemington, Speck et al. 1993, Helin, Harlow et al. 1993, Schwarz, Devoto et al. 1993, Taya 1997). L'E2F a pour fonctions de réguler l'expression de la cycline E, l'expression de gènes responsables de la réparation d'ADN, l'assemblage, la condensation, la ségrégation de chromatine et d'assurer l'intégrité de plusieurs points de contrôle (Ren, Cam et al. 2002, Trimarchi and Lees 2002, Wells, Graveel et al. 2002).

6.4 La phase G2 et M

À la fin de la phase S, la cellule possède deux copies identiques du génome et commence alors à synthétiser les protéines nécessaires à la mitose. La progression à travers la phase G1

nécessite la formation des complexes cycline A-cdk2 et cycline A-cdk1 (Tsai, Harlow et al. 1991, Grana and Reddy 1995), tandis que la progression de la mitose nécessite le complexe cycline B-cdk1 (Draetta and Beach 1988). La phosphorylation de la protéine du rétinoblastome demeure constante tout le long des phases G1/S/G2/M et se relie à l'E2F à la fin de la mitose (Buchkovich, Duffy et al. 1989, Chen, Scully et al. 1989).

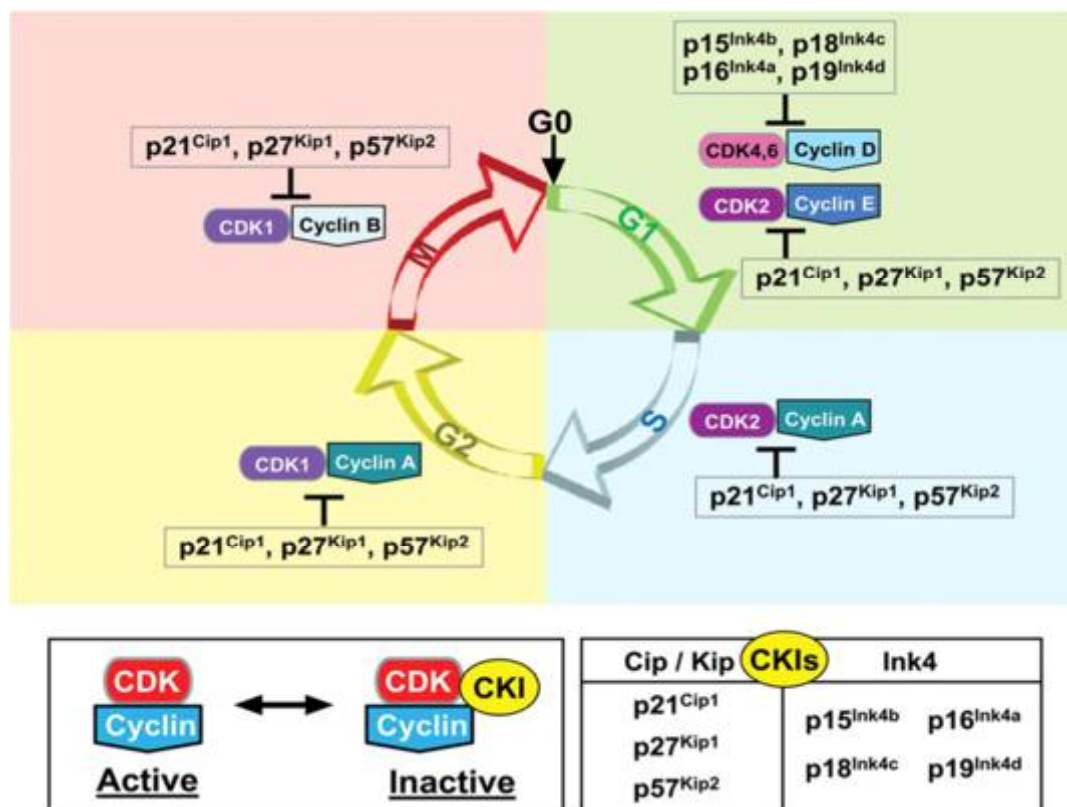


Figure 8 : Régulation du cycle cellulaire par les complexes cyclines/cdk et leurs inhibiteurs

Référence: (Fuster, Fernandez et al. 2010)

6.5 Les voies de signalisation impliquées dans le cycle cellulaire

De nombreuses études ont démontré l'implication de l'Ang II dans la prolifération cellulaire. En effet, l'infusion de l'Ang II *in vivo* stimule la synthèse d'ADN au niveau d'artères de rats normaux et lésés (Daemen, Lombardi et al. 1991, van Kleef, Smits et al. 1992, deBlois,

Viswanathan et al. 1996, Su, Lombardi et al. 1998). L'initiation de l'action de l'Ang II se produit à travers son récepteur AT1 qui est impliqué dans la croissance accélérée des cardiomyocytes durant la période néonatale mais également lors de l'hypertension artérielle. Une autre molécule, la PI3K, est également impliquée dans la prolifération et la croissance des CMLVs induites par l'Ang II (Gao, Hansen et al. 2006). Ces voies vont aboutir à l'activation de facteurs de transcription et induire une prolifération cellulaire. La paire de tyrosine phosphorylée ERK1/2 active pratiquement tous les signaux mitogènes dans différents types cellulaires. Meloche et al. ont démontré cette activation au niveau de fibroblastes de hamster ayant un pic de phosphorylation (Meloche, Seuwen et al. 1992). Par la suite, un rapport de causalité a été établi entre la phosphorylation de ERK1/2 et une synthèse accrue d'ADN. Par exemple, l'inhibition de la thrombine, un puissant agent mitogène qui active ERK1/2, par son antagoniste l'hirudine et par la toxine petrussique, cause un arrêt complet de la synthèse d'ADN (Meloche and Pouyssegur 2007). Le traitement de nombreux types cellulaires par des inhibiteurs d'ERK a démontré une action inhibitrice de la prolifération, incluant des cellules cancéreuses du col utérin, des ovocytes, des fibroblastes, les lymphocytes T, les CMLs et les hépatocytes (Zhang and Liu 2002, Bai, Mao et al. 2015). Par ailleurs, l'activation d'ERK1/2 est nécessaire pour que la cellule puisse entrer en phase G1 et entamer un cycle de prolifération (Yamamoto, Ebisuya et al. 2006). La voie de signalisation d'ERK1/2 est également nécessaire pour induire la transcription du gène de la cycline D1 (Dumesic, Scholl et al. 2009). Le promoteur de la cycline D1 contient un site de liaison d'ERK qui est l'AP1, ce qui pourrait expliquer la transcription de cycline D1 par ERK (Herber, Truss et al. 1994, Albanese, Johnson et al. 1995). L'activation d'ERK n'induit pas seulement l'accumulation de la cycline D1 mais permet également l'assemblage du complexe cycline D1-cdk4 (Cheng, Sexl et al. 1998), le cdk4 qui est la cible

directe du facteur de transcription c-Myc. Ce dernier possède un rôle important dans la croissance et la prolifération cellulaire (Grandori, Cowley et al. 2000, Patel, Loboda et al. 2004, Adhikary and Eilers 2005) et peut-être également activé par ERK (Hermeking, Rago et al. 2000). Cependant les mécanismes et molécules régulatrices qui lient ERK1/2 à l'expression des cyclines ne sont pas totalement élucidés (Modi, Komaravelli et al. 2012).

La voie de la PI3K/AKY est importante dans la régulation du cycle cellulaire (Diehl, Cheng et al. 1998, Muise-Helmericks, Grimes et al. 1998, Gille and Downward 1999, Medema, Kops et al. 2000). L'étude effectuée par Choudhury et son équipe a démontré que l'inhibition de cette voie stoppe la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire induite par le PDGF-R (Choudhury, Karamitsos et al. 1997). La voie de PI3K/AKT peut agir directement sur les phases du cycle cellulaire en provoquant une entrée en phase G1 et en inhibant les CKIs (Jones and Kazlauskas 2001, Liang and Slingerland 2003, Kumar, Marques et al. 2006).

Les EROs ont des fonctions importantes dans le cycle cellulaire, leur augmentation induit un passage de la cellule de la phase G1 à la phase S (Conour, Graham et al. 2004, Havens, Ho et al. 2006). Les EROs sont aussi importants durant la phase S, comme le démontre l'arrêt du cycle cellulaire lors de l'utilisation d'agents qui inhibent les EROs (Havens, Ho et al. 2006, Miller, Summers et al. 2006). De plus, il a été démontré que le traitement par le peroxyde d'hydrogène entraînait une hypophosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Cicchillitti, Fasanaro et al. 2003) provoquant ainsi la relâche de E2F et par la suite la prolifération. Cependant, les points de contrôle sont aussi activés par les EROs, ce qui suggère le maintien des niveaux des EROs dans une fourchette fonctionnelle afin que la cellule puisse proliférer (Menon and Goswami 2007).

6.6 Rôle du cycle cellulaire dans l'hypertension artérielle

L'un des éléments majeurs dans la pathogénèse de l'hypertension artérielle est le remodelage vasculaire qui est dû principalement à l'hyperprolifération des CMLVs. Les CMLVs des RSH expriment un taux de prolifération plus important que celui des rats WKY. Cette analyse effectuée par Tanner et ses collègues a démontré également que cette différence provenait du fait d'un changement de progression de la phase G1 dû à une expression plus élevée des cyclines D, A et cycline E (Tanner, Greutert et al. 2003). Cette étude suggère que la différence de prolifération observée entre les RSH et les rats WKY est due à une expression élevée des protéines du cycle cellulaire. Il existe également une sécrétion endogène d'Ang II élevée dans des conditions d'hypertension artérielle et notamment au niveau des CMLVs des RSH (Lappas, Daou et al. 2005). Il a également été démontré que l'activation de l'AT1 par l'Ang II induit une augmentation de la prolifération des CMLVs de rats Sprague Dawley en augmentant la synthèse d'ADN. De plus, l'activation de l'AT1 induit une expression élevée de cycline D1 et cdk4 durant la phase G1 (Diep, El Mabrouk et al. 2001). Par ailleurs, les niveaux de stress oxydatif chez les RSH sont également plus élevés en comparaison avec les rats WKY. Les EROs ont démontré une grande influence sur la prolifération cellulaire en agissant en tant que second messenger activant par la suite des voies de signalisation essentielles à la prolifération comme la voie des MAPK ou encore la protéine inhibitrice CIK p21^{Cip1} (Boonstra and Post 2004). De plus, les EROs peuvent aussi activer les récepteurs des facteurs de croissance contrôlant encore plus la prolifération (Inoguchi, Sonta et al. 2003).

Une étude récente d'El Andaloussi et al. a montré que les RSH traités par l'agoniste spécifique du NPR-C, le C-ANP₄₋₂₃, ont une diminution de l'hyperprolifération des CMLVs. Cette même étude a montré *in vitro* une diminution d'expression de certaines protéines du cycle

cellulaire (El Andaloussi, Li et al. 2013). Dans une autre étude, le traitement par le C-ANP₄₋₂₃ a inhibé l'apparition de l'hypertension artérielle dans un modèle de RSH pré-hypertendus, et cette inhibition était liée à la diminution des niveaux élevés de stress oxydatif et d'expression des protéines Gαi (Li, Sarkar et al. 2014).

7. Hypothèse et Objectifs

Nous avons montré précédemment que l'activation du récepteur NPR-C induisait une baisse de la pression artérielle. Nous avons également démontré une diminution de la prolifération des CMLVs chez les RSH, par la diminution de l'expression des protéines G α i et de la voie des MAPK/PI3K. Dans cette présente étude, nous avons voulu déterminer les molécules mises en jeu dans l'action du NPR-C dans la diminution de la prolifération des CMLVs des RSH comparativement à celles des WKY.

Nous allons déterminer l'implication des voies signalétiques impliquées dans l'effet antiprolifératif lors de l'injection des RSH par le C-ANP₄₋₂₃. Nous allons également investiguer le rôle des différentes cyclines et CDK dans cette diminution de prolifération. Dans un premier temps, il a été démontré que l'activation du NPR-C diminuait la prolifération cellulaire. Nous voulons donc déterminer si cet effet est dû à une diminution de l'expression des protéines du cycle cellulaire incluant les cyclines A, E, D1 et les cdk2 et cdk4. Le rôle inhibiteur des protéines CIK p21^{Cip1} et p27^{Kip1} dans la prolifération est bien connu. Nous allons donc examiner l'implication de ces protéines dans les effets anti-mitogènes du C-ANP₄₋₂₃. Par la suite, l'inhibition de l'hyper-phosphorylation de ERK/AKT observée chez les RSH a été notée lors de l'activation du NPR-C. Nous allons également déterminer le rôle des récepteurs des facteurs de croissance EGF-R, PDGF-R et IGF-R, du stress oxydatif, de la tyrosine kinase non-récepteur c-Src et de la protéine G α i dans la médiation de l'inhibition de la prolifération cellulaire par le C-ANP₄₋₂₃. Nous émettons l'hypothèse que l'augmentation des peptides vasoactifs endogènes observée chez les RSH est responsable de la transactivation des récepteurs des facteurs de croissance à travers l'augmentation des niveaux d'EROs et d'expression de c-Src qui vont induire une phosphorylation élevée de MAPK/AKT (Figure 9). Tout ceci va contribuer à une

augmentation de l'expression des protéines du cycle cellulaire qui vont aboutir à l'hyperprolifération des CMLVs observée chez les RSH.

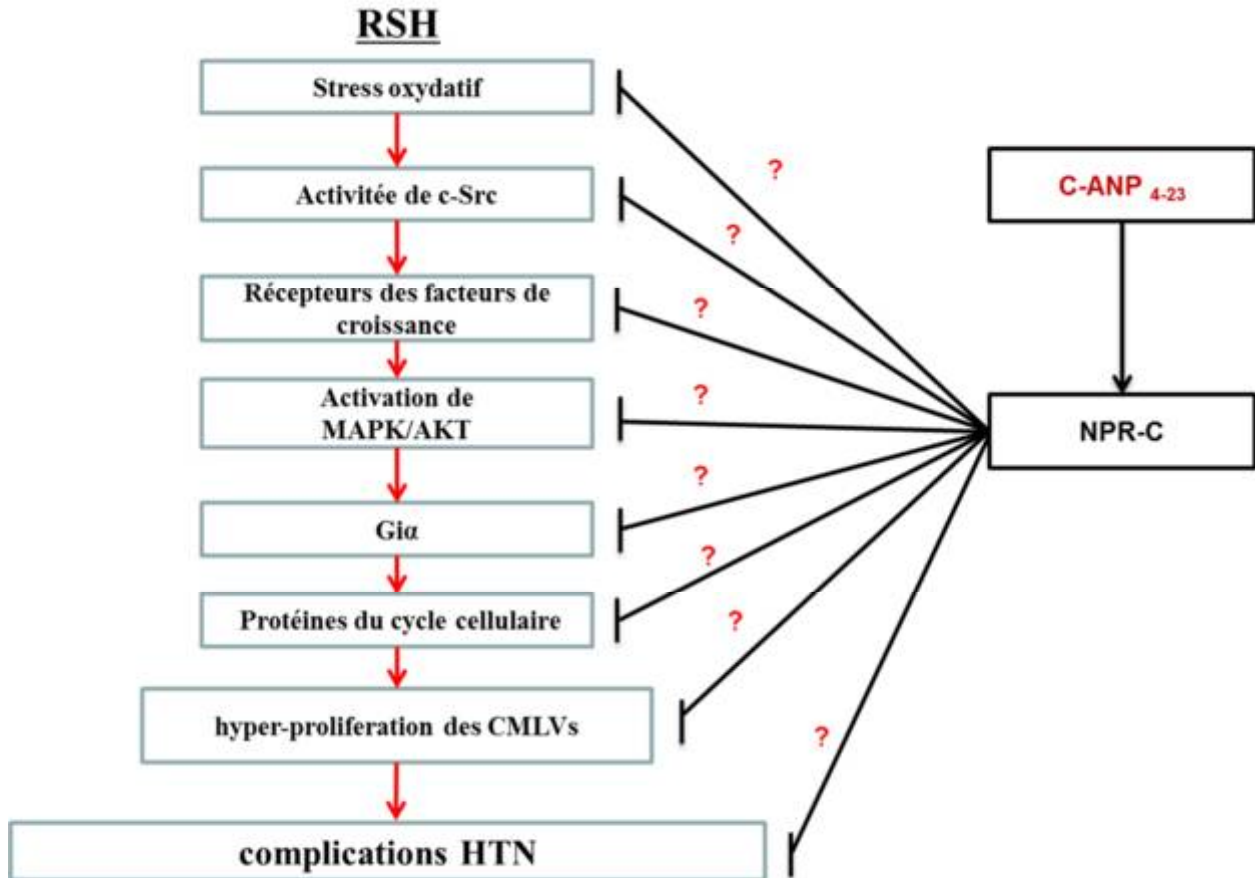


Figure 9 : Schéma illustratif des objectifs.

CHAPITRE II

ARTICLE SCIENTIFIQUE

(Article à être soumis pour publication à *Journal of Hypertension*)

In Vivo Treatment of SHR with Natriuretic Peptide Receptor C Agonist Attenuates
Hyperproliferation of Vascular Smooth Muscle Cells: Molecular Mechanisms

Sofiane Rahali and Madhu B. Anand-Srivastava

Department of Molecular and Integrative Physiology.

Faculty of Medicine, University of Montreal, Quebec, Canada

Correspondence address:

Dr. Madhu B. Anand-Srivastava, Ph.D
Department of Molecular and Integrative Physiology
Faculty of Medicine, University of Montreal
C. P. 6128, succ. Centre-ville
Montréal (Québec) H3C 3J7
Tel : (514) 343-2091
Fax : (514) 343-2111
E-mail: madhu.anand-srivastava@umontreal.ca

ABSTRACT

Vascular remodeling due to hyper-proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) is associated with hypertension. We previously showed that in vivo treatment of spontaneously hypertensive rats (SHR) with NPR-C specific agonist C-ANP₄₋₂₃ attenuates the hyper-proliferation of VSMC. We undertook the present study to investigate if the anti-proliferative effect of C-ANP₄₋₂₃ treatment is mediated through the inhibition of the over-expression of cell cycle proteins and explore the signaling mechanisms contributing to this effect. For this study, two-week-old SHR and age-matched Wistar Kyoto rats (WKY) rats were injected intraperitoneally with C-ANP₄₋₂₃ twice per week for 6 weeks and sacrificed at 9 weeks of age. Blood pressure measurements were done by tail cuff method, proliferation of VSMC was determined by thymidine incorporation and Western blotting was used to measure the levels of proteins. VSMC from SHR exhibited enhanced proliferation as compared to WKY and C-ANP₄₋₂₃ treatment attenuated the hyperproliferation to control levels. In addition, C-ANP₄₋₂₃ restored to control levels the overexpression of cyclin D1, cyclin A, cyclin E, cyclin dependent kinase 2 and 4 (cdk2, cdk4), phosphorylated retinoblastoma protein (pRb, Giα proteins and the decreased expression of p21^{Cip1} and p27^{Kip1} exhibited by VSMC from SHR. Furthermore, the enhanced phosphorylation of ERK1/2, AKT, EGF-R, PDGF-R, IGF-R and c-Src, enhanced levels of superoxide anion (O₂⁻), NADPH oxidase activity, and the enhanced expression of NOX4 and P47^{phox} in SHRs were all attenuated by C-ANP₄₋₂₃ treatment. These results suggest that C-ANP₄₋₂₃-induced attenuation of hyperproliferation of VSMC from SHR may be mediated through its ability to inhibit the enhanced oxidative stress, c-Src and EGF-R, PDGF-R, IGF-R activation, MAPK signaling and over-expression of Giα proteins and cell cycle proteins.

INTRODUCTION

Excessive vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation due to a phenotypic change contributes to vascular remodelling and is considered as one of the major cellular events involved in many VSMC-related pathological conditions, such as atherosclerosis, diabetes and hypertension (Michel, De Roux et al. 1990, Owens, Kumar et al. 2004, Touyz 2005). Hypertension is associated with enhanced cell proliferation (Li, Levesque et al. 2010). We (Bou Daou, Li et al. 2016) and others (Liau and Chan 1989, Kubo, Fukuda et al. 1996) have demonstrated that VSMC from spontaneously hypertensive rats (SHR) exhibit enhanced proliferation compared with age-matched Wistar-Kyoto (WKY) rats. The enhanced levels of endogenous vasoactive peptides including angiotensin II (ANG II) (Fukuda, Satoh et al. 1999, Satoh, Fukuda et al. 2001) and endothelin-1 (ET-1) as well as $G_{i\alpha}$ proteins (Gomez Sandoval and Anand-Srivastava 2011) were shown to contribute to the hyperproliferation of VSMC from SHR through oxidative stress, transactivation of epidermal growth factor receptor (EGF-R) and MAP kinase signaling pathways (Lappas, Daou et al. 2005, Li, Lappas et al. 2007, Li, Levesque et al. 2010).

Natriuretic peptides comprise a family of three peptide hormones; atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), and C-type natriuretic peptide (CNP) (Sudoh, Kangawa et al. 1988, Brenner, Ballermann et al. 1990), produced in mammalian hearts including humans (Levin, Gardner et al. 1998). ANP regulates a variety of physiological functions including blood pressure, progesterone secretion, renin release, vasopressin release, and endothelin release by interacting with receptors on the plasma membrane either to decrease or increase the levels of cAMP or cGMP or to modulate ion channels (Anand-Srivastava, Franks et al. 1984, Hamet, Tremblay et al. 1984, Winquist, Faison et al. 1984, Anand-Srivastava, Cantin et al. 1985, Anand-

Srivastava, Genest et al. 1985, Anand-Srivastava and Cantin 1986, Anand-Srivastava, Vinay et al. 1986).

Three subtypes of natriuretic peptide receptors (NPR): NPR-A, NPR-B and NPR-C have been reported (Anand-Srivastava and Trachte 1993). Natriuretic peptide receptors family comprises 3 members divided into two major groups, NPR-A (Chinkers, Garbers et al. 1989) / NPR-B (Chang, Lowe et al. 1989, Schulz, Singh et al. 1989) and NPR-C (Anand-Srivastava, Srivastava et al. 1987). NPR-A binds ANP and BNP preferentially, while NPR-B is more selective for CNP, NPR-C binds to all three natriuretic peptides, with a 2:1 stoichiometry (He, Chow et al. 2001). NPR-A and NPR-B are membrane guanylyl cyclase receptors whereas NPR-C is coupled to adenylyl cyclase inhibition through inhibitory guanine nucleotide regulatory protein G_i (Anand-Srivastava, Srivastava et al. 1987, Anand-Srivastava, Sairam et al. 1990) or to activation of phospholipase C (Hirata, Chang et al. 1989). However, we showed that NPR-C-mediated decrease in cAMP levels contributes to the activation of PLC signaling and suggested a cross talk between NPR-C-mediated adenylyl cyclase and PLC signaling pathways (Arejian, Li et al. 2009).

A role of NPR-C in cell proliferation through inhibition of MAPK has also been shown (Prins, Weber et al. 1996). The contribution of different cyclins of D type, A and E and cyclin-dependent kinases (CDK) in ANP-mediated inhibition of ET-3-stimulated cell proliferation in astrocytes has also been reported (Pedram, Razandi et al. 1998). We have also shown that C-ANP₄₋₂₃ and small peptide fragments of cytoplasmic domain of NPR-C with G_i activator sequences inhibited vasoactive peptide-induced cell proliferation (Hashim, Li et al. 2006) through $G_i\alpha$ /MAPK/P13K/AKT signaling pathways in VSMC. In addition, C-ANP₄₋₂₃ was also shown to attenuate the enhanced expression of cell cycle proteins, cyclin D1/cdk2/cd4 (G1-S

phase) through MAP kinase/Gi signaling and resulted in the attenuation of the hyperproliferation of VSMC from SHR (El Andaloussi, Li et al. 2013). Furthermore, we recently showed that *In vivo* treatment with C-ANP₄₋₂₃ resulted in the attenuation of the hyperproliferation of VSMC from SHR, however, whether cell cycle proteins and upstream signaling molecules are involved in C-ANP₄₋₂₃-induced antiproliferative effect has not been explored. The present study was therefore undertaken to examine the effect of *In vivo* C-ANP₄₋₂₃ treatment on the enhanced proliferation of VSMC from SHR and the cell cycle protein and to investigate the implication of different signaling molecules including oxidative stress, c-Src, growth factor receptors, MAP kinase/PI3kinase in this process.

MATERIALS AND METHODS

Materials

C-ANP₄₋₂₃ was purchased from Bachem, antibodies against Gia-2 (L5), Gia-3 (C-10), Cyclin D1(DCS-6), cyclin A (C-19), cyclin E (M-20), Cdk2 (D-12), Cdk4 (DCS-35), phospho-specific (Ser249-Thr252) Rb, Rb (IF8), (phospho-specific –Tyr204) ERK1/2 antibody, polyclonal ERK1/2(C-14) antibody, polyclonal phospho-specific (Ser473) AKT antibody, total AKT antibody, polyclonal EGF-R (1005) , polyclonal (phospho)-EGFR (phosphor-specific-tyrosine1173), polyclonal PDGF-R β (958) polyclonal (phospho)-PDGF-R β (phospho-specific-tyrosine 1021), polyclonal IGF-R β (C20) polyclonal (phospho)-IGF-IR (phospho-specific tyrosine 1165/1166), polyclonal p21^{Cip1} (C19) and polyclonal p27^{Kip1} (C19), horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse/anti-rabbit and anti-goat immunoglobulin, were from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, DA, USA) antibodies against Nox4 and p47^{phox} were from EMD Millipore. L-(4,5-3H) thymidine were from Amersham Biosciences (Baie d’Urfé, QC, Canada). All other chemicals were purchased from Sigma Aldrich Canada.

Animal treatment

One-week-old-male spontaneously hypertensive rats (SHR) and age-matched normotensive Wistar-Kyoto (WKY) rats were purchased from Charles River Laboratories Canada (St-Constant, Qc, Canada) . Animals were maintained at room temperature with free access to water and regular rat chow in 12h light -dark cycles. Rats were left for 1 week for adaptation. SHR and WKY rats were divided into 4 groups (Control WKY and SHR and C-ANP₄₋₂₃-treated WKY and SHR) (6 rats/group). Two week-old SHR and age-matched WKY rats were injected intraperitoneally with C-ANP₄₋₂₃ (10 nmol/kg body weight) twice per week for 6 weeks in 0.01 mol/L sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.05 mol/L NaCl as has been done in our

previous experiments (Li, Sarkar et al. 2014). The control WKY rats and SHR received vehicle. The blood pressure was monitored twice a week by tail-cuff method without anesthesia using CODA standard non-invasive blood pressure system. At the end of the 9th week, after taking the blood pressure, the rats were euthanized by decapitation after CO exposure. The thoracic aorta were dissected out and used for cell culture. 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 (protocol #99050). The investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (Guide, NRC 2011).

Cell Culture

Aortic VSMCs from 9-week-old SHRs and WKY rats (control group) and C-ANP₄₋₂₃-treated SHRs and WKY rats were cultured as described previously (Anand-Srivastava, Franks et al. 1982). As reported earlier (Sandoval, Li et al. 2011), these cells were found to contain high levels of smooth-muscle-specific actin. The cells were plated in 75 cm² flasks and incubated at 37 °C in 95% air and 5% CO₂ humidified atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (with glucose, l-glutamine, and sodium bicarbonate) containing antibiotics and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). The cells were passaged upon reaching confluence with 0.5% trypsin containing 0.2% EDTA and utilized between passages 3 and 10. After incubation, the cells were washed three times with PBS and lysed in 30 ml of buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM NaCl, 1 mM Na orthovanadate, 10 mM Na fluoride, 10 mM Na pyrophosphate, 2 mM ethylene, bis(oxyethylenenitrolo)tetracetic acid, 2 mM ethylenediamine tetracetic acid, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mg/ml aprotinin, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS), and 0.5 mg/ml leupeptin) on ice. The cell lysates were

centrifuged at 12,000 g for 5 min at 4°C. Protein concentration was determined by Bradford assay (Bradford 1976).

Western blot analysis

The levels of *Gia-2*, *Gia-3*, cell cycle proteins, ERK1/2, pAKT(Ser473) Nox4, p47^{phox}, c-Src and growth factor receptors were determined by Western blotting using specific antibodies as described previously (Lappas, Daou et al. 2005). Equal amounts of protein (30µg) were subjected to 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), transferred to nitrocellulose membranes and incubated with the respective primary antibodies: *Gia-2* (L5), *Gia-3* (C-10), Cyclin D1(DCS-6), cyclin A (C-19), cyclin E (M-20), Cdk2 (D-12), Cdk4(DCS-35), phospho-specific(Ser249-Thr252) Rb, Rb (IF8), (phospho-specific –Tyr204) ERK1/2 antibody, polyclonal ERK1/2(C-14) antibody, polyclonal phospho-specific (Ser473) AKT antibody, total AKT antibody, polyclonal EGF-R (1005), polyclonal (phospho)-EGFR (phospho-specific tyrosine 1173), polyclonal PDGF-R β (958) polyclonal (phospho)-PDGF-R β (phospho-specific-tyrosine 1021), polyclonal IGF-R β (C20) polyclonal (phospho)-IGF-IR (phospho-specific tyrosine 1165/1166), rabbit polyclonal p21^{Cip1} (No. sc-397; all from Santa Cruz Biotechnology Inc) and rabbit polyclonal p27^{Kip1} (No. sc-528; all from Santa Cruz Biotechnology Inc). The antibody-antigen complexes were detected by second antibody horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse, donkey anti-goat and goat anti-mouse. Protein bands were visualized by enhanced-chemiluminescence. Western blotting detection reagents were from Santa Cruz Biotechnology. Quantitative analysis of specific bands was performed by densitometric scanning of the autoradiographs with an enhanced laser densitometer (LKB Ultrosan XL, Pharmacia, Dorval, Qc, Canada) and quantified by using gel-scan XL evaluation software (version 2.1) from Pharmacia.

Determination of Superoxide anion production and NADPH oxidase activity

Basal superoxide anion production and NADPH oxidase activity in the VSMCs were measured using the lucigenin-enhanced chemiluminescence method with low concentration (5 μ mol/l) of lucigenin as described previously (Lappas, Daou et al. 2005). VSMC from control and C-ANP₄₋₂₃-treated SHR and WKY rats were washed in oxygenated Krebs–Hepes buffer, and placed in scintillation vials containing lucigenin solution, and the emitted luminescence was measured with a liquid scintillation counter (Wallace 1409: Turku, Finland) for 5 min. The average luminescence value was estimated, the background value subtracted and the result was divided by the total wet weight of tissue in each sample. The NADPH oxidase activity in the samples was assessed by adding 10⁻⁴mol/l NADH (Sigma Chemical Co.) in the vials before counting. Basal superoxide- induced luminescence was then subtracted from the luminescence value induced by NADH.

[Methyl-3H]thymidine incorporation

DNA synthesis was evaluated by incorporation of [³H] thymidine into cells. Subconfluent VSMC from control and C-ANP₄₋₂₃ treated SHR and WKY rats were plated in 6-well plates for 24 hrs and were serum deprived for 24 h to induce cell quiescence. [³H] thymidine (1 μ Ci) was added and further incubated for 4 h before the cells were harvested. The cells were rinsed twice with ice-cold PBS and incubated with 5% trichloroacetic acid for 1 h at 4°C. After being washed twice with ice-cold water, the cells were incubated with 0.4 N sodium hydroxide solution for 30 min at room temperature, and radioactivity was determined by liquid scintillation counter. Cell viability was checked by the trypan blue exclusion technique and indicated that >90~95 % cells were viable.

Statistical analysis

The number of independent experiments is reported. Each experiment was conducted at least five times using separate cell population. All data are expressed as the mean \pm SEM. Comparisons between groups were made with one way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett tests using GraphPad Prism5 software. Results were considered significant at a value of $p < 0.05$.

RESULTS

The mean blood pressure (BP) of SHR and WKY rats at 8 weeks were 228 ± 3.5 mmHg and 108 ± 8.1 mmHg respectively. Intraperitoneal injection of C-ANP₄₋₂₃ (10 nmol/kg BW) for six weeks (twice weekly) decreased the BP in SHR to 118 ± 9.8 mmHg without affecting the BP in WKY rats. Values are mean \pm SEM of 6 rats in each group.

Effect of *in vivo* treatment of C-ANP₄₋₂₃ on proliferation of VSMC from SHR.

Fig. 1 shows the effect of *in vivo* treatment of C-ANP₄₋₂₃ on proliferation of VSMC from SHR and WKY rats. As reported earlier (Bou Daou, Li et al. 2016), VSMC from SHR exhibited enhanced proliferation as compared to WKY rats by about 125% as determined by thymidine incorporation and this enhanced proliferation was significantly reduced to control levels by C-ANP₄₋₂₃ treatment. On the other hand, C-ANP₄₋₂₃ treatment did not have any significant effect on the proliferation of VSMC from WKY rats.

Effect of *in vivo* treatment of C-ANP₄₋₂₃ on the overexpression of cell cycle proteins in VSMC from SHR

To investigate if the attenuation of hyperproliferation of VSMC from SHR by *in vivo* treatment with C-ANP₄₋₂₃ is attributed to its ability to attenuate the enhanced expression of cell cycle proteins, the effect of *in vivo* treatment of C-ANP₄₋₂₃ on the expression of cell cycle proteins was examined and the results are shown in Fig. 2. The expression of cyclin D1 (A) and cdk4 proteins (B) was increased by about 80 % and 120% respectively in VSMC from SHR as compared to WKY rats and C-ANP₄₋₂₃ *in vivo* treatment almost completely attenuated the enhanced expression of cyclin D1 and cdk4 proteins to control levels. Furthermore, the expression of cyclin A (C), cyclin E (D) and cdk2 proteins (E) was also enhanced in VSMC from SHR as compared to WKY by about 75 %, 125% and 100 % respectively and C-ANP₄₋₂₃ *in vivo*

treatment attenuated the enhanced expression of cyclin A and cdk2 proteins to WKY control level whereas the enhanced expression of cyclin E proteins was attenuated by about 60 %. On the other hand, C-ANP₄₋₂₃ treatment did not significantly enhance the levels of cyclin E in WKY rats.

In addition, the expression of phosphorylated retinoblastoma protein (pRb) was also increased by 140% in VSMC from SHR and was completely abolished by in vivo C-ANP₄₋₂₃ treatment to control WKY levels (Fig. 3A). Furthermore, the levels of cdk inhibitor proteins p21^{Cip1} (Fig.3B) and p27^{Kip1} (Fig. 3C) that were decreased by about 50 % and 40 % respectively in VSMC from SHR compared to WKY rats were restored to control levels by in vivo C-ANP₄₋₂₃ treatment. On the other hand, C-ANP₄₋₂₃ treatment did not have any significant effect on the levels of these proteins in WKY rats.

Effect of in vivo C-ANP₄₋₂₃ treatment on NADPH oxidase activity and superoxide anion production in VSMC from SHR

Since oxidative stress has been shown to contribute to hyperproliferation of VSMC from SHR (Li, Levesque et al. 2010) and C-ANP₄₋₂₃ attenuates hyperproliferation, it was of interest to investigate if C-ANP₄₋₂₃-induced antiproliferative effect is attributed to its ability to decrease enhanced oxidative stress. To test this, the effect of in vivo treatment of C-ANP₄₋₂₃ on the levels of O₂⁻ and NADPH oxidase activity was determined in VSMC from SHR and aged-matched WKY rats. Results shown in Fig. 4 indicate that the level of O₂⁻ (A) and NADPH oxidase activity (B) were significantly augmented by about 130% and 350 % respectively in VSMC from SHR as compared to WKY rats and C-ANP₄₋₂₃ treatment completely abolished the levels of O₂⁻ production and restored the enhanced NADPH oxidase activity to control levels.

Effect of in vivo C-ANP₄₋₂₃ treatment on the levels of NADPH oxidase subunits p47^{phox} and Nox4 in VSMCs from SHR

Since C-ANP₄₋₂₃ decreased the production of O₂⁻ and NADPH oxidase activity in VSMC from SHR, it was of interest to examine if C-ANP₄₋₂₃-induced decreased O₂⁻ production in VSMC from SHR is associated with the decreased expression of different subunits of NADPH oxidase. To test this, we examined the effect of in vivo C-ANP₄₋₂₃ treatment on the expression of p47^{phox} (A), Nox4 (B), critical subunits involved in NADPH oxidase activation in VSMC from WKY and SHR and the results are shown in Figure 5. As reported earlier (Saha, Li et al. 2008b) the levels of p47^{phox} (A) and Nox4 (B) were significantly enhanced by 90% as compared with WKY rats, and this increase was attenuated to WKY control levels by C-ANP₄₋₂₃ in vivo treatment. On the other hand, this treatment did not affect the expression of p47^{phox} (A) and Nox4 (B) in WKY rats.

Effect of in vivo C-ANP₄₋₂₃ treatment on the enhanced c-Src activation in VSMCs from SHR:

We previously showed the implication of non-receptor tyrosine kinase c-Src in the hyperproliferation of VSMC from SHR (Li, Levesque et al. 2010). To investigate if C-ANP₄₋₂₃-induced antiproliferative effect is mediated to its ability to decrease the activation of c-Src, the effect of in vivo C-ANP₄₋₂₃ treatment on the phosphorylation of c-Src was determined in VSMC from SHR and WKY rats and the results are shown in Fig. 6. As reported earlier (Gomez Sandoval and Anand-Srivastava 2011), the phosphorylation of Tyr⁴¹⁸ on c-Src was significantly augmented by ~75% in VSMC from SHR compared with WKY rats and in vivo C-ANP₄₋₂₃ treatment completely abolished the enhanced phosphorylation of c-Src in VSMC from SHR. On

the other hand, this treatment did not have any significant effect on the phosphorylation of c-Src in WKY rats.

Effect of in vivo C-ANP₄₋₂₃ treatment on the enhanced phosphorylation of growth factor receptors in VSMC from SHR

Since the enhanced activation of growth factor receptors reported in VSMC from SHR (Sandoval, Li et al. 2011) was shown to contribute to increased proliferation of VSMC from SHR (Li, Levesque et al. 2010), it was of interest to investigate if the antiproliferative effect of *in vivo* C-ANP₄₋₂₃ treatment was also attributed to its ability to attenuate the enhanced activation of growth factor receptors. To examine this, the effect of *in vivo* C-ANP₄₋₂₃ treatment on the phosphorylation of EGF-R, PDG-R and IGF-R was investigated. Results shown in Fig. 7 indicate that the levels of phosphorylated EGF-R(A) PDGF-R(B) and IGF-R(C) were increased by about 55% , 155% and 125% respectively and that *in vivo* C-ANP₄₋₂₃ treatment attenuated the enhanced phosphorylation of PDGF-R and IGF-R by about 85% whereas the enhanced phosphorylation of EGF-R was restored to WKY control levels. On the other hand, *in vivo* C-ANP₄₋₂₃ treatment did not affect the basal phosphorylation of these growth factor receptors in VSMC from WKY rats.

Effect of in vivo C-ANP₄₋₂₃ treatment on the enhanced phosphorylation of ERK1/2 and Akt in VSMC from SHR

We previously showed that VSMC from SHR exhibit enhanced phosphorylation of ERK1/2 and AKT (Bou Daou, Li et al. 2016) that is implicated in enhanced expression of cell cycle proteins (El Andaloussi, Li et al. 2013) and hyperproliferation of VSMC from SHR (Li, Levesque et al. 2010). To investigate if the attenuation of hyperproliferation of VSMC from SHR by *in vivo* C-ANP₄₋₂₃ treatment is attributed to its ability to inhibit the enhanced activation of

MAPK/PI3 kinase pathways, we examined the effect of *in vivo* C-ANP₄₋₂₃ treatment on the levels of phosphorylated ERK1/2 and AKT in VSMC from SHR and the results are shown in Fig. 8. As reported earlier (Bou Daou, Li et al. 2016) the phosphorylation levels of ERK1/2 (A) as well as AKT (B) were increased by about 140% and 70% respectively in VSMC from SHR as compared to WKY and *in vivo* C-ANP₄₋₂₃ treatment almost completely abolished the enhanced phosphorylation of AKT whereas about 75% inhibition of ERK1/2 phosphorylation was observed. On the other hand, this treatment did not affect the basal phosphorylation of AKT and ERK1/2 in VSMC from WKY rats.

Effect of *in vivo* C-ANP₄₋₂₃ treatment on the levels of Gi proteins in VSMC from SHR:

The enhanced expression of Gi proteins and cell cycle proteins has been implicated in hyperproliferation of VSMC from SHR (Kubo, Fukuda et al. 2000, Li, Levesque et al. 2010, Gomez Sandoval and Anand-Srivastava 2011, El Andalousi, Li et al. 2013). Therefore, to investigate if the attenuation of enhanced expression of cell cycle proteins and hyperproliferation of VSMC from SHR induced by *in vivo* C-ANP₄₋₂₃ treatment is attributed to its ability to decrease the enhanced expression of Gi proteins, we examined the effect of *in vivo* C-ANP₄₋₂₃ treatment on the levels of Gi α -2 and Gi α -3 proteins in VSMC from SHR and WKY rats and the results are shown in Fig. 9. As reported earlier (Lappas, Daou et al. 2005, Hashim, Li et al. 2006, El Andalousi, Li et al. 2013), the levels of Gi α 2 (A) and Gi α 3 (B) were augmented by about 110% and 75% respectively in VSMC from SHR as compared to WKY rats and *in vivo* C-ANP₄₋₂₃ treatment restored the enhanced levels of Gi proteins to WKY control levels. These data suggest that C-ANP₄₋₂₃-induced decreased expression of Gi proteins may contribute to the attenuation of the enhanced expression of cell cycle components and resultant attenuated hyperproliferation of VSMC from SHR.

DISCUSSION

We earlier showed that NPR-C activation by C-ANP₄₋₂₃, attenuated the hyperproliferation of VSMC from SHR through its ability to decrease the enhanced expression of G₁α proteins and cell cycle proteins (El Andaloussi, Li et al. 2013). However, in the present study we show for the first time that *in vivo* treatment of SHR with C-ANP₄₋₂₃ attenuates the hyperproliferation of VSMC due to its ability to decrease the enhanced expression of cell cycle proteins from G₁-phase and to restore the decreased levels of cyclin kinase inhibitors p21^{Cip1} and p27^{Kip1} as well as ROS and ROS-mediated signaling pathways implicated in the regulation of VSMC proliferation.

Our results showing that *in vivo* C-ANP₄₋₂₃ treatment reduced the levels of enhanced cell cycle proteins and also restored the decrease levels of CDK inhibitors p21^{Cip1} and p27^{Kip1} suggest that C-ANP₄₋₂₃-induced antiproliferative effect may be attributed to its ability to attenuate the enhanced expression of cell cycle proteins and to restore the decreased expression of cdk inhibitors p21^{Cip1} and p27^{Kip1}. In this regard, a role of cell cycle proteins and associated kinases in the regulation of cell proliferation is well documented (Tanner, Greutert et al. 2003). These results are in agreement with our earlier studies showing that C-ANP₄₋₂₃ treatment of VSMC from SHR for 24 hrs resulted in the attenuation of enhanced expression of cell cycle proteins (El Andaloussi, Li et al. 2013).

Oxidative stress is now widely recognised as being a critical player in the pathogenesis of cardiovascular disease including hypertension (Griendling and Alexander 1997, Lappas, Daou et al. 2005, Gomez Sandoval and Anand-Srivastava 2011). We earlier showed that VSMC from SHR exhibit enhanced oxidative stress due to enhanced levels of O₂⁻, NADPH oxidase activity and overexpression of NADPH oxidase subunits (Li, Sarkar et al. 2014). The implication of enhanced oxidative stress in hyperproliferation of VSMC from SHR was supported by the study

showing that treatment of VSMC from SHR with antioxidants attenuated the hyperproliferation of VSMC (Bou Daou, Li et al. 2016). In addition, H_2O_2 , that increases oxidative stress was also shown to enhance the proliferation of VSMC (Mbong and Anand-Srivastava 2012). In this study, we demonstrate that *in vivo* C-ANP₄₋₂₃ treatment of SHR attenuated the enhanced levels of O_2^- production, NADPH oxidase activity as well as NADPH oxidase subunits p47^{phox} and Nox4 in VSMC. Taken together, it may be suggested that C-ANP₄₋₂₃ attenuates hyperproliferation of VSMC from SHR through its ability to decrease oxidative stress. In this regard, a role of C-ANP₄₋₂₃ as an antioxidant has been shown previously (Saha, Li et al. 2008b).

We also examined the implication of downstream signaling molecules of oxidative stress in C-ANP₄₋₂₃-induced attenuation of hyperproliferation of VSMC from SHR. Oxidative stress through c-Src, growth factor receptor transactivation and MAP kinase signaling has been shown to enhance the expression of G α proteins (Sandoval, Li et al. 2011), which through augmenting the levels of cell cycle proteins enhances the proliferation of VSMC in SHR (El Andaloussi, Li et al. 2013). Consistent with the study reported earlier (Gusan and Anand-Srivastava 2013), the activation (phosphorylation) of c-Src was enhanced in VSMC from SHR as compared to WKY rats, however, we demonstrate for the first time that *in vivo* treatment of SHR with C-ANP₄₋₂₃ that exerted antiproliferative effect, also attenuated the enhanced activation of c-Src in VSMC from SHR, suggesting that the antiproliferative effect of NPR-C activation by *in vivo* treatment with C-ANP₄₋₂₃ may also involve c-Src activation.

Growth factor receptors are expressed in VSMC and their activation has been shown to promote cell proliferation (Hamet, Hadrava et al. 1988, Satoh, Fukuda et al. 2001). We earlier showed the implication of enhanced activation of growth factor receptors in hyperproliferation of VSMC from SHR (Gomez Sandoval, Levesque et al. 2009). In addition, we also showed that

growth factor receptor activation is the downstream signaling of c-Src because PP2_i; an inhibitor of c-Src attenuated the activation of growth factor receptors in VSMC from SHR (Gomez Sandoval and Anand-Srivastava 2011). In the present study, we show for the first time that *in vivo* treatment of SHR with C-ANP₄₋₂₃ also attenuated the enhanced phosphorylation of EGF-R, PDGF-R and IGF-R in VSMC from SHR and suggest that the antiproliferative effect of C-ANP₄₋₂₃ may also be attributed to its ability to attenuate the enhanced activation of growth factor receptors.

Several studies have shown the implication of MAP kinase and PI3-kinase in cell proliferation (Varticovski, Harrison-Findik et al. 1994, Seger and Krebs 1995). In addition, the hyperproliferation of VSMC from SHR was also shown to be attributed to the augmented activity of MAP kinase and PI3kinase (Molloy, Taylor et al. 1993, Saward and Zahradka 1997, Hashim, Li et al. 2006). In the present study, we report that *in vivo* treatment of SHR with C-ANP₄₋₂₃ attenuated the enhanced phosphorylation of ERK1/2 as well as AKT in VSMC from SHR and suggest that the antiproliferative effect of C-ANP₄₋₂₃ *in vivo* treatment may also be mediated through the inhibition of enhanced activity of MAP kinase and PI3 kinase pathways. Our results are in agreement with the earlier studies showing that small peptide fragments of cytoplasmic domain of NPR-C attenuated the vasoactive peptide-induced enhanced proliferation via MAP kinase /PI3kinase signaling in A10 cells (Hashim, Li et al. 2006). In addition, the implication of MAP kinase/PI3-kinase/AKT signaling pathways in C-ANP₄₋₂₃-induced attenuation of enhanced expression of cell cycle proteins and hyperproliferation of VSMC from SHR was also shown (El Andalousi, Li et al. 2013). Taken together, it may be suggested that C-ANP₄₋₂₃-mediated attenuation of MAP kinase and PI3kinase activation in VSMC from SHR

decreases the enhanced expression of cell cycle proteins and resultant decreased cell proliferation.

The involvement of $G_{i\alpha}$ proteins in the regulation of cell proliferation has been shown (Moxham, Hod et al. 1993, McKillop, Schmidt et al. 1999). Suppression of $G_{i\alpha}$ -2 in the liver and fat of transgenic mice was associated with a dramatic reduction in neonatal growth (McKillop, Schmidt et al. 1999). In addition, hepatocellular carcinoma cells that had increased expression of $G_{i\alpha}$ proteins showed increased proliferation (McKillop, Schmidt et al. 1999). Furthermore, immortalized lymphoblasts derived from lymphocytes from hypertensive patients have been shown to exhibit an enhanced activation of pertussis toxin (PT)-sensitive G protein (Siffert, Roszkopf et al. 1995), enhanced proliferation, and enhanced activity of Na^+/K^+ exchanger isoform (NHE-1) (Roszkopf, Fromter et al. 1993). By using pertussis toxin that inactivates $G_{i\alpha}$ proteins and siRNA of $G_{i\alpha}$ proteins, we also showed the implication of enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins in hyperproliferation of VSMC from SHR (Bou Daou, Li et al. 2016). In addition, the role of $G_{i\alpha}$ proteins in the enhanced expression of cell cycle proteins and hyperproliferation of VSMC from SHR has also been shown (El Andaloussi, Li et al. 2013, Bou Daou, Li et al. 2016). The fact that *in vivo* C-ANP₄₋₂₃ treatment of SHR also inhibited the enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins and hyperproliferation of VSMC from SHR suggests that the inhibition of enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins through decreasing the enhanced levels of cell cycle proteins contributes to the antihyperproliferative effect of C-ANP₄₋₂₃. However, the activation of NPR-C by C-ANP₄₋₂₃ and resultant decreased levels of intracellular cAMP (Anand-Srivastava, Srivastava et al. 1987, Anand-Srivastava, Sairam et al. 1990) may not be the underlying mechanism contributing to the antiproliferative effect of C-ANP₄₋₂₃, because the decreased levels of cAMP have been reported to cause hyperproliferation of the cells (Schmidt, McKillop

et al. 1999, Hayashi, Morishita et al. 2000). This notion is supported by the studies of other investigators who have also shown that C-ANP₄₋₂₃ inhibits cell proliferation by cAMP-independent mechanism (Prins, Weber et al. 1996).

In conclusion, we have shown that *in vivo* treatment of SHR with C-ANP₄₋₂₃ through the attenuation of enhanced oxidative stress, c-Src and growth factor receptor activation, over expression of Gi α proteins, inhibition of MAP kinase and AKT activation inhibits the enhanced expression of cell cycle proteins and results in the inhibition of hyperproliferation of VSMC. Based on these findings, it may be suggested that C-ANP₄₋₂₃ could be used as a potential therapeutic agent in the treatment of vascular complications associated with hypertension and other cardiovascular pathologies.

Sources of Funding:

This project was supported by fund from the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC).

Disclosures & conflict of interest: None declared.

REFERENCES:

- Anand-Srivastava, M. B. and M. Cantin (1986). "Atrial natriuretic factor receptors are negatively coupled to adenylate cyclase in cultured atrial and ventricular cardiocytes." Biochem Biophys Res Commun **138**(1): 427-436.
- Anand-Srivastava, M. B., M. Cantin and J. Genest (1985). "Inhibition of pituitary adenylate cyclase by atrial natriuretic factor." Life Sci **36**(19): 1873-1879.
- Anand-Srivastava, M. B., D. J. Franks, M. Cantin and J. Genest (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**(1): 213-219.
- Anand-Srivastava, M. B., D. J. Franks, M. Cantin and J. Genest (1984). "Atrial natriuretic factor inhibits adenylate cyclase activity." Biochem Biophys Res Commun **121**(3): 855-862.
- Anand-Srivastava, M. B., J. Genest and M. Cantin (1985). "Inhibitory effect of atrial natriuretic factor on adenylate cyclase activity in adrenal cortical membranes." FEBS Lett **181**(2): 199-202.
- Anand-Srivastava, M. B., M. R. Sairam and M. Cantin (1990). "Ring-deleted analogs of atrial natriuretic factor inhibit adenylate cyclase/cAMP system. Possible coupling of clearance atrial natriuretic factor receptors to adenylate cyclase/cAMP signal transduction system." J Biol Chem **265**(15): 8566-8572.
- Anand-Srivastava, M. B., A. K. Srivastava and M. Cantin (1987). "Pertussis toxin attenuates atrial natriuretic factor-mediated inhibition of adenylate cyclase. Involvement of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein." J Biol Chem **262**(11): 4931-4934.
- Anand-Srivastava, M. B. and G. J. Trachte (1993). "Atrial natriuretic factor receptors and signal transduction mechanisms." Pharmacol Rev **45**(4): 455-497.

- Anand-Srivastava, M. B., P. Vinay, J. Genest and M. Cantin (1986). "Effect of atrial natriuretic factor on adenylate cyclase in various nephron segments." Am J Physiol **251**(3 Pt 2): F417-423.
- Arejian, M., Y. Li and M. B. Anand-Srivastava (2009). "Nitric oxide attenuates the expression of natriuretic peptide receptor C and associated adenylyl cyclase signaling in aortic vascular smooth muscle cells: role of MAPK." Am J Physiol Heart Circ Physiol **296**(6): H1859-1867.
- Bou Daou, G., Y. Li and M. B. Anand-Srivastava (2016). "Enhanced expression of G α proteins contributes to the hyperproliferation of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats via MAP kinase- and PI3 kinase-independent pathways." Can J Physiol Pharmacol **94**(1): 49-58.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brenner, B. M., B. J. Ballermann, M. E. Gunning and M. L. Zeidel (1990). "Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide." Physiol Rev **70**(3): 665-699.
- Chang, M. S., D. G. Lowe, M. Lewis, R. Hellmiss, E. Chen and D. V. Goeddel (1989). "Differential activation by atrial and brain natriuretic peptides of two different receptor guanylate cyclases." Nature **341**(6237): 68-72.
- Chinkers, M., D. L. Garbers, M. S. Chang, D. G. Lowe, H. M. Chin, D. V. Goeddel and S. Schulz (1989). "A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor." Nature **338**(6210): 78-83.
- El Andaloussi, J., Y. Li and M. B. Anand-Srivastava (2013). "Natriuretic peptide receptor-C agonist attenuates the expression of cell cycle proteins and proliferation of vascular smooth

muscle cells from spontaneously hypertensive rats: role of Gi proteins and MAPkinase/PI3kinase signaling." PLoS One **8**(10): e76183.

Fukuda, N., C. Satoh, W. Y. Hu, M. Soma, A. Kubo, H. Kishioka, Y. Watanabe, Y. Izumi and K. Kanmatsuse (1999). "Production of angiotensin II by homogeneous cultures of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(5): 1210-1217.

Gomez Sandoval, Y. H. and M. B. Anand-Srivastava (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." Cell Signal **23**(2): 354-362.

Gomez Sandoval, Y. H., L. O. Levesque and M. B. Anand-Srivastava (2009). "Contribution of epidermal growth factor receptor transactivation in angiotensin II-induced enhanced expression of Gi protein and proliferation in A10 vascular smooth muscle cells." Can J Physiol Pharmacol **87**(12): 1037-1045.

Griendling, K. K. and R. W. Alexander (1997). "Oxidative stress and cardiovascular disease." Circulation **96**(10): 3264-3265.

Gusan, S. and M. B. Anand-Srivastava (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." Am J Physiol Cell Physiol **304**(12): C1198-1209.

Hamet, P., V. Hadrava, U. Kruppa and J. Tremblay (1988). "Vascular smooth muscle cell hyper-responsiveness to growth factors in hypertension." J Hypertens Suppl **6**(4): S36-39.

Hamet, P., J. Tremblay, S. C. Pang, R. Garcia, G. Thibault, J. Gutkowska, M. Cantin and J. Genest (1984). "Effect of native and synthetic atrial natriuretic factor on cyclic GMP." Biochem Biophys Res Commun **123**(2): 515-527.

- Hashim, S., Y. Li and M. B. Anand-Srivastava (2006). "Small cytoplasmic domain peptides of natriuretic peptide receptor-C attenuate cell proliferation through G α protein/MAP kinase/PI3-kinase/AKT pathways." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(6): H3144-3153.
- Hayashi, S., R. Morishita, H. Matsushita, H. Nakagami, Y. Taniyama, T. Nakamura, M. Aoki, K. Yamamoto, J. Higaki and T. Ogihara (2000). "Cyclic AMP inhibited proliferation of human aortic vascular smooth muscle cells, accompanied by induction of p53 and p21." Hypertension **35**(1 Pt 2): 237-243.
- He, X., D. Chow, M. M. Martick and K. C. Garcia (2001). "Allosteric activation of a spring-loaded natriuretic peptide receptor dimer by hormone." Science **293**(5535): 1657-1662.
- Hirata, M., C. H. Chang and F. Murad (1989). "Stimulatory effects of atrial natriuretic factor on phosphoinositide hydrolysis in cultured bovine aortic smooth muscle cells." Biochim Biophys Acta **1010**(3): 346-351.
- Kubo, A., N. Fukuda, M. Soma, Y. Izumi and K. Kanmatsuse (1996). "Inhibitory effect of an angiotensin II type 1 receptor antagonist on growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats." J Cardiovasc Pharmacol **27**(1): 58-63.
- Kubo, A., N. Fukuda, J. Teng, C. Satoh, M. Nakayama, H. Kishioka and K. Kanmatsuse (2000). "Angiotensin II regulates the cell cycle of vascular smooth muscle cells from SHR." Am J Hypertens **13**(10): 1117-1124.
- Lappas, G., G. B. Daou and M. B. Anand-Srivastava (2005). "Oxidative stress contributes to the enhanced expression of G α proteins and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats." J Hypertens **23**(12): 2251-2261.
- Levin, E. R., D. G. Gardner and W. K. Samson (1998). "Natriuretic peptides." N Engl J Med **339**(5): 321-328.

- Li, Y., G. Lappas and M. B. Anand-Srivastava (2007). "Role of oxidative stress in angiotensin II-induced enhanced expression of Gi(alpha) proteins and adenylyl cyclase signaling in A10 vascular smooth muscle cells." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(4): H1922-1930.
- Li, Y., L. O. Levesque and M. B. Anand-Srivastava (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**(6): H1959-1967.
- Li, Y., O. Sarkar, M. Brochu and M. B. Anand-Srivastava (2014). "Natriuretic peptide receptor-C attenuates hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of nitroxidative stress and Gi proteins." Hypertension **63**(4): 846-855.
- Liau, G. and L. M. Chan (1989). "Regulation of extracellular matrix RNA levels in cultured smooth muscle cells. Relationship to cellular quiescence." J Biol Chem **264**(17): 10315-10320.
- Mbong, N. and M. B. Anand-Srivastava (2012). "Hydrogen peroxide enhances the expression of G1alpha proteins in aortic vascular smooth cells: role of growth factor receptor transactivation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **302**(8): H1591-1602.
- McKillop, I. H., C. M. Schmidt, P. A. Cahill and J. V. Sitzmann (1999). "Inhibitory guanine nucleotide regulatory protein activation of mitogen-activated protein kinase in experimental hepatocellular carcinoma in vitro." Eur J Gastroenterol Hepatol **11**(7): 761-768.
- Michel, J. B., N. De Roux, D. Plissonnier, S. Anidjar, J. L. Salzman and B. Levy (1990). "Pathophysiological role of the vascular smooth muscle cell." J Cardiovasc Pharmacol **16** Suppl 1: S4-11.

- Molloy, C. J., D. S. Taylor and H. Weber (1993). "Angiotensin II stimulation of rapid protein tyrosine phosphorylation and protein kinase activation in rat aortic smooth muscle cells." J Biol Chem **268**(10): 7338-7345.
- Moxham, C. M., Y. Hod and C. C. Malbon (1993). "Induction of G alpha i2-specific antisense RNA in vivo inhibits neonatal growth." Science **260**(5110): 991-995.
- Owens, G. K., M. S. Kumar and B. R. Wamhoff (2004). "Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease." Physiol Rev **84**(3): 767-801.
- Pedram, A., M. Razandi, R. M. Hu and E. R. Levin (1998). "Astrocyte progression from G1 to S phase of the cell cycle depends upon multiple protein interaction." J Biol Chem **273**(22): 13966-13972.
- Prins, B. A., M. J. Weber, R. M. Hu, A. Pedram, M. Daniels and E. R. Levin (1996). "Atrial natriuretic peptide inhibits mitogen-activated protein kinase through the clearance receptor. Potential role in the inhibition of astrocyte proliferation." J Biol Chem **271**(24): 14156-14162.
- Roskopf, D., E. Fromter and W. Siffert (1993). "Hypertensive sodium-proton exchanger phenotype persists in immortalized lymphoblasts from essential hypertensive patients. A cell culture model for human hypertension." J Clin Invest **92**(5): 2553-2559.
- Saha, S., Y. Li, G. Lappas and M. B. Anand-Srivastava (2008). "Activation of natriuretic peptide receptor-C attenuates the enhanced oxidative stress in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats: implication of Galpha protein." J Mol Cell Cardiol **44**(2): 336-344.
- Sandoval, Y. H., Y. Li and M. B. Anand-Srivastava (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." Cell Signal **23**(11): 1716-1726.
- Satoh, C., N. Fukuda, W. Y. Hu, M. Nakayama, H. Kishioka and K. Kanmatsuse (2001). "Role of endogenous angiotensin II in the increased expression of growth factors in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats." J Cardiovasc Pharmacol **37**(1): 108-118.
- Saward, L. and P. Zahradka (1997). "Angiotensin II activates phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells." Circ Res **81**(2): 249-257.
- Schmidt, C. M., I. H. McKillop, P. A. Cahill and J. V. Sitzmann (1999). "The role of cAMP-MAPK signalling in the regulation of human hepatocellular carcinoma growth in vitro." Eur J Gastroenterol Hepatol **11**(12): 1393-1399.
- Schulz, S., S. Singh, R. A. Bellet, G. Singh, D. J. Tubb, H. Chin and D. L. Garbers (1989). "The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family." Cell **58**(6): 1155-1162.
- Seger, R. and E. G. Krebs (1995). "The MAPK signaling cascade." FASEB J **9**(9): 726-735.
- Siffert, W., D. Roskopf, A. Moritz, T. Wieland, S. Kaldenberg-Stasch, N. Kettler, K. Hartung, S. Beckmann and K. H. Jakobs (1995). "Enhanced G protein activation in immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension." J Clin Invest **96**(2): 759-766.
- Sudoh, T., K. Kangawa, N. Minamino and H. Matsuo (1988). "A new natriuretic peptide in porcine brain." Nature **332**(6159): 78-81.
- Tanner, F. C., H. Greutert, C. Barandier, K. Frischknecht and T. F. Luscher (2003). "Different cell cycle regulation of vascular smooth muscle in genetic hypertension." Hypertension **42**(2): 184-188.

Touyz, R. M. (2005). "Endothelial cell IL-8, a new target for adiponectin: implications in vascular protection." Circ Res **97**(12): 1216-1219.

Varticovski, L., D. Harrison-Findik, M. L. Keeler and M. Susa (1994). "Role of PI 3-kinase in mitogenesis." Biochim Biophys Acta **1226**(1): 1-11.

Winqvist, R. J., E. P. Faison, S. A. Waldman, K. Schwartz, F. Murad and R. M. Rapoport (1984). "Atrial natriuretic factor elicits an endothelium-independent relaxation and activates particulate guanylate cyclase in vascular smooth muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(23): 7661-7664.

FIGURES AND LEGENDS

Figure 1: Effect of in vivo C-Atrial Natriuretic peptide (ANP)₄₋₂₃ treatment on DNA synthesis in VSMC from SHR and WKY. Two-week old SHR and age-matched WKY rats (control) were injected intraperitoneally with C-ANP₄₋₂₃ (10 nmol/Kg of body weight) twice weekly up to 6 weeks as described in “Materials and Methods”. After 6 weeks of treatment, the BP was measured, and the rats were sacrificed at 9 week-old of age. Aortic VSMC from SHR and age-matched WKY (control groups) and C-ANP₄₋₂₃ treated groups were cultured and thymidine incorporation was determined as described in “Methods”. Results are expressed as % of WKY CTL, taken as 100%. Values are means \pm SEM of 6 separate experiments ***P<0.001, ###P<0.001.

Figure 2: Effect of in vivo C-Atrial Natriuretic peptide (ANP)₄₋₂₃ treatment on the expression of cell cycle proteins in VSMC from SHR and WKY. VSMC lysates from aorta of 9-week-old spontaneously hypertensive rats (SHRs) and Wistar-Kyoto (WKY) rats with or without C-ANP₄₋₂₃ treatment were subjected to Western blotting using specific antibodies against cyclin D1 (A), cdk4 (B), cyclin A (C), cyclin E (D) and cdk2 (E) as described in “Materials and Methods”. Dynein was used as a loading control. The proteins were quantified by densitometric scanning as described in materials and methods. Results are expressed as % of WKY CTL, taken as 100%. Results are expressed as % of WKY CTL taken as 100%. Values are means \pm SEM of 6 separate experiments. **P<0.01, ***P<0.001, ##P<0.01, ###P<0.001.

Figure 3: Effect in vivo C-ANP₄₋₂₃ treatment on the levels of pRb, p21 and p27 proteins. Cell lysate of VSMC from spontaneously hypertensive rats (SHRs) and Wistar-Kyoto (WKY) rats that were injected or not with C-ANP₄₋₂₃ treatment were used for western blotting as described in “Materials and Methods”. β -actin was used as the loading control. The proteins

were quantified by densitometric scanning as described in materials and methods. Results are expressed as % of WKY CTL, taken as 100%. Values are means \pm SEM of 6 separate experiments *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001.

Figure 4: Effect of in vivo C-ANP₄₋₂₃ treatment on NADPH oxidase activity and O₂⁻ production. O₂⁻ production (A) and NADPH oxidase activity (B) were determined in Aortic VSMC from SHRs and WKY that were injected or not with C-ANP₄₋₂₃ treatment as described in “Materials and Methods”. Results are expressed as % of WKY CTL, taken as 100%. Values are means \pm SEM of 6 separate experiments. ***P<0.001, ###P<0.001.

Figure 5: Effect of in vivo C-Atrial Natriuretic peptide (ANP)₄₋₂₃ treatment on the enhanced levels of NADPH oxidase subunits p47^{phox} and Nox4 in VSMC from SHR and WKY. VSMC lysates from aorta of 9-week-old SHR and WKY rats with or without C-ANP₄₋₂₃ treatment were subjected to Western blotting using specific antibodies against P47^{phox} (A) and NOX4 (B). Dynein was used as a loading control. The proteins were quantified by densitometric scanning as described in “Materials and Methods”. Results are expressed as % of WKY CTL, taken as 100%. Values are means \pm SEM of 6 separate experiments. **P<0.01, ##P<0.01.

Figure 6: Effect of in vivo C-ANP₄₋₂₃ treatment on c-Src activation in VSMC from SHR. VSMC lysates from aorta of 9-week-old SHR and WKY rats with or without C-ANP₄₋₂₃ treatment were subjected to Western blotting using specific antibodies against (phospho)-c-Src (top) and c-Src as described in “Materials and Methods”. The proteins were quantified by densitometric scanning as described in materials and methods. Results are expressed as % of WKY CTL, taken as 100%. Values are means \pm SEM of 6 separate experiments. ***P<0.001, ###P<0.001.

Figure 7: Effect of in vivo C- ANP₄₋₂₃ treatment on the hyperphosphorylation of epidermal growth factor receptor (EGF-R), Platelet derived growth factor receptor (PDGF-R) and Insulin growth factor receptor (IGF-R) in VSMC from SHR. VSMC lysates from aorta of 9-week-old SHR and WKY rats with or without C-ANP₄₋₂₃ treatment were subjected to Western blotting using specific antibodies against pEGFR/EGFR(A), pPDGFR/PDGFR(B) and pIGF-1R/IGF-1R(C). The proteins were quantified by densitometric scanning as described in “Materials and Methods”. Results are expressed as % of WKY CTL, taken as 100%. Values are means \pm SEM of 6 separate experiments. *P<0.05, **P<0.01, #P<0.05, ##P<0.01.

Figure 8: Effect of in vivo C-ANP₄₋₂₃ treatment on the enhanced phosphorylation of Extracellular signal-regulated kinase ERK1/2 and AKT in VSMC from SHR. VSMC lysates from aorta of 9-week-old SHR and WKY rats with or without C-ANP₄₋₂₃ treatment were subjected to Western blotting using specific antibodies against pERK1/2/ERK1/2(A) and pAKT/AKT(B) as described in “Materials and Methods”. Results are expressed as % of WKY CTL taken as 100%. Values are means \pm SEM of 6 separate experiments. **P<0.01, ###P<0.01.

Figure 9: effect of in vivo Natriuretic Peptide type C activation on the augmented levels of Gi α 2 and Gi α 3 in VSMC from SHR. VSMC lysates from aorta of 9-week-old SHR and WKY rats with or without C-ANP₄₋₂₃ treatment were subjected to Western blotting using specific antibodies against Gi α -2 (A) and Gi α -3 (B) as described in “Materials and Methods”. Dynein was used as a loading control. The protein bands were quantified by densitometric scanning. The results are expressed as ratio of Gi protein/Dynein of WKY taken as 100%. Values are mean \pm SEM of 6 separate experiments. **P<0.01, ***P<0.001, ##P<0.01, ###P<0.001.

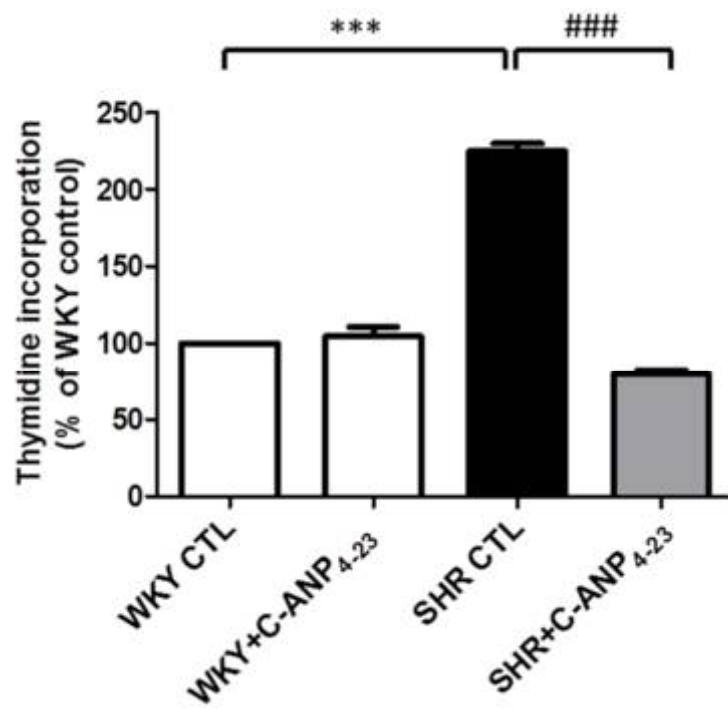


FIGURE 1

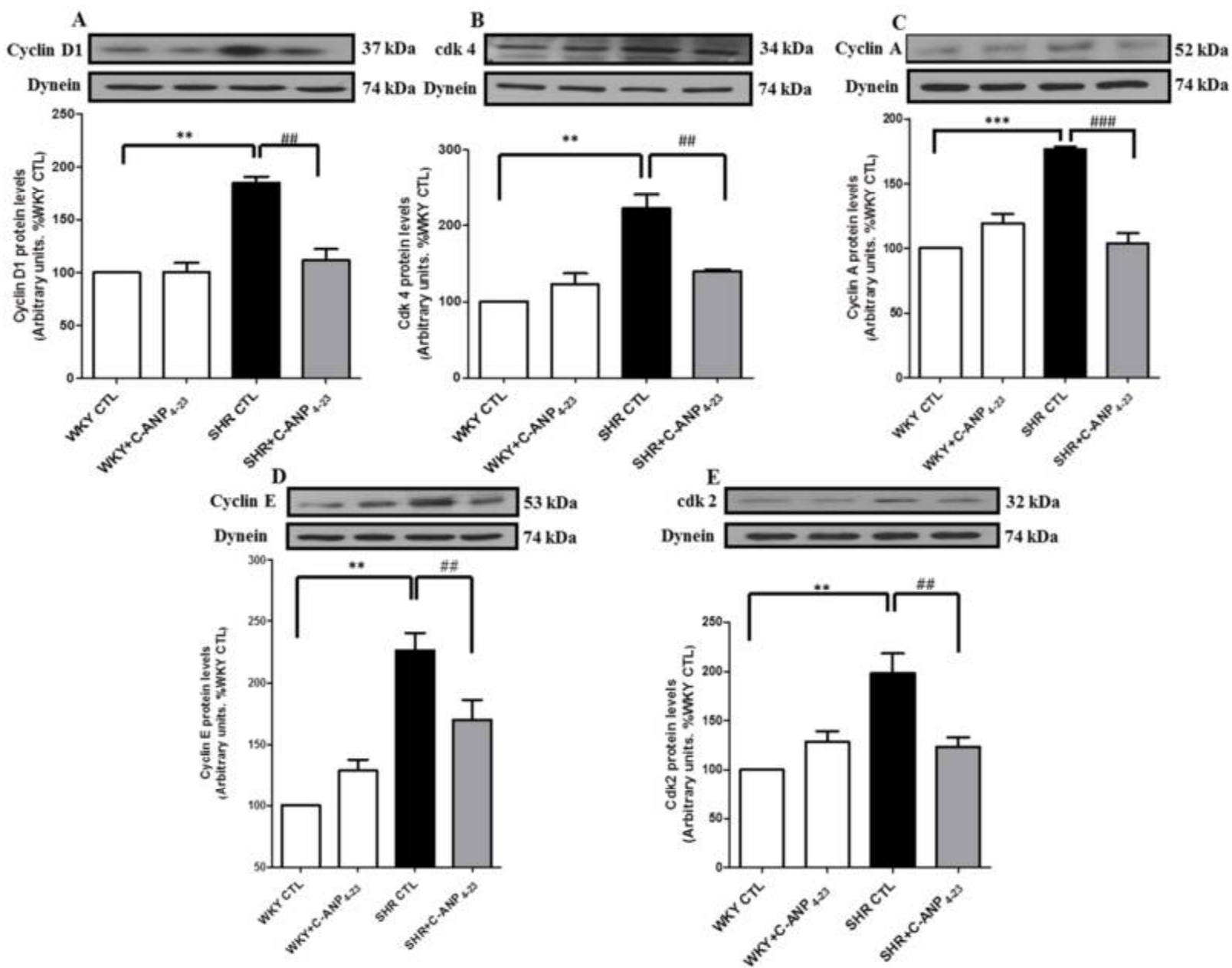


FIGURE 2

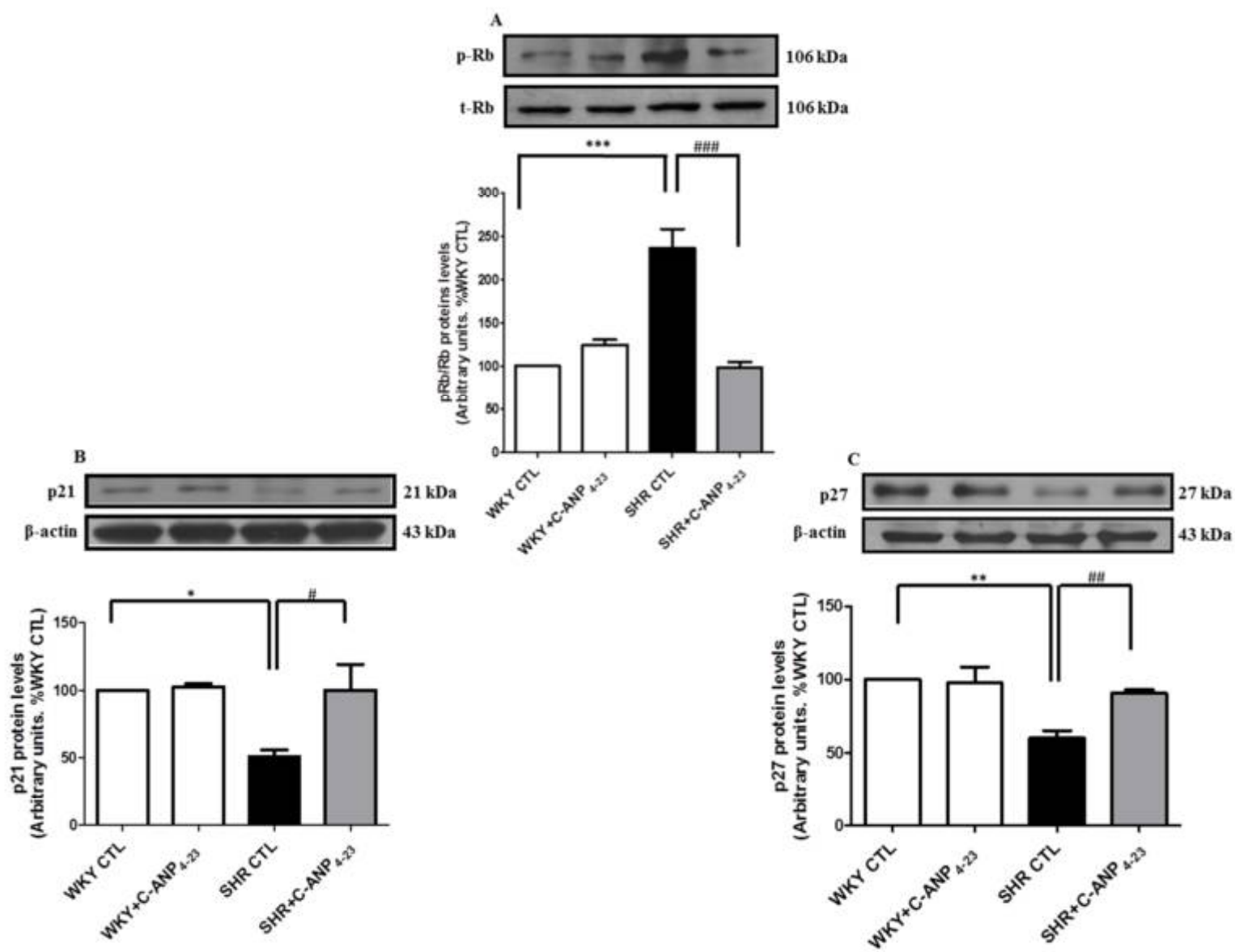


FIGURE 3

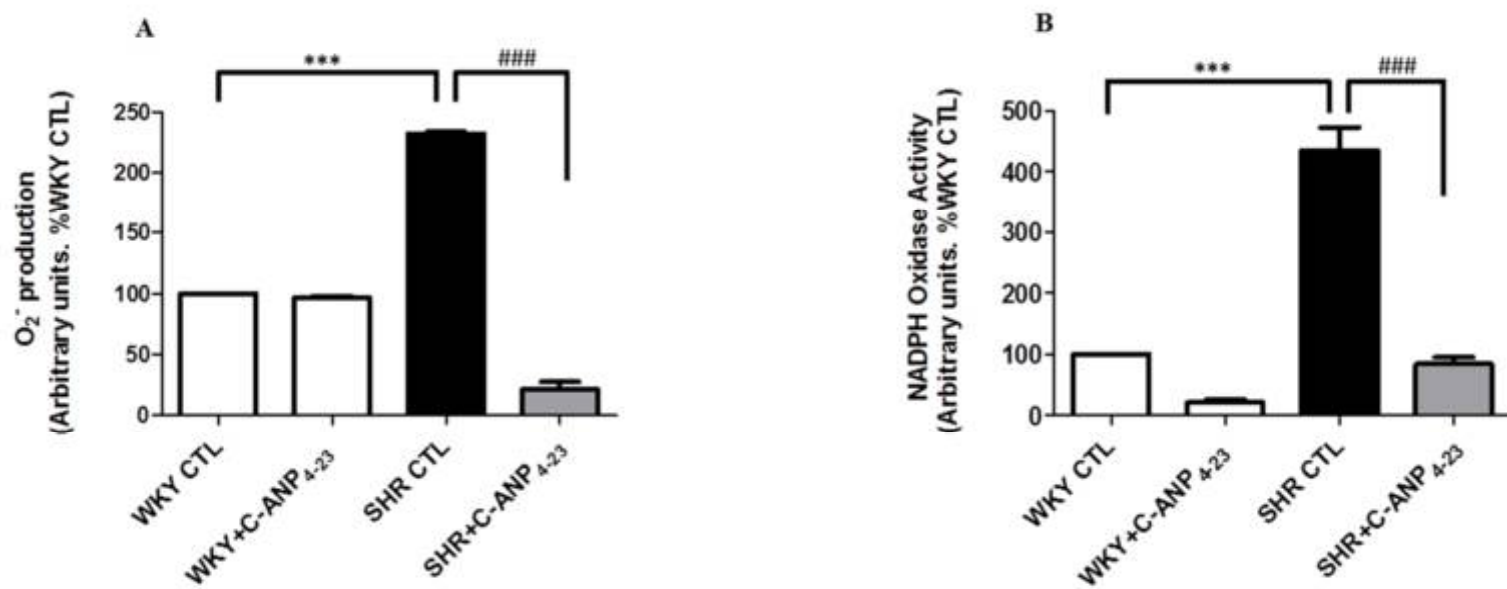


FIGURE 4

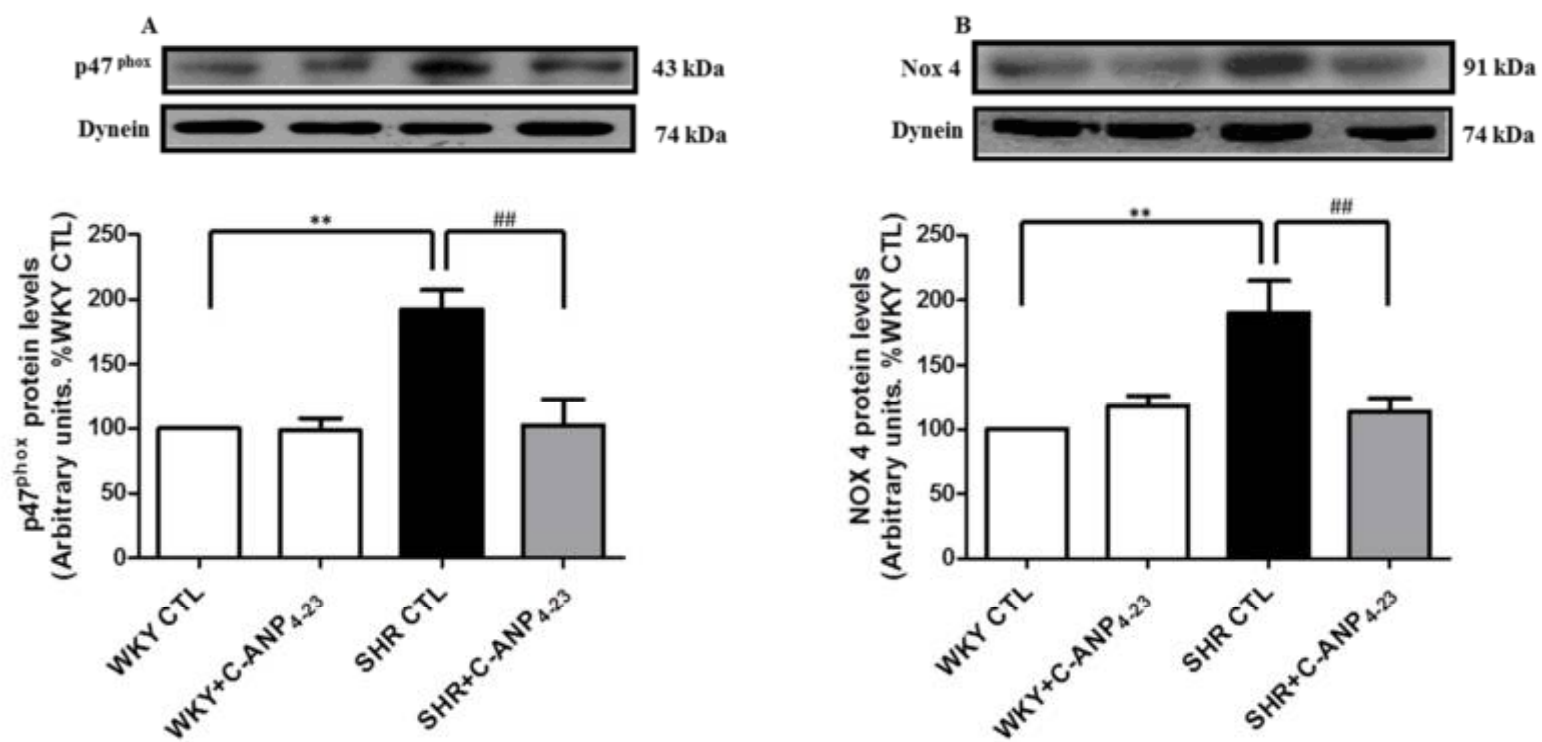


FIGURE 5

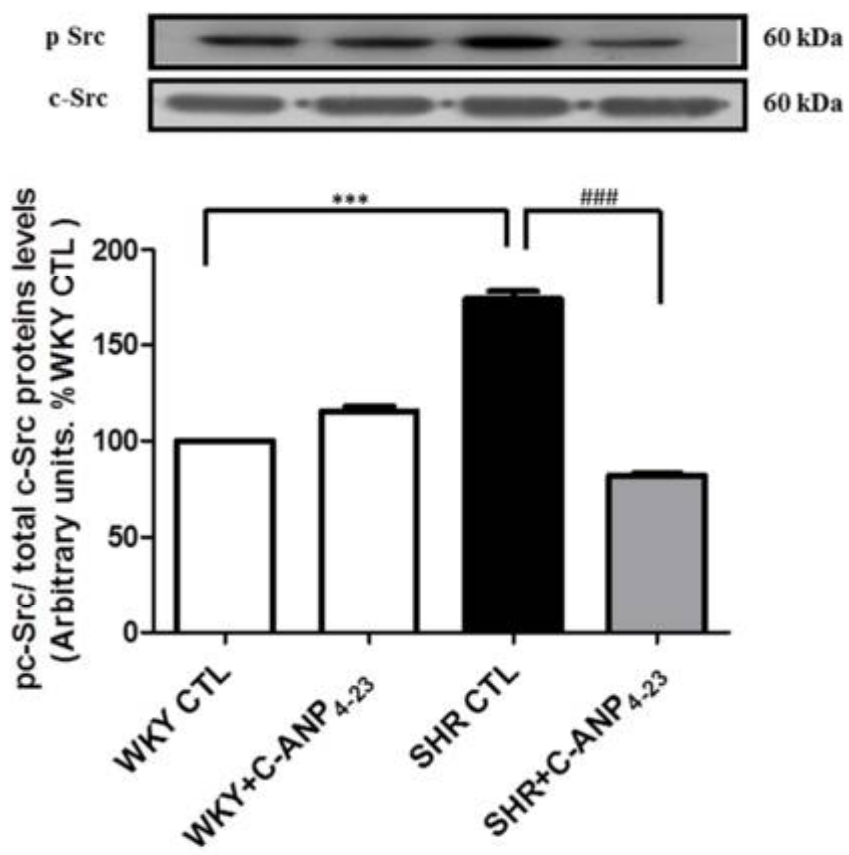


FIGURE 6

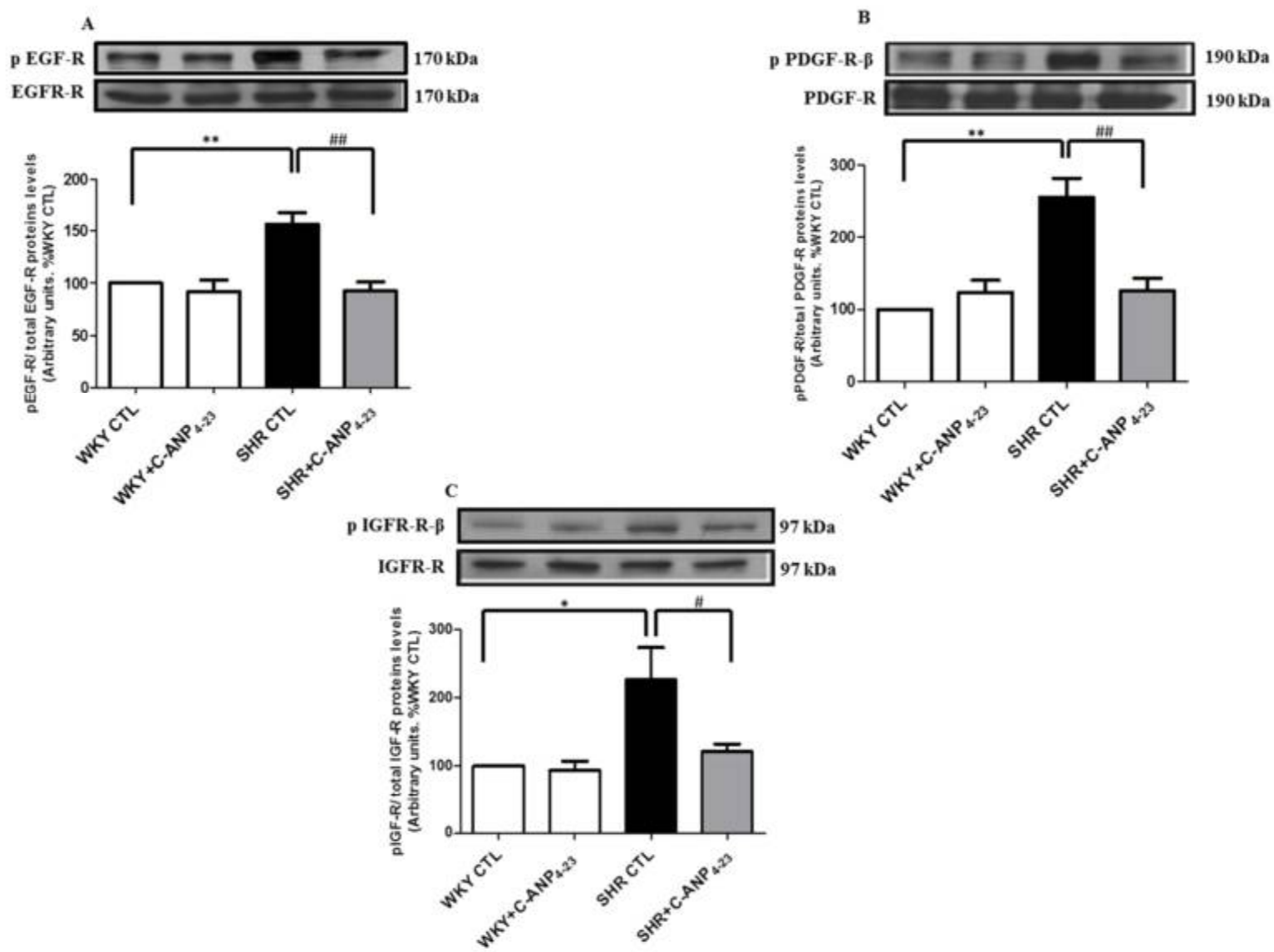


FIGURE 7

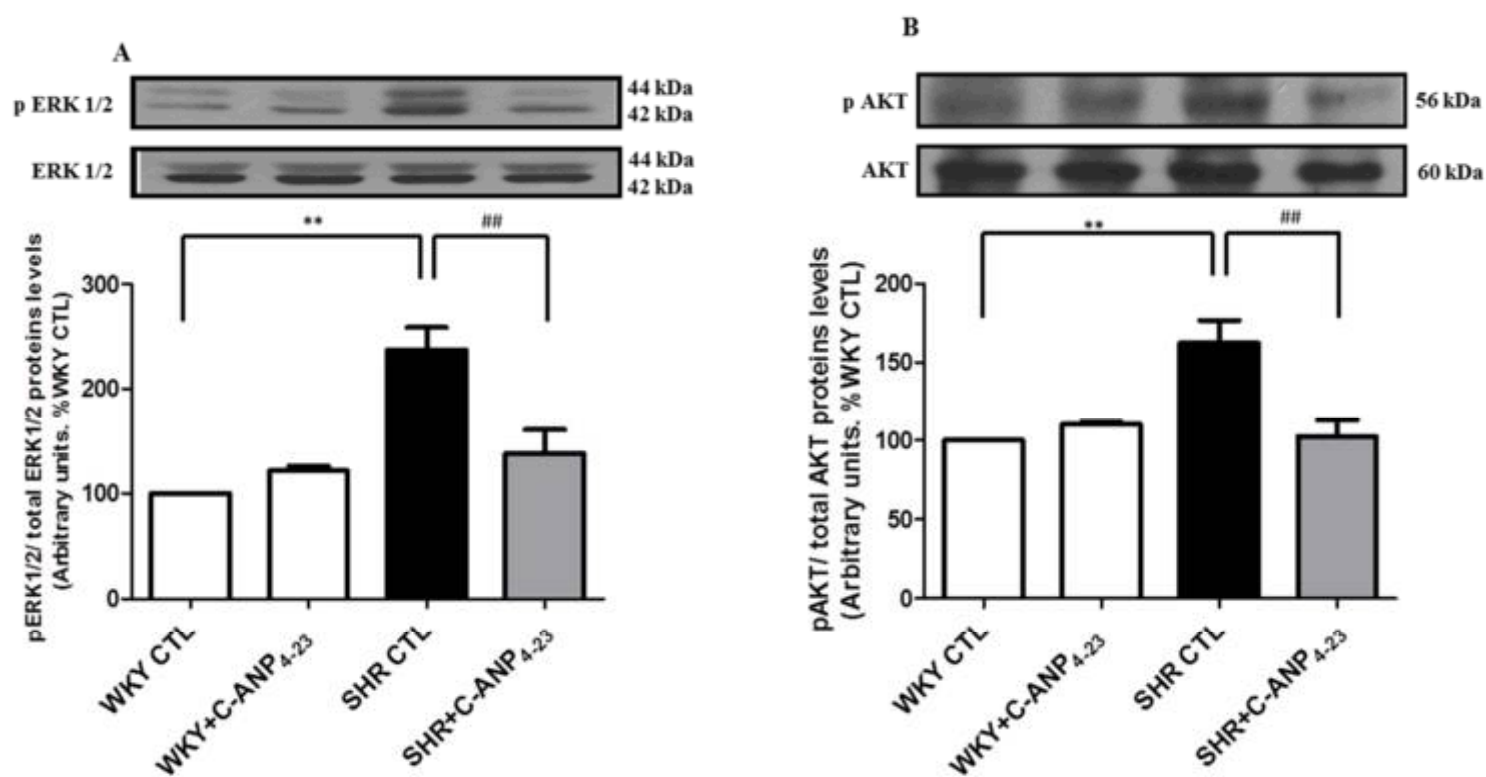


FIGURE 8

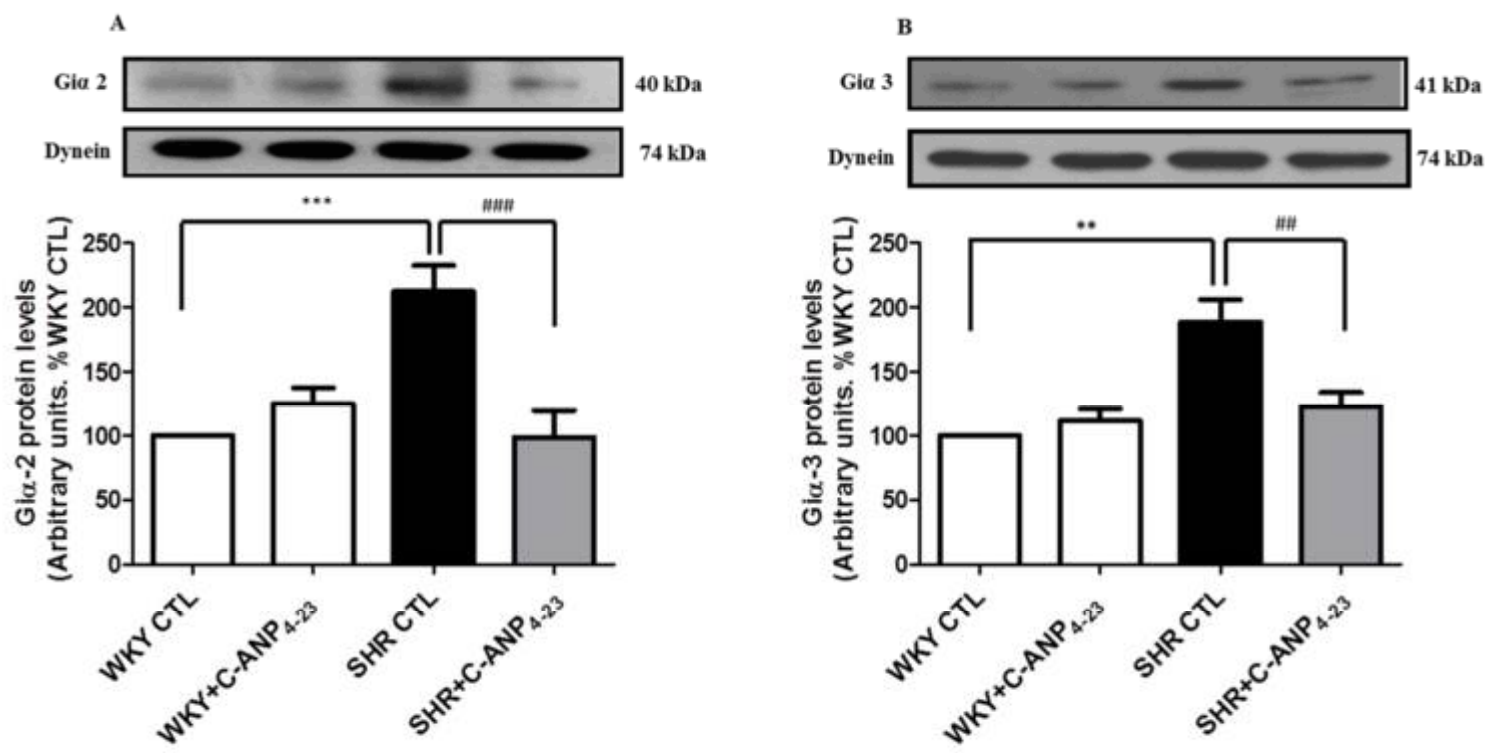


FIGURE 9

CHAPITRE III

DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

8. Discussion

Le remodelage vasculaire observé dans les pathologies cardiovasculaires comme l'athérosclérose ou l'hypertension artérielle, est principalement dû au fait que les CMLVs démontrent un profil prolifératif excessif. Les CMLVs provenant des RSH ont démontré une plus grande capacité mitotique que les WKY. Cette augmentation de prolifération a été attribuée à plusieurs facteurs. Premièrement, il a été prouvé que le taux de peptides vasoactifs sécrétés de manière endogène est plus élevé chez les RSH que chez les WKY. En effet, les tissus de CMLVs traités par l'Ang II, l'ET-1 et l'AVP ont démontré une augmentation de la prolifération en comparaison avec des CMLVs contrôles. Elles ont aussi démontré une activation des voies MAPK/AKT et une surexpression des protéines G α i. L'implication de ERK1/2 et de G α i dans la prolifération des CMLVs a précédemment été documentée (Li, Lappas et al. 2007, Li, Levesque et al. 2010, Gomez Sandoval and Anand-Srivastava 2011). Par ailleurs, nous avons précédemment démontré que ces peptides vasoactifs entraînaient l'activation des récepteurs des facteurs de croissance et que leur inhibition a réduit le niveau de prolifération des CMLVs des RSH, en comparaison à celui des WKY contrôles. Ceci suggère que leur hyperactivation est impliquée dans la prolifération des CMLVs observée chez les RSH (Li, Levesque et al. 2010, Gomez Sandoval and Anand-Srivastava 2011, Sandoval, Li et al. 2011).

Nous avons précédemment démontré que l'activation de ce récepteur par son agoniste spécifique le C-ANP₄₋₂₃ entraîne une diminution de la pression artérielle chez les RSH, et que cette diminution faisait intervenir des molécules du stress oxydatif (Li, Sarkar et al. 2014). Ces résultats sont en concordance avec les travaux d'autres chercheurs (Skowronska, Zielinska et al. 2010) et nos travaux antérieurs où nous avons montré que l'activation du NPR-C induisait une baisse du stress oxydatif en diminuant l'activité de la NADPH oxydase (Saha, Li et al. 2008b).

De plus, le NPR-C a démontré un rôle antimitotique dans de nombreux types cellulaires (Cahill and Hassid 1991, Levin and Frank 1991, Lelievre, Pineau et al. 2001, Gower, Carter et al. 2006, Khambata, Panayiotou et al. 2011). Hashim et al. ont démontré que l'hyperprolifération induite par des peptides vasoactifs dans un modèle de CMLVs de type A10, est diminuée par un fragment correspondant aux séquences activatrices de Gai du domaine cytoplasmique du NPR-C (Hashim, Li et al. 2006). Le traitement *in vivo* des RSH par le C-ANP₄₋₂₃ a montré, par incorporation à la thymidine, une baisse de l'augmentation de la synthèse d'ADN.

Dans cette présente étude, nous montrons que cette baisse implique une cascade de signalisation aboutissant à la réduction des protéines du cycle cellulaire. Nos résultats montrent que les protéines du cycle cellulaire impliquées dans la progression de la phase G1 en phase S étaient élevées dans les CMLVs des RSH et que le C-ANP₄₋₂₃ a significativement réduit cette augmentation. En effet, le niveau d'expression des cyclines A, E et D1 ainsi que celui des cdk2 et cdk4 sont augmentés dans les CMLVs des RSH et l'activation du NPR-C a réduit l'augmentation de l'expression de ces protéines. Ces résultats suggèrent que le traitement diminue la formation des complexes cyclines D1/cdk4 et cyclines E/cdk2 qui ont déjà été décrits comme nécessaires dans la transition de la phase G1 en S (Dulic, Lees et al. 1992, Koff, Giordano et al. 1992, Ekholm, Zickert et al. 2001). De plus, l'expression de la cycline E est également diminuée, ce qui suggère que l'action antiproliférative du NPR-C agit sur la transition des phases G1-S en diminuant la formation du complexe cycline E/cdk2. Nous dévoilons dans ces résultats, que le taux élevé de phosphorylation de la pRb dans les CMLVs des RSH a été réduit à celui de WKY contrôles par le C-ANP₄₋₂₃. La phosphorylation de la Rb est nécessaire à la relâche du E2F, et étant donné que ce dernier est responsable de la régulation de l'entrée en phase S, ceci pourrait expliquer la non-transition de la cellule dans cette phase lors de

l'hypophosphorylation de la Rb (Ekholm, Zickert et al. 2001, Sherr and McCormick 2002). Il est intéressant de noter que le gène de la cycline E est lui-même une cible pour le facteur de transcription E2F, ce qui pourrait expliquer d'avantage la diminution de l'expression de la cycline E dans les CMLVs des RSH injectés au C-ANP₄₋₂₃ (Ohtani, DeGregori et al. 1995, Geng, Eaton et al. 1996, Le Cam, Polanowska et al. 1999). Cette étude montre pour la première fois que les niveaux des inhibiteurs des protéines du cycle cellulaire, la p21^{Cip1} et la p27^{Kip1}, sont diminués dans les CMLVs des RSH et que l'activation du NPR-C restaure ces niveaux à celui des WKY contrôles. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres chercheurs qui ont démontré que les CMLVs provenant de RSH exprimaient des composantes de protéines du cycle cellulaire plus élevées et que ces protéines étaient responsables de la prolifération accrue des CMLVs des RSH (Tanner, Greutert et al. 2003, Lee, Kim et al. 2009). Par ailleurs, Tanner et al. ont aussi rapporté le rôle inhibiteur de la prolifération des protéines p21^{Cip1} et la p27^{Kip1} des CMLVs porcines. Cependant, Tanner et al. ont dénoté une prédisposition plus basse des niveaux de la protéine p21^{Cip1} des CMLVs des RSH. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait qu'ils aient provoqué un arrêt de la progression cellulaire par l'utilisation d'un sérum d'arrêt (Tanner, Greutert et al. 2003, Lee, Kim et al. 2009). Ainsi d'après ces résultats, nous émettons l'hypothèse que l'action antiproliférative de NPR-C lors de son activation par le C-ANP₄₋₂₃, est due à une diminution d'expression des protéines qui régulent la phase G1 et la phase S du cycle cellulaire et de la diminution de la phosphorylation de la protéine pRb d'une part, et d'autre part par la restauration des protéines inhibitrices des phases G1 et S, la p21^{Cip1} et la p27^{Kip1}.

Nous voulions également déterminer les voies de signalisation impliquées dans les effets antihyperprolifératifs du NPR-C. Pour ce faire, nous avons commencé par examiner le rôle du stress oxydatif dans ce mécanisme. Antérieurement, nous avons démontré que les CMLVs des

RSH avaient des niveaux élevés d'anion superoxyde en comparaison avec ceux des WKY (Lappas, Daou et al. 2005). Nous avons également montré que des niveaux élevés de peptides vasoactifs, augmentent l'expression des sous-unités de la NADPH oxydase p47^{phox} et Nox4 (Li, Lappas et al. 2007). Par ailleurs, nous avons montré que l'activité de la NADPH oxydase et l'expression de ses sous-unités p47^{phox} et Nox4 étaient élevées dans les CMLVs des RSH (Saha, Li et al. 2008b). Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres chercheurs qui ont également trouvé des niveaux augmentés de la sous-unité p47^{phox} et du stress oxydatif dans des modèles d'hypertension (Chabrashvili, Tojo et al. 2002, Sanchez, Galisteo et al. 2006). Dans cette étude, nous démontrons que les niveaux élevés de stress oxydatif observés chez les RSH ont diminué par le C-ANP₄₋₂₃. En effet, nous avons constaté que le taux d'activité de la NADPH oxydase lors de l'activation du NPR-C est revenu au niveau contrôle de WKY et que l'expression des sous-unités de cette enzyme est également normalisée. De plus, la production de l'O₂⁻ a été abolie par le C-ANP₄₋₂₃. Plusieurs études ont déjà rapporté l'implication du stress oxydatif dans l'induction de la prolifération des CMLVs. Il a été montré que l'exposition des CMLVs de rats WKY à un inducteur d'O₂⁻, augmente la synthèse d'ADN (Li, Dietz et al. 1997). Dans une étude similaire, Baas et al. ont montré que l'induction de la production de l'O₂⁻ par le LY83583, provoque de manière dose-dépendante une augmentation de l'incorporation de la thymidine, un marqueur de la synthèse d'ADN et de la prolifération cellulaire (Baas and Berk 1995). Par ailleurs, le stress oxydatif cause une inhibition des protéines de dégradation de la cycline D1 entraînant son accumulation et la progression de la cellule en phase G1 (Martinez Munoz, Post et al. 2001). À la lumière de ces résultats, nous proposons la théorie que la diminution de la prolifération des CMLVs des RSH par l'activation du NPR-C, se produit par la médiation d'une diminution du

stress oxydatif. Cependant, un rapport direct entre les molécules oxydantes et les protéines du cycle cellulaire au niveau des CMLVs des RSH n'a pas encore été établi.

Dans des expériences précédentes, nous avons montré que l'utilisation d'inhibiteurs des récepteurs des facteurs de croissance entraînait une baisse de la prolifération accrue des CMLVs des RSH, ce qui suggère l'implication de ces récepteurs dans la prolifération exagérée des cellules musculaires lisses vasculaires de RSH (Li, Levesque et al. 2010, Gomez Sandoval and Anand-Srivastava 2011, Sandoval, Li et al. 2011). Nous avons également montré l'implication de taux élevés de stress oxydatif dans le phénomène de transactivation des récepteurs des facteurs de croissance dans les CMLVs des RSH (Mbong and Anand-Srivastava 2012). Des études antérieures ont également mis en évidence la contribution du stress oxydatif dans la phosphorylation de c-Src (Ushio-Fukai, Griendling et al. 2001). La transactivation des récepteurs de facteurs de croissance par c-Src au niveau des CMLVs des RSH a également été rapportée (Li, Levesque et al. 2010, Gomez Sandoval and Anand-Srivastava 2011, Sandoval, Li et al. 2011). Nos résultats montrent que l'activation du NPR-C diminue le taux de phosphorylation de l'EGF-R, du PDGF-R et de l'IGF-R dans les CMLVs des RSH, supportant le rôle des récepteurs des facteurs de croissances dans les effets antiprolifératifs régies par le NPR-C. Nos résultats montrent également que l'activation du NPR-C atténue d'une manière significative la phosphorylation accrue de c-Src vers les niveaux de WKY, suggérant ainsi que l'effet antiprolifératif du traitement *in vivo* par le C-ANP₄₋₂₃ implique l'activation de c-Src. Néanmoins, la diminution de la surexpression des protéines du cycle cellulaire sous l'effet de l'inhibition c-Src et des récepteurs des facteurs de croissance demeure à être investiguée.

L'activation des voies de signalisation d'ERK1/2 et de PI3K/AKT est aussi impliquée dans la prolifération cellulaire (Varticovski, Harrison-Findik et al. 1994, Seger and Krebs 1995). Ces

voies jouent un rôle primordial dans la prolifération des CMLVs en cas d'hypertension (Force and Bonventre 1998). Un taux élevé de phosphorylation d'ERK1/2 a été observé dans les CMLVs des RSH en comparaison avec les WKY (Lappas, Daou et al. 2005). D'autres chercheurs ont également rapporté que l'hyperplasie des CMLVs se faisait à travers l'activation de la voie des MAPK (Touyz, Deng et al. 1999, Touyz and Schiffrin 2004). Par ailleurs, le traitement des CMLVs par un inhibiteur de MEK1 a réduit leur hyperprolifération dans un modèle de cellules A10 (Hashim, Li et al. 2006). Les voies de signalisation de PI3K/AKT sont aussi impliquées dans la prolifération cellulaire (Takahashi, Taniguchi et al. 1999, Xu, Ouk Kim et al. 2000, Liu, Su et al. 2010). De plus, Hashim et al. ont démontré que la voie des PI3K/AKT est responsable de l'hyperprolifération des CMLVs chez les RSH (Hashim, Li et al. 2006). L'implication de la PI3K/AKT dans la prolifération a aussi été rapportée par d'autres études (Takahashi, Taniguchi et al. 1999, Xu, Ouk Kim et al. 2000, Liu, Su et al. 2010). Une régulation en amont de la voie de ERK1/2 par PI3K dans la prolifération des CMLVs a aussi été évoquée (Saward and Zahradka 1997).

Par ailleurs, des fragments du domaine cytosoplasmique du récepteur NPR-C inhibent l'augmentation des taux de phosphorylation d'ERK1/2 et AKT induite par les peptides vasoactifs (Hashim, Li et al. 2006). De plus, des résultats antérieurs ont montré que la PD98059 et la wortmannin, des inhibiteurs de la MAPK et de la PI3K respectivement, atténuent l'expression des protéines cycline D1, cdk2 et la phosphorylation de la protéine pRb, suggérant ainsi le rôle de ces voies dans la régulation des protéines du cycle cellulaire (El Andaloussi, Li et al. 2013). L'activation soutenue des récepteurs des facteurs de croissance renforce l'activation d'ERK1/2 et de la voie de la PI3K induisant ainsi une augmentation de leur phosphorylation et de leurs propriétés mitogènes. Nos résultats montrent que la phosphorylation élevée d'ERK1/2 et de

l'AKT a été significativement réduite à un niveau contrôle par le C-ANP₄₋₂₃, nous laissant supposer que la réduction par le NPR-C de la prolifération excessive des CMLVs des RSH met en jeu la diminution des niveaux de phosphorylation d'ERK1/2 et d'AKT.

Les protéines G α i sont connues pour leurs implications dans la pathogénèse de l'hypertension artérielle car la simple injection de rats pré-hypertendus de deux semaines avec la toxine pertussis a prévenu le développement de l'hypertension chez ce modèle (Li and Anand-Srivastava 2002). De plus, nous avons précédemment démontré que le traitement par la toxine pertussis atténue l'augmentation de l'expression de la cycline D1, de cdk2 et du taux de phosphorylation de la protéine pRb dans les CMLVs de RSH en comparaison aux CMLVs de WKY (El Andaloussi, Li et al. 2013). Ces résultats suggèrent que le taux d'expression protéique élevé de G α i est impliqué dans l'augmentation de l'expression des protéines du cycle cellulaire.

Le NPR-C inhibe l'activité de l'adénylate cyclase via la protéine G α i ou active la voie de la PLC. Nous avons précédemment démontré que la diminution de l'AMPc par la stimulation du NPR-C contribuait à l'activation des voies signalétiques de PLC, suggérant ainsi un cross-talk entre ces deux voies (Mouawad, Li et al. 2004). Cependant, la diminution du cAMP lors de l'activation du NPR-C (Anand-Srivastava, Sairam et al. 1990), ne semble pas être le mécanisme impliqué dans les effets antiprolifératifs du C-ANP₄₋₂₃, car des niveaux bas de cAMP induisent une augmentation de la prolifération cellulaire (Schmidt, McKillop et al. 1999).

Nos résultats rapportent que le traitement par le C-ANP₄₋₂₃ diminue l'expression élevée des protéines G α i 2 and G α i 3 au niveau des CMLVs des RSH, et que cette diminution contribue à l'action antiproliférative du NPR-C, comme évoqué dans de précédentes études (Bou Daou, Li et al. 2016).

9. Conclusions

Nos résultats montrent une prolifération plus marquée dans les CMLVs des RSH en comparaison avec celles des WKY et montrent que le traitement *in vivo* par le C-ANP₄₋₂₃ diminue cette augmentation. De plus, les niveaux des protéines impliquées dans la phase G1 du cycle cellulaire : cycline A, cycline E cycline D1 ainsi que des cdk2 et cdk4 et de la forme phosphorylée de la protéine du rétinoblastome (pRb) sont plus élevés dans les CMLVs des RSH en comparaison avec les WKY, et ces niveaux ont été atténués par l'activation du NPR-C. Les protéines inhibitrices du cycle cellulaire, la p21^{Cip1} et la p27^{Kip1}, étaient régulées à la baisse dans les CMLVs des RSH et le traitement par le C-ANP₄₋₂₃ a restauré ces niveaux à ceux des contrôles des WKY. De plus, les niveaux de l'activité de la NADPH oxydase et de la production d'O₂⁻ étaient aussi augmentés dans les CMLVs des RSH et le C-ANP₄₋₂₃ a réduit ces élévations. Dans les CMLVs des RSH, les taux de phosphorylation de c-Src, des récepteurs des facteurs de croissance EGF-R, PDGF-R et IGF-R ainsi que ceux d'ERK1/2 et d'AKT étaient augmentés en comparaison avec les WKY et le traitement *in vivo* avec le C-ANP₄₋₂₃ a réduit de manière significative ces augmentations. Les protéines G α 2 et G α 3 étaient aussi surexprimées dans les CMLVs des RSH et l'activation du NPR-C a réduit cette hausse.

En conclusion, nous fournissons la première preuve que le traitement *in vivo* des RSH par l'agoniste spécifique du NPR-C induit une diminution de la prolifération des CMLVs, et que cette diminution est liée à une baisse des niveaux des protéines du cycle cellulaire exprimées durant la phase G1. Nous émettons l'hypothèse que cette baisse est due à la diminution du stress oxydatif induisant une hypophosphorylation de c-Src qui va à son tour atténuer la transactivation des récepteurs des facteurs de croissance. La diminution de l'activité de l'EGF-R, PDGF-R et IGF-R va induire une baisse de la phosphorylation d'ERK1/2 et d'AKT qui vont à leur tour

réguler à la baisse les protéines G α i, et ces dernières vont réduire l'expression des protéines du cycle cellulaire.

10. Perspectives

Cette recherche a mis en évidence les mécanismes par lesquels le NPR-C induit son effet antiprolifératif dans les CMLVs des RSH. Nous espérons que cette modeste contribution pourra ouvrir sur des investigations plus approfondies sur les mécanismes de signalisation intracellulaire qui sont impliqués dans la régulation des protéines du cycle cellulaire dans l'hypertension artérielle. Cette étude a démontré le rôle des protéines du cycle cellulaire impliquées durant la phase G1 et de leurs inhibiteurs dans l'hyperprolifération des CMLVs des RSH. Elle a également démontré le rôle du stress oxydatif et l'implication des voies de signalisation des récepteurs des facteurs de croissance, de l'activation de c-Src, de la voie d'ERK1/2 et celle des PI3K ainsi que la contribution des protéines Gai 2 et Gai 3. Nos prochaines études viseront à investiguer le rôle des substances anti-oxydantes, des inhibiteurs de c-Src ainsi que des antagonistes des récepteurs de facteurs de croissance sur l'expression des protéines du cycle cellulaire et de leurs inhibiteurs. Cette future étude aura pour but d'établir un lien direct entre ces voies de signalisation et l'expression des protéines du cycle cellulaire.

Ces voies ne sont pas les seules à être impliquées dans la prolifération; ainsi il serait intéressant d'évaluer la voie de JNK et p38 ou encore celle de la p53.

Comme mentionné précédemment, le mécanisme de l'apoptose a probablement une implication dans le remodelage. Il est intéressant de noter que de nombreuses études ont suggéré que l'hyperprolifération cellulaire est en fait une réponse compensatrice au phénomène apoptotique (Perez-Garijo, Martin et al. 2004, Kondo, Senoo-Matsuda et al. 2006, Fan and Bergmann 2008, Mollereau, Perez-Garijo et al. 2013). De plus, d'autres études suggèrent que l'apoptose se produit de manière cyclique durant des périodes limitées (Hamet, deBlois et al. 1996, Tea, Der Sarkissian et al. 2000). Etant donné la complexité du remodelage vasculaire, il

n'est pas impossible que le phénomène de l'apoptose induise l'hyperprolifération des CMLVs observée au niveau des RSH, c'est pourquoi il serait intéressant d'investiguer plus en profondeur cette piste.

Dans cette étude, nous avons aussi remarqué une différence marquée de la cycline E entre CMLVs de RSH et celle de WKY. Il serait aussi intrigant de voir les effets du C-ANP₄₋₂₃ sur d'autres protéines et d'autres phases du cycle cellulaire. Un autre aspect de l'action du C-ANP₄₋₂₃ sur les protéines du cycle n'a pas encore été abordé soit celui de la formation des complexes cyclines/cdk. En effet, notre étude démontre que l'expression élevée de ces protéines est retrouvée dans les CMLVs des RSH en comparaison avec les WKY et que cette augmentation est réduite par l'activation du NPR-C. Cela dit, il est encore nécessaire d'investiguer si les actions du NPR-C mettent en jeu la diminution de l'affinité du complexe cyclines/cdk.

Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la prolifération cellulaire serait un grand atout afin de prévenir d'éventuelles complications liées à une hyperprolifération des CMLVs comme la re-sténose et l'athérosclérose.

Cette étude apporte la preuve que l'activation du NPR-C a une action antiproliférative. Nous espérons que ces résultats puissent mettre la lumière sur le potentiel thérapeutique du NPR-C dans l'hypertension artérielle, car malheureusement les traitements disponibles ne servent qu'à gérer la pathologie une fois que celle-ci s'est manifestée. L'utilisation du NPR-C à des fins antiprolifératives pourrait également s'appliquer dans des maladies qui induisent un excès de prolifération cellulaire comme les différents types de néoplasme, car la suractivation des voies de signalisation comme celles de ERK1/2, de la PI3K et celles de c-Src et des récepteurs des facteurs de croissance impliqués dans les cancers ont toutes été inhibées par l'activation du NPR-C.

Contribution au travail de l'article :

Excepté la récolte des aortes thoraciques qui a été effectuée par notre technicienne de laboratoire Yan Li, j'ai contribué à toutes les expériences, à la récolte et l'interprétation des données ainsi qu'à l'ébauche de l'article.

Contribution du professeur Anand-Srivastava :

Le professeur a établi le projet de recherche ainsi que de nombreuses suggestions concernant le cheminement des expériences ainsi qu'aux corrections de l'article.

11. Bibliographie

- (1991)NIH. "Prevention of stroke by antihypertensive drug treatment in older persons with isolated systolic hypertension. Final results of the Systolic Hypertension in the Elderly Program (SHEP). SHEP Cooperative Research Group." JAMA **265**(24): 3255-3264.
- Adhikary, S. and M. Eilers (2005). "Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(8): 635-645.
- Adrain, C. and M. Freeman (2014). "Regulation of receptor tyrosine kinase ligand processing." Cold Spring Harb Perspect Biol **6**(1).
- Albanese, C., J. Johnson, G. Watanabe, N. Eklund, D. Vu, A. Arnold and R. G. Pestell (1995). "Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions." J Biol Chem **270**(40): 23589-23597.
- Alberts, B. (2002). Molecular biology of the cell. New York, Garland Science.
- Almeida, S. A., C. C. Cardoso, L. A. Orellano, A. M. Reis, L. S. Barcelos and S. P. Andrade (2014). "Natriuretic peptide clearance receptor ligand (C-ANP4-23) attenuates angiogenesis in a murine sponge implant model." Clin Exp Pharmacol Physiol **41**(9): 691-697.
- Amery, A., W. Birkenhager, P. Brixko, C. Bulpitt, D. Clement, M. Deruyttere, A. De Schaepdryver, C. Dollery, R. Fagard, F. Forette and et al. (1985). "Mortality and morbidity results from the European Working Party on High Blood Pressure in the Elderly trial." Lancet **1**(8442): 1349-1354.
- Ammarguella, F., I. Larouche and E. L. Schiffrin (2001). "Myocardial fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats: effect of endothelin ET(A) receptor antagonism." Circulation **103**(2): 319-324.
- Anand-Srivastava, M. B. (1983). "Angiotensin II receptors negatively coupled to adenylate cyclase in rat aorta." Biochem Biophys Res Commun **117**(2): 420-428.

- Anand-Srivastava, M. B. (1992). "Enhanced expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein in spontaneously hypertensive rats. Relationship to adenylate cyclase inhibition." Biochem J **288** (Pt 1): 79-85.
- Anand-Srivastava, M. B. (2005). "Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation." Peptides **26**(6): 1044-1059.
- Anand-Srivastava, M. B. (2010). "Modulation of Gi Proteins in Hypertension: Role of Angiotensin II and Oxidative Stress." Curr Cardiol Rev **6**(4): 298-308.
- Anand-Srivastava, M. B. and M. Cantin (1986). "Atrial natriuretic factor receptors are negatively coupled to adenylate cyclase in cultured atrial and ventricular cardiocytes." Biochem Biophys Res Commun **138**(1): 427-436.
- Anand-Srivastava, M. B., S. Picard and C. Thibault (1991). "Altered expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory proteins (Gi alpha) in spontaneously hypertensive rats." Am J Hypertens **4**(10 Pt 1): 840-843.
- Anand-Srivastava, M. B., P. D. Sehl and D. G. Lowe (1996). "Cytoplasmic domain of natriuretic peptide receptor-C inhibits adenylyl cyclase. Involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein." J Biol Chem **271**(32): 19324-19329.
- Anand-Srivastava, M. B. and G. J. Trachte (1993). "Atrial natriuretic factor receptors and signal transduction mechanisms." Pharmacol Rev **45**(4): 455-497.
- Anand-Srivastava, M. B., P. Vinay, J. Genest and M. Cantin (1986). "Effect of atrial natriuretic factor on adenylate cyclase in various nephron segments." Am J Physiol **251**(3 Pt 2): F417-423.
- Asghar, U., A. K. Witkiewicz, N. C. Turner and E. S. Knudsen (2015). "The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy." Nat Rev Drug Discov **14**(2): 130-146.
- Baas, A. S. and B. C. Berk (1995). "Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H₂O₂ and O₂⁻ in vascular smooth muscle cells." Circ Res **77**(1): 29-36.

- Babior, B. M., J. D. Lambeth and W. Nauseef (2002). "The neutrophil NADPH oxidase." Arch Biochem Biophys **397**(2): 342-344.
- Badeer, H. S. (2001). "Hemodynamics for medical students." Adv Physiol Educ **25**(1-4): 44-52.
- Bae, Y. S., S. W. Kang, M. S. Seo, I. C. Baines, E. Tekle, P. B. Chock and S. G. Rhee (1997). "Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation." J Biol Chem **272**(1): 217-221.
- Bai, L., R. Mao, J. Wang, L. Ding, S. Jiang, C. Gao, H. Kang, X. Chen, X. Sun and J. Xu (2015). "ERK1/2 promoted proliferation and inhibited apoptosis of human cervical cancer cells and regulated the expression of c-Fos and c-Jun proteins." Med Oncol **32**(3): 57.
- Bakris, G. L., E. Ritz and C. World Kidney Day Steering (2009). "The message for World Kidney Day 2009: hypertension and kidney disease: a marriage that should be prevented." Am J Nephrol **30**(1): 95-98.
- Baldin, V., J. Lukas, M. J. Marcote, M. Pagano and G. Draetta (1993). "Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1." Genes Dev **7**(5): 812-821.
- Barton, M., L. V. d'Uscio, S. Shaw, P. Meyer, P. Moreau and T. F. Luscher (1998). "ET(A) receptor blockade prevents increased tissue endothelin-1, vascular hypertrophy, and endothelial dysfunction in salt-sensitive hypertension." Hypertension **31**(1 Pt 2): 499-504.
- Battistini, B., P. Chailier, P. D'Orleans-Juste, N. Briere and P. Sirois (1993). "Growth regulatory properties of endothelins." Peptides **14**(2): 385-399.
- Bayliss, W. M. (1902). "On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure." J Physiol **28**(3): 220-231.
- Belmonte, S. L. and B. C. Blaxall (2011). "G protein coupled receptor kinases as therapeutic targets in cardiovascular disease." Circ Res **109**(3): 309-319.
- Berestetskaya, Y. V., M. P. Faure, H. Ichijo and T. A. Voyno-Yasenetskaya (1998). "Regulation of apoptosis by alpha-subunits of G12 and G13 proteins via apoptosis signal-regulating kinase-1." J Biol Chem **273**(43): 27816-27823.

- Bergsten, E., M. Uutela, X. Li, K. Pietras, A. Ostman, C. H. Heldin, K. Alitalo and U. Eriksson (2001). "PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor." Nat Cell Biol **3**(5): 512-516.
- Berne, R. M. a. M. N. L. (2001). Cardiovascular physiology St. Louis, MO, Mosby.
- Bhaskaran, S., J. Zaluski and A. Banes-Berceli (2014). "Molecular interactions of serotonin (5-HT) and endothelin-1 in vascular smooth muscle cells: in vitro and ex vivo analyses." Am J Physiol Cell Physiol **306**(2): C143-151.
- Bishopric, N. H. (2002). "Angiotensin signaling and apoptosis in the neonatal heart: necessary evils?" Pediatr Res **52**(3): 322-324.
- Blanc, A., N. R. Pandey and A. K. Srivastava (2003). "Synchronous activation of ERK 1/2, p38mapk and PKB/Akt signaling by H₂O₂ in vascular smooth muscle cells: potential involvement in vascular disease (review)." Int J Mol Med **11**(2): 229-234.
- Bohm, M., P. Gierschik, A. Knorr, K. Larisch, K. Weismann and E. Erdmann (1992). "Desensitization of adenylate cyclase and increase of Gi alpha in cardiac hypertrophy due to acquired hypertension." Hypertension **20**(1): 103-112.
- Bolen, J. B., R. B. Rowley, C. Spana and A. Y. Tsygankov (1992). "The Src family of tyrosine protein kinases in hemopoietic signal transduction." FASEB J **6**(15): 3403-3409.
- Bonnefont-Rousselot, D. (2002). "Glucose and reactive oxygen species." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **5**(5): 561-568.
- Boonstra, J. and J. A. Post (2004). "Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells." Gene **337**: 1-13.
- Boron, W. F. a. E. L. B. (2012). Medical physiology : a cellular and molecular approach. Philadelphia, Pa, Elsevier Saunders.
- Boscoboinik, D., A. Szewczyk, C. Hensey and A. Azzi (1991). "Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. Role of protein kinase C." J Biol Chem **266**(10): 6188-6194.

- Bou Daou, G., Y. Li and M. B. Anand-Srivastava (2016). "Enhanced expression of Gialpha proteins contributes to the hyperproliferation of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats via MAP kinase- and PI3 kinase-independent pathways." Can J Physiol Pharmacol **94**(1): 49-58.
- Bouallegue, A., G. B. Daou and A. K. Srivastava (2007). "Endothelin-1-induced signaling pathways in vascular smooth muscle cells." Curr Vasc Pharmacol **5**(1): 45-52.
- Bourque, C. W. (2008). "Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation." Nat Rev Neurosci **9**(7): 519-531.
- Brandes, R. P. and J. Kreuzer (2005). "Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation." Cardiovasc Res **65**(1): 16-27.
- Bravo, R., B. Somoza, M. Ruiz-Gayo, C. Gonzalez, L. M. Ruilope and M. S. Fernandez-Alfonso (2001). "Differential effect of chronic antihypertensive treatment on vascular smooth muscle cell phenotype in spontaneously hypertensive rats." Hypertension **37**(5): E4-E10.
- Brinks, H. L. and A. D. Eckhart (2010). "Regulation of GPCR signaling in hypertension." Biochim Biophys Acta **1802**(12): 1268-1275.
- Brown, J. and Z. Zuo (1994). "Receptor proteins and biological effects of C-type natriuretic peptides in the renal glomerulus of the rat." Am J Physiol **266**(4 Pt 2): R1383-1394.
- Brown, M. D. and D. B. Sacks (2008). "Compartmentalised MAPK pathways." Handb Exp Pharmacol(186): 205-235.
- Brunet, A., D. Roux, P. Lenormand, S. Dowd, S. Keyse and J. Pouyssegur (1999). "Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry." EMBO J **18**(3): 664-674.
- Brunner, H. R. and H. Gavras (2002). "Angiotensin blockade for hypertension: a promise fulfilled." Lancet **359**(9311): 990-992.
- Bryja, V., J. Pachernik, J. Vondracek, K. Soucek, L. Cajanek, V. Horvath, Z. Holubcova, P. Dvorak and A. Hampl (2008). "Lineage specific composition of cyclin D-CDK4/CDK6-

- p27 complexes reveals distinct functions of CDK4, CDK6 and individual D-type cyclins in differentiating cells of embryonic origin." Cell Prolif **41**(6): 875-893.
- Buchkovich, K., L. A. Duffy and E. Harlow (1989). "The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle." Cell **58**(6): 1097-1105.
- Cahill, P. A. and A. Hassid (1991). "Clearance receptor-binding atrial natriuretic peptides inhibit mitogenesis and proliferation of rat aortic smooth muscle cells." Biochem Biophys Res Commun **179**(3): 1606-1613.
- Caldwell, P. R., B. C. Seegal, K. C. Hsu, M. Das and R. L. Soffer (1976). "Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization." Science **191**(4231): 1050-1051.
- Callera, G., R. Tostes, C. Savoia, M. N. Muscara and R. M. Touyz (2007). "Vasoactive peptides in cardiovascular (patho)physiology." Expert Rev Cardiovasc Ther **5**(3): 531-552.
- Callera, G. E., R. C. Tostes, A. Yogi, A. C. Montezano and R. M. Touyz (2006). "Endothelin-1-induced oxidative stress in DOCA-salt hypertension involves NADPH-oxidase-independent mechanisms." Clin Sci (Lond) **110**(2): 243-253.
- Cantrell, D. A. (2001). "Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways." J Cell Sci **114**(Pt 8): 1439-1445.
- Cargnello, M. and P. P. Roux (2011). "Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases." Microbiol Mol Biol Rev **75**(1): 50-83.
- Casimiro, M. C., M. Crosariol, E. Loro, Z. Li and R. G. Pestell (2012). "Cyclins and cell cycle control in cancer and disease." Genes Cancer **3**(11-12): 649-657.
- Cattaneo, F., G. Guerra, M. Parisi, M. De Marinis, D. Tafuri, M. Cinelli and R. Ammendola (2014). "Cell-surface receptors transactivation mediated by g protein-coupled receptors." Int J Mol Sci **15**(11): 19700-19728.
- Cattaruzza, M., C. Dimigen, H. Ehrenreich and M. Hecker (2000). "Stretch-induced endothelin B receptor-mediated apoptosis in vascular smooth muscle cells." FASEB J **14**(7): 991-998.

- Ceolotto, G., I. Papparella, L. Lenzini, M. Sartori, M. Mazzoni, E. Iori, L. Franco, A. Gallo, S. V. de Kreutzenberg, A. Tiengo, A. C. Pessina, A. Avogaro and A. Semplicini (2006). "Insulin generates free radicals in human fibroblasts ex vivo by a protein kinase C-dependent mechanism, which is inhibited by pravastatin." Free Radic Biol Med **41**(3): 473-483.
- Chabrashvili, T., A. Tojo, M. L. Onozato, C. Kitiyakara, M. T. Quinn, T. Fujita, W. J. Welch and C. S. Wilcox (2002). "Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney." Hypertension **39**(2): 269-274.
- Chen, K. C., Y. Zhou, W. Zhang and M. F. Lou (2007). "Control of PDGF-induced reactive oxygen species (ROS) generation and signal transduction in human lens epithelial cells." Mol Vis **13**: 374-387.
- Chen, P. L., P. Scully, J. Y. Shew, J. Y. Wang and W. H. Lee (1989). "Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation." Cell **58**(6): 1193-1198.
- Cheng, M., V. Sexl, C. J. Sherr and M. F. Roussel (1998). "Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1)." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(3): 1091-1096.
- Cheung, E. C., P. Lee, F. Ceteci, C. Nixon, K. Blyth, O. J. Sansom and K. H. Vousden (2016). "Opposing effects of TIGAR- and RAC1-derived ROS on Wnt-driven proliferation in the mouse intestine." Genes Dev **30**(1): 52-63.
- Choudhury, G. G., C. Karamitsos, J. Hernandez, A. Gentilini, J. Bardgette and H. E. Abboud (1997). "PI-3-kinase and MAPK regulate mesangial cell proliferation and migration in response to PDGF." Am J Physiol **273**(6 Pt 2): F931-938.
- Chow, C. K., K. K. Teo, S. Rangarajan, S. Islam, R. Gupta, A. Avezum, A. Bahonar, J. Chifamba, G. Dagenais, R. Diaz, K. Kazmi, F. Lanas, L. Wei, P. Lopez-Jaramillo, L. Fanghong, N. H. Ismail, T. Puoane, A. Rosengren, A. Szuba, A. Temizhan, A. Wielgosz, R. Yusuf, A. Yusufali, M. McKee, L. Liu, P. Mony, S. Yusuf and P. S. investigators

- (2013). "Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in rural and urban communities in high-, middle-, and low-income countries." JAMA **310**(9): 959-968.
- Cicchillitti, L., P. Fasanaro, P. Biglioli, M. C. Capogrossi and F. Martelli (2003). "Oxidative stress induces protein phosphatase 2A-dependent dephosphorylation of the pocket proteins pRb, p107, and p130." J Biol Chem **278**(21): 19509-19517.
- Clapham, D. E. and E. J. Neer (1997). "G protein beta gamma subunits." Annu Rev Pharmacol Toxicol **37**: 167-203.
- Coffer, P. J., J. Jin and J. R. Woodgett (1998). "Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation." Biochem J **335** (Pt 1): 1-13.
- Cohen, S. (1960). "Purification of a Nerve-Growth Promoting Protein from the Mouse Salivary Gland and Its Neuro-Cytotoxic Antiserum." Proc Natl Acad Sci U S A **46**(3): 302-311.
- Coleman, D. E., A. M. Berghuis, E. Lee, M. E. Linder, A. G. Gilman and S. R. Sprang (1994). "Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis." Science **265**(5177): 1405-1412.
- Conour, J. E., W. V. Graham and H. R. Gaskins (2004). "A combined in vitro/bioinformatic investigation of redox regulatory mechanisms governing cell cycle progression." Physiol Genomics **18**(2): 196-205.
- Contard, F., A. Sabri, M. Glukhova, S. Sartore, F. Marotte, J. P. Pomies, P. Schiavi, D. Guez, J. L. Samuel and L. Rappaport (1993). "Arterial smooth muscle cell phenotype in stroke-prone spontaneously hypertensive rats." Hypertension **22**(5): 665-676.
- Coqueret, O. (2003). "New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment?" Trends Cell Biol **13**(2): 65-70.
- Costa, M. A., R. Elesgaray, A. M. Balaszczuk and C. Arranz (2006). "Role of NPR-C natriuretic receptor in nitric oxide system activation induced by atrial natriuretic peptide." Regul Pept **135**(1-2): 63-68.

- Currie, M. G., D. M. Geller, B. R. Cole, N. R. Siegel, K. F. Fok, S. P. Adams, S. R. Eubanks, G. R. Galluppi and P. Needleman (1984). "Purification and sequence analysis of bioactive atrial peptides (atriopeptins)." Science **223**(4631): 67-69.
- D'Orleans-Juste, P., M. Plante, J. C. Honore, E. Carrier and J. Labonte (2003). "Synthesis and degradation of endothelin-1." Can J Physiol Pharmacol **81**(6): 503-510.
- Daemen, M. J., D. M. Lombardi, F. T. Bosman and S. M. Schwartz (1991). "Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall." Circ Res **68**(2): 450-456.
- de Bold, A. J., H. B. Borenstein, A. T. Veress and H. Sonnenberg (1981). "A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats." Life Sci **28**(1): 89-94.
- deBlois, D., M. Viswanathan, J. E. Su, A. W. Clowes, J. M. Saavedra and S. M. Schwartz (1996). "Smooth muscle DNA replication in response to angiotensin II is regulated differently in the neointima and media at different times after balloon injury in the rat carotid artery. Role of AT1 receptor expression." Arterioscler Thromb Vasc Biol **16**(9): 1130-1137.
- DeVree, B. T., J. P. Mahoney, G. A. Velez-Ruiz, S. G. Rasmussen, A. J. Kuszak, E. Edwald, J. J. Fung, A. Manglik, M. Masureel, Y. Du, R. A. Matt, E. Pardon, J. Steyaert, B. K. Kobilka and R. K. Sunahara (2016). "Allosteric coupling from G protein to the agonist-binding pocket in GPCRs." Nature **535**(7610): 182-186.
- DeWire, S. M., S. Ahn, R. J. Lefkowitz and S. K. Shenoy (2007). "Beta-arrestins and cell signaling." Annu Rev Physiol **69**: 483-510.
- Dhillon, A. S., S. Hagan, O. Rath and W. Kolch (2007). "MAP kinase signalling pathways in cancer." Oncogene **26**(22): 3279-3290.
- Diehl, J. A., M. Cheng, M. F. Roussel and C. J. Sherr (1998). "Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization." Genes Dev **12**(22): 3499-3511.

- Diep, Q. N., M. El Mabrouk, R. M. Touyz and E. L. Schiffrin (2001). "Expression of cell cycle proteins in blood vessels of angiotensin II-infused rats: role of AT(1) receptors." Hypertension **37**(2 Pt 2): 604-608.
- Dietz, J. R. (1984). "Release of natriuretic factor from rat heart-lung preparation by atrial distension." Am J Physiol **247**(6 Pt 2): R1093-1096.
- Draetta, G. and D. Beach (1988). "Activation of cdc2 protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement." Cell **54**(1): 17-26.
- Duff, J. L., M. B. Marrero, W. G. Paxton, B. Schieffer, K. E. Bernstein and B. C. Berk (1995). "Angiotensin II signal transduction and the mitogen-activated protein kinase pathway." Cardiovasc Res **30**(4): 511-517.
- Dulic, V., E. Lees and S. I. Reed (1992). "Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase." Science **257**(5078): 1958-1961.
- Dumesic, P. A., F. A. Scholl, D. I. Barragan and P. A. Khavari (2009). "Erk1/2 MAP kinases are required for epidermal G2/M progression." J Cell Biol **185**(3): 409-422.
- Eguchi, S., H. Iwasaki, H. Ueno, G. D. Frank, E. D. Motley, K. Eguchi, F. Marumo, Y. Hirata and T. Inagami (1999). "Intracellular signaling of angiotensin II-induced p70 S6 kinase phosphorylation at Ser(411) in vascular smooth muscle cells. Possible requirement of epidermal growth factor receptor, Ras, extracellular signal-regulated kinase, and Akt." J Biol Chem **274**(52): 36843-36851.
- Ekholm-Reed, S., J. Mendez, D. Tedesco, A. Zetterberg, B. Stillman and S. I. Reed (2004). "Deregulation of cyclin E in human cells interferes with prereplication complex assembly." J Cell Biol **165**(6): 789-800.
- Ekholm, S. V., P. Zickert, S. I. Reed and A. Zetterberg (2001). "Accumulation of cyclin E is not a prerequisite for passage through the restriction point." Mol Cell Biol **21**(9): 3256-3265.
- El Andaloussi, J., Y. Li and M. B. Anand-Srivastava (2013). "Natriuretic peptide receptor-C agonist attenuates the expression of cell cycle proteins and proliferation of vascular

- smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats: role of Gi proteins and MAPkinase/PI3kinase signaling." PLoS One **8**(10): e76183.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." Toxicol Pathol **35**(4): 495-516.
- Epstein, B. J. (2008). "Efficacy and safety of darusentan: a novel endothelin receptor antagonist." Ann Pharmacother **42**(7): 1060-1069.
- Fan, Y. and A. Bergmann (2008). "Distinct mechanisms of apoptosis-induced compensatory proliferation in proliferating and differentiating tissues in the Drosophila eye." Dev Cell **14**(3): 399-410.
- Faraci, F. M. and S. P. Didion (2004). "Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(8): 1367-1373.
- Ferguson, K. M., M. B. Berger, J. M. Mendrola, H. S. Cho, D. J. Leahy and M. A. Lemmon (2003). "EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization." Mol Cell **11**(2): 507-517.
- Ferguson, S. S. (2001). "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling." Pharmacol Rev **53**(1): 1-24.
- Flemington, E. K., S. H. Speck and W. G. Kaelin, Jr. (1993). "E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(15): 6914-6918.
- Flynn, T. G., M. L. de Bold and A. J. de Bold (1983). "The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties." Biochem Biophys Res Commun **117**(3): 859-865.
- Force, T. and J. V. Bonventre (1998). "Growth factors and mitogen-activated protein kinases." Hypertension **31**(1 Pt 2): 152-161.

- Foster, D. A., P. Yellen, L. Xu and M. Saqcena (2010). "Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s)." Genes Cancer **1**(11): 1124-1131.
- Fredriksson, L., H. Li and U. Eriksson (2004). "The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms." Cytokine Growth Factor Rev **15**(4): 197-204.
- Fridovich, I. (1974). "Editorial: Superoxide radical and the bactericidal action of phagocytes." N Engl J Med **290**(11): 624-625.
- Fukuda, N., C. Satoh, W. Y. Hu, M. Soma, A. Kubo, H. Kishioka, Y. Watanabe, Y. Izumi and K. Kanmatsuse (1999). "Production of angiotensin II by homogeneous cultures of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(5): 1210-1217.
- Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373-376.
- Fuster, J. J., P. Fernandez, H. Gonzalez-Navarro, C. Silvestre, Y. N. Nabah and V. Andres (2010). "Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies." Cardiovasc Res **86**(2): 254-264.
- Gao, B. B., H. Hansen, H. C. Chen and E. P. Feener (2006). "Angiotensin II stimulates phosphorylation of an ectodomain-truncated platelet-derived growth factor receptor-beta and its binding to class IA PI3K in vascular smooth muscle cells." Biochem J **397**(2): 337-344.
- Gauron, C., C. Rampon, M. Bouzaffour, E. Ipendey, J. Teillon, M. Volovitch and S. Vriza (2013). "Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed." Sci Rep **3**: 2084.
- Ge, C., R. Garcia and M. B. Anand-Srivastava (1999). "Altered expression of Gi-protein and adenylyl cyclase activity in hearts from one kidney one clip hypertensive rats: effect of captopril." J Hypertens **17**(11): 1617-1626.

- Ge, C., R. Garcia and M. B. Anand-Srivastava (2006). "Enhanced expression of Gialpha protein and adenylyl cyclase signaling in aortas from 1 kidney 1 clip hypertensive rats." Can J Physiol Pharmacol **84**(7): 739-746.
- Gehart, H., S. Kumpf, A. Ittner and R. Ricci (2010). "MAPK signalling in cellular metabolism: stress or wellness?" EMBO Rep **11**(11): 834-840.
- Geng, Y., E. N. Eaton, M. Picon, J. M. Roberts, A. S. Lundberg, A. Gifford, C. Sardet and R. A. Weinberg (1996). "Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein." Oncogene **12**(6): 1173-1180.
- George, A. J., R. D. Hannan and W. G. Thomas (2013). "Unravelling the molecular complexity of GPCR-mediated EGFR transactivation using functional genomics approaches." FEBS J **280**(21): 5258-5268.
- Gilbertson, D. G., M. E. Duff, J. W. West, J. D. Kelly, P. O. Sheppard, P. D. Hofstrand, Z. Gao, K. Shoemaker, T. R. Bukowski, M. Moore, A. L. Feldhaus, J. M. Humes, T. E. Palmer and C. E. Hart (2001). "Platelet-derived growth factor C (PDGF-C), a novel growth factor that binds to PDGF alpha and beta receptor." J Biol Chem **276**(29): 27406-27414.
- Gille, H. and J. Downward (1999). "Multiple ras effector pathways contribute to G(1) cell cycle progression." J Biol Chem **274**(31): 22033-22040.
- Goldenberg, I., E. Grossman, K. A. Jacobson, V. Shneyvays and A. Shainberg (2001). "Angiotensin II-induced apoptosis in rat cardiomyocyte culture: a possible role of AT1 and AT2 receptors." J Hypertens **19**(9): 1681-1689.
- Goldsmith, Z. G. and D. N. Dhanasekaran (2007). "G protein regulation of MAPK networks." Oncogene **26**(22): 3122-3142.
- Gomez Sandoval, Y. H. and M. B. Anand-Srivastava (2011). "Enhanced levels of endogenous endothelin-1 contribute to the over expression of Gialpha protein in vascular smooth muscle cells from SHR: Role of growth factor receptor activation." Cell Signal **23**(2): 354-362.

- Gower, W. R., Jr., G. M. Carter, Q. McAfee and S. M. Solivan (2006). "Identification, regulation and anti-proliferative role of the NPR-C receptor in gastric epithelial cells." Mol Cell Biochem **293**(1-2): 103-118.
- Graf, R., R. Mattera, J. Codina, T. Evans, Y. K. Ho, M. K. Estes and L. Birnbaumer (1992). "Studies on the interaction of alpha subunits of GTP-binding proteins with beta gamma dimers." Eur J Biochem **210**(2): 609-619.
- Grana, X. and E. P. Reddy (1995). "Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs)." Oncogene **11**(2): 211-219.
- Grandori, C., S. M. Cowley, L. P. James and R. N. Eisenman (2000). "The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 653-699.
- Grassi, G., S. Bertoli and G. Seravalle (2012). "Sympathetic nervous system: role in hypertension and in chronic kidney disease." Curr Opin Nephrol Hypertens **21**(1): 46-51.
- Griendling, K. K., C. A. Minieri, J. D. Ollerenshaw and R. W. Alexander (1994). "Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells." Circ Res **74**(6): 1141-1148.
- Griendling, K. K., D. Sorescu and M. Ushio-Fukai (2000). "NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease." Circ Res **86**(5): 494-501.
- Gruden, G., A. Landi and G. Bruno (2014). "Natriuretic peptides, heart, and adipose tissue: new findings and future developments for diabetes research." Diabetes Care **37**(11): 2899-2908.
- Guyton, A. C., T. G. Coleman, A. V. Cowley, Jr., K. W. Scheel, R. D. Manning, Jr. and R. A. Norman, Jr. (1972). "Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension." Am J Med **52**(5): 584-594.

- Guyton, K. Z., Y. Liu, M. Gorospe, Q. Xu and N. J. Holbrook (1996). "Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury." J Biol Chem **271**(8): 4138-4142.
- Hahn, A. W., T. J. Resink, T. Scott-Burden, J. Powell, Y. Dohi and F. R. Buhler (1990). "Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function." Cell Regul **1**(9): 649-659.
- Hall, J. E. (2006). TEXTBOOK OF MEDICAL PHYSIOLOGY. 1600 John F. Kennedy Blvd., Suite 1800 Philadelphia, Pennsylvania 19103-2899, Elsevier.
- Hamet, P., D. deBlois, T. V. Dam, L. Richard, E. Teiger, B. S. Tea, S. N. Orlov and J. Tremblay (1996). "Apoptosis and vascular wall remodeling in hypertension." Can J Physiol Pharmacol **74**(7): 850-861.
- Han, D., F. Antunes, R. Canali, D. Rettori and E. Cadenas (2003). "Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol." J Biol Chem **278**(8): 5557-5563.
- Harr, M. W. and C. W. Distelhorst (2010). "Apoptosis and autophagy: decoding calcium signals that mediate life or death." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(10): a005579.
- Hashim, S., Y. Li and M. B. Anand-Srivastava (2006). "Small cytoplasmic domain peptides of natriuretic peptide receptor-C attenuate cell proliferation through G α protein/MAP kinase/PI3-kinase/AKT pathways." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(6): H3144-3153.
- Havens, C. G., A. Ho, N. Yoshioka and S. F. Dowdy (2006). "Regulation of late G1/S phase transition and APC Cdh1 by reactive oxygen species." Mol Cell Biol **26**(12): 4701-4711.
- Haystead, T. A., P. Dent, J. Wu, C. M. Haystead and T. W. Sturgill (1992). "Ordered phosphorylation of p42mapk by MAP kinase kinase." FEBS Lett **306**(1): 17-22.
- Heldin, C. H. and B. Westermark (1999). "Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor." Physiol Rev **79**(4): 1283-1316.

- Helin, K., E. Harlow and A. Fattaey (1993). "Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein." Mol Cell Biol **13**(10): 6501-6508.
- Hemmings, B. A. and D. F. Restuccia (2012). "PI3K-PKB/Akt pathway." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(9): a011189.
- Hendriks-Balk, M. C., S. L. Peters, M. C. Michel and A. E. Alewijnse (2008). "Regulation of G protein-coupled receptor signalling: focus on the cardiovascular system and regulator of G protein signalling proteins." Eur J Pharmacol **585**(2-3): 278-291.
- Henry, J. P., O. H. Gauer and J. L. Reeves (1956). "Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow." Circ Res **4**(1): 85-90.
- Herber, B., M. Truss, M. Beato and R. Muller (1994). "Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter." Oncogene **9**(7): 2105-2107.
- Hermeking, H., C. Rago, M. Schuhmacher, Q. Li, J. F. Barrett, A. J. Obaya, B. C. O'Connell, M. K. Mateyak, W. Tam, F. Kohlhuber, C. V. Dang, J. M. Sedivy, D. Eick, B. Vogelstein and K. W. Kinzler (2000). "Identification of CDK4 as a target of c-MYC." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(5): 2229-2234.
- Hernandez-Sanchez, C., H. Werner, C. T. Roberts, Jr., E. J. Woo, D. W. Hum, S. M. Rosenthal and D. LeRoith (1997). "Differential regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor gene expression by IGF-I and basic fibroblastic growth factor." J Biol Chem **272**(8): 4663-4670.
- Hiebert, S. W., S. P. Chellappan, J. M. Horowitz and J. R. Nevins (1992). "The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F." Genes Dev **6**(2): 177-185.
- Hole, P. S., J. Zabkiewicz, C. Munje, Z. Newton, L. Pearn, P. White, N. Marquez, R. K. Hills, A. K. Burnett, A. Tonks and R. L. Darley (2013). "Overproduction of NOX-derived ROS in AML promotes proliferation and is associated with defective oxidative stress signaling." Blood **122**(19): 3322-3330.

- Holl, M., R. Koziel, G. Schafer, H. Pircher, A. Pauck, M. Hermann, H. Klocker, P. Jansen-Durr and N. Sampson (2016). "ROS signaling by NADPH oxidase 5 modulates the proliferation and survival of prostate carcinoma cells." Mol Carcinog **55**(1): 27-39.
- Hosoda, Y., K. Kawano, F. Yamasawa, T. Ishii, T. Shibata and S. Inayama (1984). "Age-dependent changes of collagen and elastin content in human aorta and pulmonary artery." Angiology **35**(10): 615-621.
- Hsia, J. A., J. Moss, E. L. Hewlett and M. Vaughan (1984). "ADP-ribosylation of adenylate cyclase by pertussis toxin. Effects on inhibitory agonist binding." J Biol Chem **259**(2): 1086-1090.
- Hsieh, H. J., C. A. Liu, B. Huang, A. H. Tseng and D. L. Wang (2014). "Shear-induced endothelial mechanotransduction: the interplay between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the pathophysiological implications." J Biomed Sci **21**: 3.
- Hu, R. M., E. R. Levin, A. Pedram and H. J. Frank (1992). "Atrial natriuretic peptide inhibits the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. Mediation through the C receptor." J Biol Chem **267**(24): 17384-17389.
- Hughes, J. M. and S. J. Bund (2004). "Influence of experimental reduction of arterial media : lumen ratio on agonist-stimulated contractions in hypertension." J Hypertens **22**(3): 519-527.
- Hwang, H. C. and B. E. Clurman (2005). "Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles." Oncogene **24**(17): 2776-2786.
- Hynynen, M. M. and R. A. Khalil (2006). "The vascular endothelin system in hypertension-- recent patents and discoveries." Recent Pat Cardiovasc Drug Discov **1**(1): 95-108.
- Ichiki, T., B. K. Huntley, D. M. Heublein, S. M. Sandberg, P. M. McKie, F. L. Martin, M. Jougasaki and J. C. Burnett, Jr. (2011). "Corin is present in the normal human heart, kidney, and blood, with pro-B-type natriuretic peptide processing in the circulation." Clin Chem **57**(1): 40-47.

- Iglarz, M. and E. L. Schiffrin (2003). "Role of endothelin-1 in hypertension." Curr Hypertens Rep **5**(2): 144-148.
- Imlay, J. A. (2013). "The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium." Nat Rev Microbiol **11**(7): 443-454.
- Inoguchi, T., T. Sonta, H. Tsubouchi, T. Etoh, M. Kakimoto, N. Sonoda, N. Sato, N. Sekiguchi, K. Kobayashi, H. Sumimoto, H. Utsumi and H. Nawata (2003). "Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase." J Am Soc Nephrol **14**(8 Suppl 3): S227-232.
- Intengan, H. D. and E. L. Schiffrin (2000). "Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants." Hypertension **36**(3): 312-318.
- Intengan, H. D. and E. L. Schiffrin (2001). "Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis." Hypertension **38**(3 Pt 2): 581-587.
- Irani, K. (2000). "Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling." Circ Res **87**(3): 179-183.
- Itoh, H., R. E. Pratt, M. Ohno and V. J. Dzau (1992). "Atrial natriuretic polypeptide as a novel antigrowth factor of endothelial cells." Hypertension **19**(6 Pt 2): 758-761.
- Iyer, A., V. Chan and L. Brown (2010). "The DOCA-Salt Hypertensive Rat as a Model of Cardiovascular Oxidative and Inflammatory Stress." Curr Cardiol Rev **6**(4): 291-297.
- Jamieson, J. D. and G. E. Palade (1964). "Specific Granules in Atrial Muscle Cells." J Cell Biol **23**: 151-172.
- Jena, N. R. (2012). "DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair." J Biosci **37**(3): 503-517.

- Jesmin, S., S. Zaedi, S. Maeda, H. Togashi, I. Yamaguchi, K. Goto and T. Miyauchi (2006). "Endothelin antagonism suppresses plasma and cardiac endothelin-1 levels in SHRSPs at the typical hypertensive stage." Exp Biol Med (Maywood) **231**(6): 919-924.
- Jiang, D., D. Li, L. Cao, L. Wang, S. Zhu, T. Xu, C. Wang and D. Pan (2014). "Positive feedback regulation of proliferation in vascular smooth muscle cells stimulated by lipopolysaccharide is mediated through the TLR 4/Rac1/Akt pathway." PLoS One **9**(3): e92398.
- Jing, L., J. Zhang, J. Sun, F. Guo, X. An, K. Yang and P. A. Li (2011). "Inhibition of extracellular signal-regulated kinases ameliorates hypertension-induced renal vascular remodeling in rat models." Int J Mol Sci **12**(12): 8333-8346.
- Jing, L., J. Z. Zhang, Y. L. Wang and F. Y. Guo (2006). "Over-expression of extracellular signal-regulated kinase in vascular smooth muscle cell of hypertensive rats." Chin Med Sci J **21**(1): 36-40.
- Johnson, D. G., J. K. Schwarz, W. D. Cress and J. R. Nevins (1993). "Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase." Nature **365**(6444): 349-352.
- Jones, S. M. and A. Kazlauskas (2001). "Growth-factor-dependent mitogenesis requires two distinct phases of signalling." Nat Cell Biol **3**(2): 165-172.
- Kamata, T. (2009). "Roles of Nox1 and other Nox isoforms in cancer development." Cancer Sci **100**(8): 1382-1388.
- Kambayashi, Y., S. Bardhan, K. Takahashi, S. Tsuzuki, H. Inui, T. Hamakubo and T. Inagami (1993). "Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition." J Biol Chem **268**(33): 24543-24546.
- Kangawa, K., Y. Tawaragi, S. Oikawa, A. Mizuno, Y. Sakuragawa, H. Nakazato, A. Fukuda, N. Minamino and H. Matsuo (1984). "Identification of rat gamma atrial natriuretic polypeptide and characterization of the cDNA encoding its precursor." Nature **312**(5990): 152-155.
- Karp, G. (2013). Cell and Molecular Biology : Concepts and Experiments. Hoboken,NJ, Wiley.

- Kaschina, E. and T. Unger (2003). "Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function." Blood Press **12**(2): 70-88.
- Katz, M., I. Amit and Y. Yarden (2007). "Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases." Biochim Biophys Acta **1773**(8): 1161-1176.
- Kazlauskas, A. (1994). "Receptor tyrosine kinases and their targets." Curr Opin Genet Dev **4**(1): 5-14.
- Kazlauskas, A. and J. A. Cooper (1989). "Autophosphorylation of the PDGF receptor in the kinase insert region regulates interactions with cell proteins." Cell **58**(6): 1121-1133.
- Kearney, P. M., M. Whelton, K. Reynolds, P. Muntner, P. K. Whelton and J. He (2005). "Global burden of hypertension: analysis of worldwide data." Lancet **365**(9455): 217-223.
- Kelly, J. D., B. A. Haldeman, F. J. Grant, M. J. Murray, R. A. Seifert, D. F. Bowen-Pope, J. A. Cooper and A. Kazlauskas (1991). "Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates PDGF receptor subunit dimerization and intersubunit trans-phosphorylation." J Biol Chem **266**(14): 8987-8992.
- Khambata, R. S., C. M. Panayiotou and A. J. Hobbs (2011). "Natriuretic peptide receptor-3 underpins the disparate regulation of endothelial and vascular smooth muscle cell proliferation by C-type natriuretic peptide." Br J Pharmacol **164**(2b): 584-597.
- Khansari, N., Y. Shakiba and M. Mahmoudi (2009). "Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer." Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov **3**(1): 73-80.
- Kim, J., S. Ahn, K. Rajagopal and R. J. Lefkowitz (2009). "Independent beta-arrestin2 and Gq/protein kinase Czeta pathways for ERK stimulated by angiotensin type 1A receptors in vascular smooth muscle cells converge on transactivation of the epidermal growth factor receptor." J Biol Chem **284**(18): 11953-11962.
- Kirchengast, M., K. Witte, K. Stolpe, L. Schilling, P. I. Nedvetsky, H. H. Schmidt and B. Lemmer (2005). "Effects of chronic endothelin ET(A) receptor blockade on blood

- pressure and vascular formation of cyclic guanosine-3',5'-monophosphate in spontaneously hypertensive rats." Arzneimittelforschung **55**(9): 498-504.
- Kisch, B. (1956). "Electron microscopy of the atrium of the heart. I. Guinea pig." Exp Med Surg **14**(2-3): 99-112.
- Kitada, K., M. Ohkita and Y. Matsumura (2012). "Pathological Importance of the Endothelin-1/ET(B) Receptor System on Vascular Diseases." Cardiol Res Pract **2012**: 731970.
- Koff, A., A. Giordano, D. Desai, K. Yamashita, J. W. Harper, S. Elledge, T. Nishimoto, D. O. Morgan, B. R. Franza and J. M. Roberts (1992). "Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle." Science **257**(5077): 1689-1694.
- Koledova, Z., L. R. Kafkova, L. Calabkova, V. Krystof, P. Dolezel and V. Divoky (2010). "Cdk2 inhibition prolongs G1 phase progression in mouse embryonic stem cells." Stem Cells Dev **19**(2): 181-194.
- Kondo, S., N. Senoo-Matsuda, Y. Hiromi and M. Miura (2006). "DRONC coordinates cell death and compensatory proliferation." Mol Cell Biol **26**(19): 7258-7268.
- Korsgaard, N., C. Aalkjaer, A. M. Heagerty, A. S. Izzard and M. J. Mulvany (1993). "Histology of subcutaneous small arteries from patients with essential hypertension." Hypertension **22**(4): 523-526.
- Krauss, G. (2008). Biochemistry of signal transduction and regulation. Weinheim Great Britain, Wiley-VCH.
- Kumar, A., M. Marques and A. C. Carrera (2006). "Phosphoinositide 3-kinase activation in late G1 is required for c-Myc stabilization and S phase entry." Mol Cell Biol **26**(23): 9116-9125.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (1996). "Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines." Bioessays **18**(7): 567-577.

- Lambright, D. G., J. P. Noel, H. E. Hamm and P. B. Sigler (1994). "Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein." Nature **369**(6482): 621-628.
- Landmesser, U., S. Dikalov, S. R. Price, L. McCann, T. Fukai, S. M. Holland, W. E. Mitch and D. G. Harrison (2003). "Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension." J Clin Invest **111**(8): 1201-1209.
- Laplante, M. A. and J. de Champlain (2006). "The interrelation of the angiotensin and endothelin systems on the modulation of NAD(P)H oxidase." Can J Physiol Pharmacol **84**(1): 21-28.
- Laplante, M. A., R. Wu, P. Moreau and J. de Champlain (2005). "Endothelin mediates superoxide production in angiotensin II-induced hypertension in rats." Free Radic Biol Med **38**(5): 589-596.
- Lappas, G., G. B. Daou and M. B. Anand-Srivastava (2005). "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**(12): 2251-2261.
- Lassegue, B. and K. K. Griendling (2004). "Reactive oxygen species in hypertension; An update." Am J Hypertens **17**(9): 852-860.
- Le Cam, L., J. Polanowska, E. Fabbrizio, M. Olivier, A. Philips, E. Ng Eaton, M. Classon, Y. Geng and C. Sardet (1999). "Timing of cyclin E gene expression depends on the regulated association of a bipartite repressor element with a novel E2F complex." EMBO J **18**(7): 1878-1890.
- Lee, D. C., S. E. Fenton, E. A. Berkowitz and M. A. Hissong (1995). "Transforming growth factor alpha: expression, regulation, and biological activities." Pharmacol Rev **47**(1): 51-85.
- Lee, S. J., W. J. Kim and S. K. Moon (2009). "TNF-alpha regulates vascular smooth muscle cell responses in genetic hypertension." Int Immunopharmacol **9**(7-8): 837-843.

- Leevers, S. J., B. Vanhaesebroeck and M. D. Waterfield (1999). "Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage." Curr Opin Cell Biol **11**(2): 219-225.
- Lefkowitz, R. J. (2007). "Seven transmembrane receptors: something old, something new." Acta Physiol (Oxf) **190**(1): 9-19.
- Leitman, D. C., J. W. Andresen, T. Kuno, Y. Kamisaki, J. K. Chang and F. Murad (1986). "Identification of multiple binding sites for atrial natriuretic factor by affinity cross-linking in cultured endothelial cells." J Biol Chem **261**(25): 11650-11655.
- Lelievre, V., N. Pineau, Z. Hu, Y. Ioffe, J. Y. Byun, J. M. Muller and J. A. Waschek (2001). "Proliferative actions of natriuretic peptides on neuroblastoma cells. Involvement of guanylyl cyclase and non-guanylyl cyclase pathways." J Biol Chem **276**(47): 43668-43676.
- Lemmon, M. A. and J. Schlessinger (2010). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell **141**(7): 1117-1134.
- Leu, T. H. and M. C. Maa (2003). "Functional implication of the interaction between EGF receptor and c-Src." Front Biosci **8**: s28-38.
- Levin, E. R. and H. J. Frank (1991). "Natriuretic peptides inhibit rat astroglial proliferation: mediation by C receptor." Am J Physiol **261**(2 Pt 2): R453-457.
- Li, H., H. Simon, T. M. Bocan and J. T. Peterson (2000). "MMP/TIMP expression in spontaneously hypertensive heart failure rats: the effect of ACE- and MMP-inhibition." Cardiovasc Res **46**(2): 298-306.
- Li, L., G. D. Fink, S. W. Watts, C. A. Northcott, J. J. Galligan, P. J. Pagano and A. F. Chen (2003). "Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension." Circulation **107**(7): 1053-1058.
- Li, N., A. Batzer, R. Daly, V. Yajnik, E. Skolnik, P. Chardin, D. Bar-Sagi, B. Margolis and J. Schlessinger (1993). "Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling." Nature **363**(6424): 85-88.

- Li, P. F., R. Dietz and R. von Harsdorf (1997). "Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells." Circulation **96**(10): 3602-3609.
- Li, T. J., Y. L. Chen, C. J. Gua, S. J. Xue, S. M. Ma and X. D. Li (2015). "MicroRNA 181b promotes vascular smooth muscle cells proliferation through activation of PI3K and MAPK pathways." Int J Clin Exp Pathol **8**(9): 10375-10384.
- Li, X. C., G. X. Tong, Y. Zhang, S. X. Liu, Q. H. Jin, H. H. Chen and P. Chen (2010). "Neferine inhibits angiotensin II-stimulated proliferation in vascular smooth muscle cells through heme oxygenase-1." Acta Pharmacol Sin **31**(6): 679-686.
- Li, Y. and M. B. Anand-Srivastava (2002). "Inactivation of enhanced expression of G(i) proteins by pertussis toxin attenuates the development of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats." Circ Res **91**(3): 247-254.
- Li, Y. and M. B. Anand-Srivastava (2014). "Regulation of G α protein expression by vasoactive peptides in hypertension: molecular mechanisms." Indian J Biochem Biophys **51**(6): 467-475.
- Li, Y., S. Hashim and M. B. Anand-Srivastava (2006). "Intracellular peptides of natriuretic peptide receptor-C inhibit vascular hypertrophy via G α /MAP kinase signaling pathways." Cardiovasc Res **72**(3): 464-472.
- Li, Y., G. Lappas and M. B. Anand-Srivastava (2007). "Role of oxidative stress in angiotensin II-induced enhanced expression of G α proteins and adenylyl cyclase signaling in A10 vascular smooth muscle cells." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(4): H1922-1930.
- Li, Y., L. O. Levesque and M. B. Anand-Srivastava (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**(6): H1959-1967.

- Li, Y., O. Sarkar, M. Brochu and M. B. Anand-Srivastava (2014). "Natriuretic peptide receptor-C attenuates hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of nitroxidative stress and Gi proteins." Hypertension **63**(4): 846-855.
- Liang, J. and J. M. Slingerland (2003). "Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression." Cell Cycle **2**(4): 339-345.
- Liebmann, C. (2011). "EGF receptor activation by GPCRs: an universal pathway reveals different versions." Mol Cell Endocrinol **331**(2): 222-231.
- Lifton, R. P., A. G. Gharavi and D. S. Geller (2001). "Molecular mechanisms of human hypertension." Cell **104**(4): 545-556.
- Lim, S. and P. Kaldis (2013). "Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation." Development **140**(15): 3079-3093.
- Little, P. J. (2013). "GPCR responses in vascular smooth muscle can occur predominantly through dual transactivation of kinase receptors and not classical Galphaq protein signalling pathways." Life Sci **92**(20-21): 951-956.
- Liu, C., T. Su, F. Li, L. Li, X. Qin, W. Pan, F. Feng, F. Chen, D. Liao and L. Chen (2010). "PI3K/Akt signaling transduction pathway is involved in rat vascular smooth muscle cell proliferation induced by apelin-13." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **42**(6): 396-402.
- Liu, G., H. Hitomi, N. Hosomi, B. Lei, N. Pelisch, D. Nakano, H. Kiyomoto, H. Ma and A. Nishiyama (2010). "Mechanical stretch potentiates angiotensin II-induced proliferation in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells." Hypertens Res **33**(12): 1250-1257.
- Ljuca, F. and G. Drevensek (2010). "Endothelin-1 induced vascular smooth muscle cell proliferation is mediated by cytochrome p-450 arachidonic acid metabolites." Bosn J Basic Med Sci **10**(3): 223-226.

- Lopez-Ongil, S., M. Saura, C. Zaragoza, L. Gonzalez-Santiago, M. Rodriguez-Puyol, C. J. Lowenstein and D. Rodriguez-Puyol (2002). "Hydrogen peroxide regulation of bovine endothelin-converting enzyme-1." Free Radic Biol Med **32**(5): 406-413.
- Lu, M. H., C. F. Chao, S. H. Tsai, J. Y. Chen and L. T. Chang (2006). "Autocrine effects of endothelin on in vitro proliferation of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive and normotensive rats." Clin Exp Hypertens **28**(5): 463-474.
- Lukas, J., M. Pagano, Z. Staskova, G. Draetta and J. Bartek (1994). "Cyclin D1 protein oscillates and is essential for cell cycle progression in human tumour cell lines." Oncogene **9**(3): 707-718.
- Lyle, A. N. and K. K. Griendling (2006). "Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species." Physiology (Bethesda) **21**: 269-280.
- Maack, T., M. Suzuki, F. A. Almeida, D. Nussenzveig, R. M. Scarborough, G. A. McEnroe and J. A. Lewicki (1987). "Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor." Science **238**(4827): 675-678.
- Machado-Neto, J. A., P. Favaro, M. Lazarini, F. F. Costa, S. T. Olalla Saad and F. Traina (2011). "Knockdown of insulin receptor substrate 1 reduces proliferation and downregulates Akt/mTOR and MAPK pathways in K562 cells." Biochim Biophys Acta **1813**(8): 1404-1411.
- Magalhaes, A. C., H. Dunn and S. S. Ferguson (2012). "Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins." Br J Pharmacol **165**(6): 1717-1736.
- Mailand, N. and J. F. Diffley (2005). "CDKs promote DNA replication origin licensing in human cells by protecting Cdc6 from APC/C-dependent proteolysis." Cell **122**(6): 915-926.
- Marcil, J., C. Thibault and M. B. Anand-Srivastava (1997). "Enhanced expression of Gi-protein precedes the development of blood pressure in spontaneously hypertensive rats." J Mol Cell Cardiol **29**(3): 1009-1022.

- Marcotte, R., H. W. Smith, V. Sanguin-Gendreau, R. V. McDonough and W. J. Muller (2012). "Mammary epithelial-specific disruption of c-Src impairs cell cycle progression and tumorigenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(8): 2808-2813.
- Martinez Munoz, C., J. A. Post, A. J. Verkleij, C. T. Verrips and J. Boonstra (2001). "The effect of hydrogen peroxide on the cyclin D expression in fibroblasts." Cell Mol Life Sci **58**(7): 990-996.
- Mbong, N. and M. B. Anand-Srivastava (2012). "Hydrogen peroxide enhances the expression of Gialpha proteins in aortic vascular smooth cells: role of growth factor receptor transactivation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **302**(8): H1591-1602.
- McAlister, F. A., K. Wilkins, M. Joffres, F. H. Leenen, G. Fodor, M. Gee, M. S. Tremblay, R. Walker, H. Johansen and N. Campbell (2011). "Changes in the rates of awareness, treatment and control of hypertension in Canada over the past two decades." CMAJ **183**(9): 1007-1013.
- McConnaughey, M. M., J. S. McConnaughey and A. J. Ingenito (1999). "Practical considerations of the pharmacology of angiotensin receptor blockers." J Clin Pharmacol **39**(6): 547-559.
- McCormick, F. (1994). "Activators and effectors of ras p21 proteins." Curr Opin Genet Dev **4**(1): 71-76.
- McKillop, I. H., C. M. Schmidt, P. A. Cahill and J. V. Sitzmann (1999). "Inhibitory guanine nucleotide regulatory protein activation of mitogen-activated protein kinase in experimental hepatocellular carcinoma in vitro." Eur J Gastroenterol Hepatol **11**(7): 761-768.
- Mebratu, Y. and Y. Tesfaigzi (2009). "How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer?" Cell Cycle **8**(8): 1168-1175.
- Medema, R. H., G. J. Kops, J. L. Bos and B. M. Burgering (2000). "AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1." Nature **404**(6779): 782-787.

- Mehta, P. K. and K. K. Griendling (2007). "Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system." Am J Physiol Cell Physiol **292**(1): C82-97.
- Meloche, S. and J. Pouyssegur (2007). "The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition." Oncogene **26**(22): 3227-3239.
- Meloche, S., K. Seuwen, G. Pages and J. Pouyssegur (1992). "Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity." Mol Endocrinol **6**(5): 845-854.
- Menon, S. G. and P. C. Goswami (2007). "A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new." Oncogene **26**(8): 1101-1109.
- Mii, S., R. A. Khalil, K. G. Morgan, J. A. Ware and K. C. Kent (1996). "Mitogen-activated protein kinase and proliferation of human vascular smooth muscle cells." Am J Physiol **270**(1 Pt 2): H142-150.
- Mikoshiba, K. (2007). "IP3 receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts." J Neurochem **102**(5): 1426-1446.
- Miller, J. J., M. K. Summers, D. V. Hansen, M. V. Nachury, N. L. Lehman, A. Loktev and P. K. Jackson (2006). "Emi1 stably binds and inhibits the anaphase-promoting complex/cyclosome as a pseudosubstrate inhibitor." Genes Dev **20**(17): 2410-2420.
- Millette, E., B. H. Rauch, O. Defawe, R. D. Kenagy, G. Daum and A. W. Clowes (2005). "Platelet-derived growth factor-BB-induced human smooth muscle cell proliferation depends on basic FGF release and FGFR-1 activation." Circ Res **96**(2): 172-179.
- Minetti, G. C., J. N. Feige, F. Bombard, A. Heier, F. Morvan, B. Nurnberg, V. Leiss, L. Birnbaumer, D. J. Glass and M. Fornaro (2014). "Galphai2 signaling is required for skeletal muscle growth, regeneration, and satellite cell proliferation and differentiation." Mol Cell Biol **34**(4): 619-630.

- Misono, K. S., R. T. Grammer, H. Fukumi and T. Inagami (1984). "Rat atrial natriuretic factor: isolation, structure and biological activities of four major peptides." Biochem Biophys Res Commun **123**(2): 444-451.
- Mixon, M. B., E. Lee, D. E. Coleman, A. M. Berghuis, A. G. Gilman and S. R. Sprang (1995). "Tertiary and quaternary structural changes in Gi alpha 1 induced by GTP hydrolysis." Science **270**(5238): 954-960.
- Modi, P. K., N. Komaravelli, N. Singh and P. Sharma (2012). "Interplay between MEK-ERK signaling, cyclin D1, and cyclin-dependent kinase 5 regulates cell cycle reentry and apoptosis of neurons." Mol Biol Cell **23**(18): 3722-3730.
- Mollereau, B., A. Perez-Garijo, A. Bergmann, M. Miura, O. Gerlitz, H. D. Ryoo, H. Steller and G. Morata (2013). "Compensatory proliferation and apoptosis-induced proliferation: a need for clarification." Cell Death Differ **20**(1): 181.
- Moncada, S., R. M. Palmer and E. A. Higgs (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." Pharmacol Rev **43**(2): 109-142.
- Montezano, A. C. and R. M. Touyz (2014). "Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research." Antioxid Redox Signal **20**(1): 164-182.
- Moodie, S. A., B. M. Willumsen, M. J. Weber and A. Wolfman (1993). "Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase." Science **260**(5114): 1658-1661.
- Morgan, D. O. (1997). "Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors." Annu Rev Cell Dev Biol **13**: 261-291.
- Morishita, R., J. Higaki, M. Miyazaki and T. Ogihara (1992). "Possible role of the vascular renin-angiotensin system in hypertension and vascular hypertrophy." Hypertension **19**(2 Suppl): II62-67.
- Mouawad, R., Y. Li and M. B. Anand-Srivastava (2004). "Atrial natriuretic peptide-C receptor-induced attenuation of adenylyl cyclase signaling activates phosphatidylinositol turnover in A10 vascular smooth muscle cells." Mol Pharmacol **65**(4): 917-924.

- Moxham, C. M., Y. Hod and C. C. Malbon (1993). "Induction of G alpha i2-specific antisense RNA in vivo inhibits neonatal growth." Science **260**(5110): 991-995.
- Muise-Helmericks, R. C., H. L. Grimes, A. Bellacosa, S. E. Malstrom, P. N. Tsichlis and N. Rosen (1998). "Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway." J Biol Chem **273**(45): 29864-29872.
- Mukoyama, M., M. Nakajima, M. Horiuchi, H. Sasamura, R. E. Pratt and V. J. Dzau (1993). "Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors." J Biol Chem **268**(33): 24539-24542.
- Mukoyama, M., K. Nakao, K. Hosoda, S. Suga, Y. Saito, Y. Ogawa, G. Shirakami, M. Jougasaki, K. Obata, H. Yasue and et al. (1991). "Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide." J Clin Invest **87**(4): 1402-1412.
- Mukoyama, M., K. Nakao, Y. Saito, Y. Ogawa, K. Hosoda, S. Suga, G. Shirakami, M. Jougasaki and H. Imura (1990). "Increased human brain natriuretic peptide in congestive heart failure." N Engl J Med **323**(11): 757-758.
- Mulvany, M. J., U. Baandrup and H. J. Gundersen (1985). "Evidence for hyperplasia in mesenteric resistance vessels of spontaneously hypertensive rats using a three-dimensional disector." Circ Res **57**(5): 794-800.
- Murphy, T. J., R. W. Alexander, K. K. Griendling, M. S. Runge and K. E. Bernstein (1991). "Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor." Nature **351**(6323): 233-236.
- Murthy, K. S. and G. M. Makhlof (1999). "Identification of the G protein-activating domain of the natriuretic peptide clearance receptor (NPR-C)." J Biol Chem **274**(25): 17587-17592.
- Murthy, K. S., B. Teng, J. Jin and G. M. Makhlof (1998). "G protein-dependent activation of smooth muscle eNOS via natriuretic peptide clearance receptor." Am J Physiol **275**(6 Pt 1): C1409-1416.

- Muslin, A. J. (2008). "MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets." Clin Sci (Lond) **115**(7): 203-218.
- Nagase, M., T. Katafuchi, S. Hirose and T. Fujita (1997). "Tissue distribution and localization of natriuretic peptide receptor subtypes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats." J Hypertens **15**(11): 1235-1243.
- Nakamura, K., K. Fushimi, H. Kouchi, K. Mihara, M. Miyazaki, T. Ohe and M. Namba (1998). "Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II." Circulation **98**(8): 794-799.
- Neer, E. J. (1995). "Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals." Cell **80**(2): 249-257.
- Noel, J. P., H. E. Hamm and P. B. Sigler (1993). "The 2.2 Å crystal structure of transducin-alpha complexed with GTP gamma S." Nature **366**(6456): 654-663.
- Nonoyama, A., A. Masuda, K. Kasahara, T. Mogi and T. Kagawa (1976). "Total rupture of the left main bronchus successfully repaired nine years after injury." Ann Thorac Surg **21**(5): 445-448.
- Nunez, D. J., M. C. Dickson and M. J. Brown (1992). "Natriuretic peptide receptor mRNAs in the rat and human heart." J Clin Invest **90**(5): 1966-1971.
- Nussenzveig, D. R., J. A. Lewicki and T. Maack (1990). "Cellular mechanisms of the clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor." J Biol Chem **265**(34): 20952-20958.
- Ocaranza, M. P. and J. E. Jalil (2010). "Mitogen-activated protein kinases as biomarkers of hypertension or cardiac pressure overload." Hypertension **55**(1): 23-25.
- Offermanns, S. (2003). "G-proteins as transducers in transmembrane signalling." Prog Biophys Mol Biol **83**(2): 101-130.
- Ogrunc, M., R. Di Micco, M. Lontos, L. Bombardelli, M. Mione, M. Fumagalli, V. G. Gorgoulis and F. d'Adda di Fagagna (2014). "Oncogene-induced reactive oxygen species

- fuel hyperproliferation and DNA damage response activation." Cell Death Differ **21**(6): 998-1012.
- Ohtani, K., J. DeGregori and J. R. Nevins (1995). "Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(26): 12146-12150.
- Ohtsu, H., P. J. Dempsey, G. D. Frank, E. Brailoiu, S. Higuchi, H. Suzuki, H. Nakashima, K. Eguchi and S. Eguchi (2006). "ADAM17 mediates epidermal growth factor receptor transactivation and vascular smooth muscle cell hypertrophy induced by angiotensin II." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(9): e133-137.
- Okamoto, K. and K. Aoki (1963). "Development of a strain of spontaneously hypertensive rats." Jpn Circ J **27**: 282-293.
- Oldham, S. and E. Hafen (2003). "Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control." Trends Cell Biol **13**(2): 79-85.
- Oldham, W. M. and H. E. Hamm (2006). "Structural basis of function in heterotrimeric G proteins." Q Rev Biophys **39**(2): 117-166.
- Oliveira, R. J., V. N. de Oliveira, S. R. Deconte, L. K. Calabria, A. da Silva Moraes and F. S. Espindola (2014). "Phaseolamin treatment prevents oxidative stress and collagen deposition in the hearts of streptozotocin-induced diabetic rats." Diab Vasc Dis Res **11**(2): 110-117.
- Oparil, S., M. A. Zaman and D. A. Calhoun (2003). "Pathogenesis of hypertension." Ann Intern Med **139**(9): 761-776.
- Orlando, S., E. Gallastegui, A. Besson, G. Abril, R. Aligue, M. J. Pujol and O. Bachs (2015). "p27Kip1 and p21Cip1 collaborate in the regulation of transcription by recruiting cyclin-Cdk complexes on the promoters of target genes." Nucleic Acids Res **43**(14): 6860-6873.
- Oudit, G. Y., H. Sun, B. G. Kerfant, M. A. Crackower, J. M. Penninger and P. H. Backx (2004). "The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease." J Mol Cell Cardiol **37**(2): 449-471.

- Overland, A. C. and P. A. Insel (2015). "Heterotrimeric G proteins directly regulate MMP14/membrane type-1 matrix metalloprotease: a novel mechanism for GPCR-EGFR transactivation." J Biol Chem **290**(16): 9941-9947.
- Pagano, M. and M. B. Anand-Srivastava (2001). "Cytoplasmic domain of natriuretic peptide receptor C constitutes Gi activator sequences that inhibit adenylyl cyclase activity." J Biol Chem **276**(25): 22064-22070.
- Palaparti, A., Y. Li and M. B. Anand-Srivastava (2000). "Inhibition of atrial natriuretic peptide (ANP) C receptor expression by antisense oligodeoxynucleotides in A10 vascular smooth-muscle cells is associated with attenuation of ANP-C-receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase." Biochem J **346 Pt 2**: 313-320.
- Pandey, K. N. (2014). "Guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A signaling antagonizes phosphoinositide hydrolysis, Ca(2+) release, and activation of protein kinase C." Front Mol Neurosci **7**: 75.
- Pardee, A. B. (1974). "A restriction point for control of normal animal cell proliferation." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(4): 1286-1290.
- Park, J. B., R. M. Touyz, X. Chen and E. L. Schiffrin (2002). "Chronic treatment with a superoxide dismutase mimetic prevents vascular remodeling and progression of hypertension in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats." Am J Hypertens **15**(1 Pt 1): 78-84.
- Patel, J. H., A. P. Loboda, M. K. Showe, L. C. Showe and S. B. McMahon (2004). "Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC." Nat Rev Cancer **4**(7): 562-568.
- Pawson, T. (1995). "Protein modules and signalling networks." Nature **373**(6515): 573-580.
- Pedram, A., M. Razandi, R. M. Hu and E. R. Levin (1997). "Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion." J Biol Chem **272**(27): 17097-17103.

- Perez-Garijo, A., F. A. Martin and G. Morata (2004). "Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*." Development **131**(22): 5591-5598.
- Pierce, K. L., R. T. Premont and R. J. Lefkowitz (2002). "Seven-transmembrane receptors." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(9): 639-650.
- Pierce, K. L., A. Tohgo, S. Ahn, M. E. Field, L. M. Luttrell and R. J. Lefkowitz (2001). "Epidermal growth factor (EGF) receptor-dependent ERK activation by G protein-coupled receptors: a co-culture system for identifying intermediates upstream and downstream of heparin-binding EGF shedding." J Biol Chem **276**(25): 23155-23160.
- Plotnikov, A., E. Zehorai, S. Procaccia and R. Seger (2011). "The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation." Biochim Biophys Acta **1813**(9): 1619-1633.
- Pollock, D. M. (2005). "Endothelin, angiotensin, and oxidative stress in hypertension." Hypertension **45**(4): 477-480.
- Porter, J. G., A. Arfsten, F. Fuller, J. A. Miller, L. C. Gregory and J. A. Lewicki (1990). "Isolation and functional expression of the human atrial natriuretic peptide clearance receptor cDNA." Biochem Biophys Res Commun **171**(2): 796-803.
- Potter, L. R., S. Abbey-Hosch and D. M. Dickey (2006). "Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions." Endocr Rev **27**(1): 47-72.
- Potter, L. R., A. R. Yoder, D. R. Flora, L. K. Antos and D. M. Dickey (2009). "Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications." Handb Exp Pharmacol(191): 341-366.
- Prenzel, N., O. M. Fischer, S. Streit, S. Hart and A. Ullrich (2001). "The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification." Endocr Relat Cancer **8**(1): 11-31.

Prenzel, N., E. Zwick, H. Daub, M. Leserer, R. Abraham, C. Wallasch and A. Ullrich (1999).

"EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF." Nature **402**(6764): 884-888.

Prenzel, N., E. Zwick, M. Leserer and A. Ullrich (2000). "Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Epidermal growth factor receptor: convergence point for signal integration and diversification." Breast Cancer Res **2**(3): 184-190.

Prins, B. A., M. J. Weber, R. M. Hu, A. Pedram, M. Daniels and E. R. Levin (1996). "Atrial natriuretic peptide inhibits mitogen-activated protein kinase through the clearance receptor. Potential role in the inhibition of astrocyte proliferation." J Biol Chem **271**(24): 14156-14162.

Quelle, D. E., R. A. Ashmun, S. A. Shurtleff, J. Y. Kato, D. Bar-Sagi, M. F. Roussel and C. J. Sherr (1993). "Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts." Genes Dev **7**(8): 1559-1571.

Radhika, V. and N. Dhanasekaran (2001). "Transforming G proteins." Oncogene **20**(13): 1607-1614.

Rahmutula, D., T. Nakayama, M. Soma, K. Kosuge, N. Aoi, Y. Izumi, K. Kanmatsuse and Y. Ozawa (2002). "Structure and polymorphisms of the human natriuretic peptide receptor C gene." Endocrine **17**(2): 85-90.

Raines, B.-P. D. F., Ross R (1990). Platelet-Derived Growth Factor. Peptide Growth Factors and Their Receptors. Heidelberg, Springer-Verlag: 173-262.

Rameh, L. E. and L. C. Cantley (1999). "The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function." J Biol Chem **274**(13): 8347-8350.

Rao, G. N. and B. C. Berk (1992). "Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression." Circ Res **70**(3): 593-599.

Rapoport, R. M. (1986). "Cyclic guanosine monophosphate inhibition of contraction may be mediated through inhibition of phosphatidylinositol hydrolysis in rat aorta." Circ Res **58**(3): 407-410.

- Remmers, A. E., C. Engel, M. Liu and R. R. Neubig (1999). "Interdomain interactions regulate GDP release from heterotrimeric G proteins." Biochemistry **38**(42): 13795-13800.
- Ren, B., H. Cam, Y. Takahashi, T. Volkert, J. Terragni, R. A. Young and B. D. Dynlacht (2002). "E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints." Genes Dev **16**(2): 245-256.
- Rhee, S. G., T. S. Chang, Y. S. Bae, S. R. Lee and S. W. Kang (2003). "Cellular regulation by hydrogen peroxide." J Am Soc Nephrol **14**(8 Suppl 3): S211-215.
- Rizzoni, D., L. Rodella, E. Porteri, R. Rezzani, D. Guelfi, A. Piccoli, M. Castellano, M. L. Muiesan, R. Bianchi and E. A. Rosei (2000). "Time course of apoptosis in small resistance arteries of spontaneously hypertensive rats." J Hypertens **18**(7): 885-891.
- Robinson, M. J. and M. H. Cobb (1997). "Mitogen-activated protein kinase pathways." Curr Opin Cell Biol **9**(2): 180-186.
- Robitaille, C., S. Dai, C. Waters, L. Loukine, C. Bancej, S. Quach, J. Ellison, N. Campbell, K. Tu, K. Reimer, R. Walker, M. Smith, C. Blais and H. Quan (2012). "Diagnosed hypertension in Canada: incidence, prevalence and associated mortality." CMAJ **184**(1): E49-56.
- Rose, R. A. and W. R. Giles (2008). "Natriuretic peptide C receptor signalling in the heart and vasculature." J Physiol **586**(2): 353-366.
- Roskopf, D., E. Fromter and W. Siffert (1993). "Hypertensive sodium-proton exchanger phenotype persists in immortalized lymphoblasts from essential hypertensive patients. A cell culture model for human hypertension." J Clin Invest **92**(5): 2553-2559.
- Rozengurt, E., J. Sinnott-Smith and K. Kisfalvi (2010). "Crosstalk between insulin/insulin-like growth factor-1 receptors and G protein-coupled receptor signaling systems: a novel target for the antidiabetic drug metformin in pancreatic cancer." Clin Cancer Res **16**(9): 2505-2511.

- Rubattu, S., S. Sciarretta, A. Morriello, C. Calvieri, A. Battistoni and M. Volpe (2010). "NPR-C: a component of the natriuretic peptide family with implications in human diseases." J Mol Med (Berl) **88**(9): 889-897.
- Ruef, J., M. Moser, W. Kubler and C. Bode (2001). "Induction of endothelin-1 expression by oxidative stress in vascular smooth muscle cells." Cardiovasc Pathol **10**(6): 311-315.
- Saha, S., Y. Li and M. B. Anand-Srivastava (2008a). "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**(4): 190-198.
- Saha, S., Y. Li, G. Lappas and M. B. Anand-Srivastava (2008b). "Activation of natriuretic peptide receptor-C attenuates the enhanced oxidative stress in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats: implication of G α protein." J Mol Cell Cardiol **44**(2): 336-344.
- Saito, S., G. D. Frank, M. Mifune, M. Ohba, H. Utsunomiya, E. D. Motley, T. Inagami and S. Eguchi (2002). "Ligand-independent trans-activation of the platelet-derived growth factor receptor by reactive oxygen species requires protein kinase C-delta and c-Src." J Biol Chem **277**(47): 44695-44700.
- Salzano, S., P. Checconi, E. M. Hanschmann, C. H. Lillig, L. D. Bowler, P. Chan, D. Vaudry, M. Mengozzi, L. Coppo, S. Sacre, K. R. Atkuri, B. Sahaf, L. A. Herzenberg, L. A. Herzenberg, L. Mullen and P. Ghezzi (2014). "Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(33): 12157-12162.
- Sanchez, M., M. Galisteo, R. Vera, I. C. Villar, A. Zarzuelo, J. Tamargo, F. Perez-Vizcaino and J. Duarte (2006). "Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats." J Hypertens **24**(1): 75-84.
- Sandoval, Y. H., Y. Li and M. B. Anand-Srivastava (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." Cell Signal **23**(11): 1716-1726.
- Sasaki, K., Y. Yamano, S. Bardhan, N. Iwai, J. J. Murray, M. Hasegawa, Y. Matsuda and T. Inagami (1991). "Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor." Nature **351**(6323): 230-233.
- Satoh, C., N. Fukuda, W. Y. Hu, M. Nakayama, H. Kishioka and K. Kanmatsuse (2001). "Role of endogenous angiotensin II in the increased expression of growth factors in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats." J Cardiovasc Pharmacol **37**(1): 108-118.
- Satyanarayana, A. and P. Kaldis (2009). "Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms." Oncogene **28**(33): 2925-2939.
- Savoie, P., J. de Champlain and M. B. Anand-Srivastava (1995). "C-type natriuretic peptide and brain natriuretic peptide inhibit adenylyl cyclase activity: interaction with ANF-R2/ANP-C receptors." FEBS Lett **370**(1-2): 6-10.
- Sawada, Y., M. Suda, H. Yokoyama, T. Kanda, T. Sakamaki, S. Tanaka, R. Nagai, S. Abe and T. Takeuchi (1997). "Stretch-induced hypertrophic growth of cardiocytes and processing of brain-type natriuretic peptide are controlled by proprotein-processing endoprotease furin." J Biol Chem **272**(33): 20545-20554.
- Saward, L. and P. Zahradka (1997). "Angiotensin II activates phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells." Circ Res **81**(2): 249-257.
- Sayeski, P. P., M. S. Ali, J. B. Harp, M. B. Marrero and K. E. Bernstein (1998). "Phosphorylation of p130Cas by angiotensin II is dependent on c-Src, intracellular Ca²⁺, and protein kinase C." Circ Res **82**(12): 1279-1288.
- Scaltriti, M. and J. Baselga (2006). "The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy." Clin Cancer Res **12**(18): 5268-5272.

- Schafer, F. Q. and G. R. Buettner (2001). "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple." Free Radic Biol Med **30**(11): 1191-1212.
- Schiffrin, E. L. (1995). "Endothelin: potential role in hypertension and vascular hypertrophy." Hypertension **25**(6): 1135-1143.
- Schiffrin, E. L. (2001). "Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease." Am J Hypertens **14**(6 Pt 2): 83S-89S.
- Schiffrin, E. L. (2012). "Vascular remodeling in hypertension: mechanisms and treatment." Hypertension **59**(2): 367-374.
- Schmidt, C. J., T. C. Thomas, M. A. Levine and E. J. Neer (1992). "Specificity of G protein beta and gamma subunit interactions." J Biol Chem **267**(20): 13807-13810.
- Schmidt, C. M., I. H. McKillop, P. A. Cahill and J. V. Sitzmann (1999). "The role of cAMP-MAPK signalling in the regulation of human hepatocellular carcinoma growth in vitro." Eur J Gastroenterol Hepatol **11**(12): 1393-1399.
- Schwarz, J. K., S. H. Devoto, E. J. Smith, S. P. Chellappan, L. Jakoi and J. R. Nevins (1993). "Interactions of the p107 and Rb proteins with E2F during the cell proliferation response." EMBO J **12**(3): 1013-1020.
- Sedeek, M. H., M. T. Llinas, H. Drummond, L. Fortepiani, S. R. Abram, B. T. Alexander, J. F. Reckelhoff and J. P. Granger (2003). "Role of reactive oxygen species in endothelin-induced hypertension." Hypertension **42**(4): 806-810.
- Seger, R. and E. G. Krebs (1995). "The MAPK signaling cascade." FASEB J **9**(9): 726-735.
- Sellitti, D. F., N. Koles and M. C. Mendonca (2011). "Regulation of C-type natriuretic peptide expression." Peptides **32**(9): 1964-1971.
- Serrano, M., G. J. Hannon and D. Beach (1993). "A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4." Nature **366**(6456): 704-707.

- Sherr, C. J. and F. McCormick (2002). "The RB and p53 pathways in cancer." Cancer Cell **2**(2): 103-112.
- Shichiri, M., M. Yokokura, F. Marumo and Y. Hirata (2000). "Endothelin-1 inhibits apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by nitric oxide and serum deprivation via MAP kinase pathway." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(4): 989-997.
- Shimada, K., M. Takahashi and K. Tanzawa (1994). "Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells." J Biol Chem **269**(28): 18275-18278.
- Shimkets, R. A., D. G. Warnock, C. M. Bositis, C. Nelson-Williams, J. H. Hansson, M. Schambelan, J. R. Gill, Jr., S. Ulick, R. V. Milora, J. W. Findling and et al. (1994). "Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel." Cell **79**(3): 407-414.
- Shimokawa, H. (2013). "Reactive oxygen species promote vascular smooth muscle cell proliferation." Circ Res **113**(9): 1040-1042.
- Shinzato, T., Y. Ohya, M. Nakamoto, A. Ishida and S. Takishita (2007). "Beneficial effects of pioglitazone on left ventricular hypertrophy in genetically hypertensive rats." Hypertens Res **30**(9): 863-873.
- Simon, F. and A. Stutzin (2008). "Protein kinase C-mediated phosphorylation of p47 phox modulates platelet-derived growth factor-induced H₂O₂ generation and cell proliferation in human umbilical vein endothelial cells." Endothelium **15**(4): 175-188.
- Simon, M. I., M. P. Strathmann and N. Gautam (1991). "Diversity of G proteins in signal transduction." Science **252**(5007): 802-808.
- Skowronska, M., M. Zielinska and J. Albrecht (2010). "Stimulation of natriuretic peptide receptor C attenuates accumulation of reactive oxygen species and nitric oxide synthesis in ammonia-treated astrocytes." J Neurochem **115**(4): 1068-1076.

- Son, Y., Y. K. Cheong, N. H. Kim, H. T. Chung, D. G. Kang and H. O. Pae (2011). "Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways?" J Signal Transduct **2011**: 792639.
- Son, Y., S. Kim, H. T. Chung and H. O. Pae (2013). "Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases." Methods Enzymol **528**: 27-48.
- Sprang, S. R. (1997). "G protein mechanisms: insights from structural analysis." Annu Rev Biochem **66**: 639-678.
- Srivastava, A. K. (2002). "High glucose-induced activation of protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells: a potential role in the pathogenesis of vascular dysfunction in diabetes (review)." Int J Mol Med **9**(1): 85-89.
- Stow, L. R., M. E. Jacobs, C. S. Wingo and B. D. Cain (2011). "Endothelin-1 gene regulation." FASEB J **25**(1): 16-28.
- Strehlow, K., S. Wassmann, M. Bohm and G. Nickenig (2000). "Angiotensin AT1 receptor over-expression in hypercholesterolaemia." Ann Med **32**(6): 386-389.
- Su, E. J., D. M. Lombardi, J. Wiener, M. J. Daemen, M. A. Reidy and S. M. Schwartz (1998). "Mitogenic effect of angiotensin II on rat carotid arteries and type II or III mesenteric microvessels but not type I mesenteric microvessels is mediated by endogenous basic fibroblast growth factor." Circ Res **82**(3): 321-327.
- Su, J., H. T. Xu, J. J. Yu, J. L. Gao, J. Lei, Q. S. Yin, B. Li, M. X. Pang, M. X. Su, W. J. Mi, S. H. Chen and G. Y. Lv (2015). "Luteolin Ameliorates Hypertensive Vascular Remodeling through Inhibiting the Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells." Evid Based Complement Alternat Med **2015**: 364876.
- Sudoh, T., K. Kangawa, N. Minamino and H. Matsuo (1988). "A new natriuretic peptide in porcine brain." Nature **332**(6159): 78-81.
- Sudoh, T., N. Minamino, K. Kangawa and H. Matsuo (1990). "C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain." Biochem Biophys Res Commun **168**(2): 863-870.

- Suga, S., K. Nakao, K. Hosoda, M. Mukoyama, Y. Ogawa, G. Shirakami, H. Arai, Y. Saito, Y. Kambayashi, K. Inouye and et al. (1992). "Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide." Endocrinology **130**(1): 229-239.
- Sundaresan, M., Z. X. Yu, V. J. Ferrans, K. Irani and T. Finkel (1995). "Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction." Science **270**(5234): 296-299.
- Sur, S. and D. K. Agrawal (2014). "Transactivation of EGFR by G protein-coupled receptor in the pathophysiology of intimal hyperplasia." Curr Vasc Pharmacol **12**(2): 190-201.
- Takahashi, T., T. Taniguchi, H. Konishi, U. Kikkawa, Y. Ishikawa and M. Yokoyama (1999). "Activation of Akt/protein kinase B after stimulation with angiotensin II in vascular smooth muscle cells." Am J Physiol **276**(6 Pt 2): H1927-1934.
- Takai, Y., T. Sasaki and T. Matozaki (2001). "Small GTP-binding proteins." Physiol Rev **81**(1): 153-208.
- Taniyama, Y. and K. K. Griendling (2003). "Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms." Hypertension **42**(6): 1075-1081.
- Tanner, F. C., H. Greutert, C. Barandier, K. Frischknecht and T. F. Luscher (2003). "Different cell cycle regulation of vascular smooth muscle in genetic hypertension." Hypertension **42**(2): 184-188.
- Taya, Y. (1997). "RB kinases and RB-binding proteins: new points of view." Trends Biochem Sci **22**(1): 14-17.
- Tea, B. S., S. Der Sarkissian, R. M. Touyz, P. Hamet and D. deBlois (2000). "Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo." Hypertension **35**(5): 1069-1073.
- Tetsu, O. and F. McCormick (2003). "Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition." Cancer Cell **3**(3): 233-245.

- Thannickal, V. J. and B. L. Fanburg (2000). "Reactive oxygen species in cell signaling." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(6): L1005-1028.
- Thibault, C. and M. B. Anand-Srivastava (1992). "Altered expression of G-protein mRNA in spontaneously hypertensive rats." FEBS Lett **313**(2): 160-164.
- Thorin, E. and M. Clozel (2010). "The cardiovascular physiology and pharmacology of endothelin-1." Adv Pharmacol **60**: 1-26.
- Tidyman, W. E. and K. A. Rauen (2009). "The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation." Curr Opin Genet Dev **19**(3): 230-236.
- Toda, N., K. Ayajiki and T. Okamura (2007). "Interaction of endothelial nitric oxide and angiotensin in the circulation." Pharmacol Rev **59**(1): 54-87.
- Toney, G. M. and S. D. Stocker (2010). "Hyperosmotic activation of CNS sympathetic drive: implications for cardiovascular disease." J Physiol **588**(Pt 18): 3375-3384.
- Touyz, R. M. (2003). "Recent advances in intracellular signalling in hypertension." Curr Opin Nephrol Hypertens **12**(2): 165-174.
- Touyz, R. M. (2005). "Endothelial cell IL-8, a new target for adiponectin: implications in vascular protection." Circ Res **97**(12): 1216-1219.
- Touyz, R. M. (2005). "Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II." Exp Physiol **90**(4): 449-455.
- Touyz, R. M., M. Cruzado, F. Tabet, G. Yao, S. Salomon and E. L. Schiffrin (2003). "Redox-dependent MAP kinase signaling by Ang II in vascular smooth muscle cells: role of receptor tyrosine kinase transactivation." Can J Physiol Pharmacol **81**(2): 159-167.
- Touyz, R. M., L. Y. Deng, G. He, X. H. Wu and E. L. Schiffrin (1999). "Angiotensin II stimulates DNA and protein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: role of extracellular signal-regulated kinases." J Hypertens **17**(7): 907-916.
- Touyz, R. M., G. He, X. H. Wu, J. B. Park, M. E. Mabrouk and E. L. Schiffrin (2001). "Src is an important mediator of extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent growth

- signaling by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients." Hypertension **38**(1): 56-64.
- Touyz, R. M. and E. L. Schiffrin (2000). "Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells." Pharmacol Rev **52**(4): 639-672.
- Touyz, R. M. and E. L. Schiffrin (2004). "Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension." Histochem Cell Biol **122**(4): 339-352.
- Triggle, C. R. and R. Tabrizchi (1993). "Changes in vascular smooth muscle function in hypertension." Chin Med J (Engl) **106**(4): 250-257.
- Trimarchi, J. M. and J. A. Lees (2002). "Sibling rivalry in the E2F family." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(1): 11-20.
- Tsai, L. H., E. Harlow and M. Meyerson (1991). "Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase." Nature **353**(6340): 174-177.
- Tseng, Y. C., S. Lahiri, D. F. Sellitti, K. D. Burman, J. C. D'Avis and L. Wartofsky (1990). "Characterization by affinity cross-linking of a receptor for atrial natriuretic peptide in cultured human thyroid cells associated with reductions in both adenosine 3',5'-monophosphate production and thyroglobulin secretion." J Clin Endocrinol Metab **70**(2): 528-533.
- Tsutsui, M. (2004). "Neuronal nitric oxide synthase as a novel anti-atherogenic factor." J Atheroscler Thromb **11**(2): 41-48.
- Umemoto, S., S. Kawahara, R. Hashimoto, K. Umeji, S. Matsuda, M. Tanaka, M. Kubo and M. Matsuzaki (2006). "Different effects of amlodipine and enalapril on the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase-extracellular signal-regulated kinase pathway for induction of vascular smooth muscle cell differentiation in vivo." Hypertens Res **29**(3): 179-186.
- Ushio-Fukai, M., K. K. Griendling, P. L. Becker, L. Hilenski, S. Halleran and R. W. Alexander (2001). "Epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II requires

- reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(4): 489-495.
- van Kleef, E. M., J. F. Smits, J. G. De Mey, J. P. Cleutjens, D. M. Lombardi, S. M. Schwartz and M. J. Daemen (1992). "Alpha 1-adrenoreceptor blockade reduces the angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell DNA synthesis in the rat thoracic aorta and carotid artery." Circ Res **70**(6): 1122-1127.
- Varticovski, L., D. Harrison-Findik, M. L. Keeler and M. Susa (1994). "Role of PI 3-kinase in mitogenesis." Biochim Biophys Acta **1226**(1): 1-11.
- Vignais, P. V. (2002). "The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism." Cell Mol Life Sci **59**(9): 1428-1459.
- Voet, D., J. G. Voet, et al. (2008). Fundamentals of biochemistry : life at the molecular level. Hoboken, NJ, Wiley.
- Walsh, J. B. (1982). "Hypertensive retinopathy. Description, classification, and prognosis." Ophthalmology **89**(10): 1127-1131.
- Wang, X., J. L. Martindale, Y. Liu and N. J. Holbrook (1998). "The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival." Biochem J **333** (Pt 2): 291-300.
- Warner, D. R., G. Weng, S. Yu, R. Matalon and L. S. Weinstein (1998). "A novel mutation in the switch 3 region of Gsalpha in a patient with Albright hereditary osteodystrophy impairs GDP binding and receptor activation." J Biol Chem **273**(37): 23976-23983.
- Waskiewicz, A. J. and J. A. Cooper (1995). "Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast." Curr Opin Cell Biol **7**(6): 798-805.
- Wedgwood, S., R. W. Dettman and S. M. Black (2001). "ET-1 stimulates pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation via induction of reactive oxygen species." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **281**(5): L1058-1067.

- Wells, J., C. R. Graveel, S. M. Bartley, S. J. Madore and P. J. Farnham (2002). "The identification of E2F1-specific target genes." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(6): 3890-3895.
- WHO (2002). "The world health report 2002: reducing risks, promoting healthy life." The Organization 248.
- WHO (2009). "Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks." The Organization: 1–62.
- Wilcox, J. N., A. Augustine, D. V. Goeddel and D. G. Lowe (1991). "Differential regional expression of three natriuretic peptide receptor genes within primate tissues." Mol Cell Biol **11**(7): 3454-3462.
- Wilson, F. H., S. Disse-Nicodeme, K. A. Choate, K. Ishikawa, C. Nelson-Williams, I. Desitter, M. Gunel, D. V. Milford, G. W. Lipkin, J. M. Achard, M. P. Feely, B. Dussol, Y. Berland, R. J. Unwin, H. Mayan, D. B. Simon, Z. Farfel, X. Jeunemaitre and R. P. Lifton (2001). "Human hypertension caused by mutations in WNK kinases." Science **293**(5532): 1107-1112.
- Wu, E. H., B. H. Tam and Y. H. Wong (2006). "Constitutively active alpha subunits of G(q/11) and G(12/13) families inhibit activation of the pro-survival Akt signaling cascade." FEBS J **273**(11): 2388-2398.
- Xu, Q., Y. Liu, M. Gorospe, R. Udelsman and N. J. Holbrook (1996). "Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall." J Clin Invest **97**(2): 508-514.
- Xu, Y. J., S. Ouk Kim, D. F. Liao, S. Katz and S. L. Pelech (2000). "Stimulation of 90- and 70-kDa ribosomal protein S6 kinases by arginine vasopressin and lysophosphatidic acid in rat cardiomyocytes." Biochem Pharmacol **59**(9): 1163-1171.
- Yamada, T., M. Horiuchi and V. J. Dzau (1996). "Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 156-160.

- Yamamoto, T., M. Ebisuya, F. Ashida, K. Okamoto, S. Yonehara and E. Nishida (2006). "Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression." Curr Biol **16**(12): 1171-1182.
- Yan, W., F. Wu, J. Morser and Q. Wu (2000). "Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8525-8529.
- Yanai, H., Y. Tomono, K. Ito, N. Furutani, H. Yoshida and N. Tada (2008). "The underlying mechanisms for development of hypertension in the metabolic syndrome." Nutr J **7**: 10.
- Yang, C. M., I. T. Lee, C. C. Lin, C. H. Wang, W. J. Cherng and L. D. Hsiao (2013). "c-Src-dependent MAPKs/AP-1 activation is involved in TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat heart-derived H9c2 cells." Biochem Pharmacol **85**(8): 1115-1123.
- Yang, C. M., C. C. Lin, I. T. Lee, C. K. Hsu, Y. C. Tai, H. L. Hsieh, P. L. Chi and L. D. Hsiao (2015). "c-Src-dependent transactivation of EGFR mediates CORM-2-induced HO-1 expression in human tracheal smooth muscle cells." J Cell Physiol **230**(10): 2351-2361.
- Yang, K., M. Hitomi and D. W. Stacey (2006). "Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell." Cell Div **1**: 32.
- Yang, L. X., G. Liu, G. F. Zhu, H. Liu, R. W. Guo, F. Qi and J. H. Zou (2014). "MicroRNA-155 inhibits angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation." J Renin Angiotensin Aldosterone Syst **15**(2): 109-116.
- Yeatman, T. J. (2004). "A renaissance for SRC." Nat Rev Cancer **4**(6): 470-480.
- Yogi, A., G. E. Callera, A. C. Montezano, A. B. Aranha, R. C. Tostes, E. L. Schiffrin and R. M. Touyz (2007). "Endothelin-1, but not Ang II, activates MAP kinases through c-Src independent Ras-Raf dependent pathways in vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(9): 1960-1967.
- Yoshimoto, T., M. Naruse, K. Naruse, K. Arai, T. Imaki, A. Tanabe, T. Seki, S. Hirose, T. Muraki and H. Demura (1996). "Vascular action of circulating and local natriuretic

- peptide systems is potentiated in obese/hyperglycemic and hypertensive rats." Endocrinology **137**(12): 5552-5557.
- Zalba, G., G. San Jose, M. U. Moreno, M. A. Fortuno, A. Fortuno, F. J. Beaumont and J. Diez (2001). "Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase." Hypertension **38**(6): 1395-1399.
- Zeng, G., F. H. Nystrom, L. V. Ravichandran, L. N. Cong, M. Kirby, H. Mostowski and M. J. Quon (2000). "Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells." Circulation **101**(13): 1539-1545.
- Zhang, C., L. Tian, C. Chi, X. Wu, X. Yang, M. Han, T. Xu, Y. Zhuang and K. Deng (2010). "Adam10 is essential for early embryonic cardiovascular development." Dev Dyn **239**(10): 2594-2602.
- Zhang, W. and H. T. Liu (2002). "MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells." Cell Res **12**(1): 9-18.
- Ziegler, M. G., P. Mills and J. E. Dimsdale (1991). "Hypertensives' pressor response to norepinephrine. Analysis by infusion rate and plasma levels." Am J Hypertens **4**(7 Pt 1): 586-591.
- Zois, N. E., E. D. Bartels, I. Hunter, B. S. Kousholt, L. H. Olsen and J. P. Goetze (2014). "Natriuretic peptides in cardiometabolic regulation and disease." Nat Rev Cardiol **11**(7): 403-412.
- Zou, M., Y. Shi, S. T. Al-Sedairy and N. R. Farid (1996). "Gene usage and regulation of Gsalpha gene expression in thyroid cells." Endocrine **4**(3): 277-282.