



HAL
open science

Mise en évidence des effets anti-hypertrophiques de carabine dans le cardiomyocyte et caractérisation de ses voies de signalisation

Magali Breckler

► **To cite this version:**

Magali Breckler. Mise en évidence des effets anti-hypertrophiques de carabine dans le cardiomyocyte et caractérisation de ses voies de signalisation. Biologie cellulaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA11T014 . tel-01083978

HAL Id: tel-01083978

<https://theses.hal.science/tel-01083978>

Submitted on 18 Nov 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITÉ XI
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD**

Année 2011-2012

N° attribué par la bibliothèque

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

Champ disciplinaire : Biologie cellulaire et moléculaire et sciences de la santé
Ecole Doctorale de rattachement: Signalisations et réseaux intégratifs en biologie

présentée et soutenue publiquement par

Magali BRECKLER

Le 23 mars 2012

**Mise en évidence des effets anti-hypertrophiques de Carabine
dans le cardiomyocyte et caractérisation de ses voies de
signalisation**

Directeur de thèse : *Mr le Docteur Frank LEZOUALC'H*

JURY

Président : *Mr le Professeur Marc LEMAIRE*

Rapporteur : *Mme le Professeur Chantal GAUTHIER-ERFANIAN*

Rapporteur : *Mme le Docteur Aminata TOURE*

Examineur : *Mr le Docteur Eric MOREL*

Examineur : *Mr le Docteur Frank LEZOUALC'H*

Remerciements

Je tiens à remercier le professeur Marc Lemaire de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ma thèse de doctorat, et pour m'avoir soutenue pendant mon master dans mon projet de faire une thèse.

Je remercie vivement le professeur Chantal Gauthier et le docteur Aminata Touré qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse, et d'avoir pris le temps de me conseillée afin d'améliorer mon manuscrit, et de répondre à mes questions.

La majorité de ces travaux ont été réalisés à la faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry, dans l'unité Inserm U769 dirigée par le docteur Rodolphe Fischmeister que je tiens à remercier chaleureusement pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire en master, puis en thèse, de m'avoir permis de travailler dans un environnement enrichissant et à taille humaine.

La fin des travaux ont été réalisés dans le laborotoire de l'INSERM U1048 de l'I2MC à Toulouse, dans le laboratoire du professeur Angelo Parini, que je remercie vivement de m'avoir accueillie dans son laboratoire dans des circonstances particulières et de nous avoir permis de profiter de la riche vie scientifique du centre.

Je remercie particulièrement mon directeur de thèse Frank Lezoualc'h pour m'avoir permis de faire ma thèse dans son équipe et de m'avoir donnée une seconde chance, pour m'avoir encadrée et particulièrement pendant la période difficile de la rédaction, pour m'avoir appris le travail, la ténacité et aussi que je pouvais vivre ailleurs qu'en région parisienne.

Je remercie grandement Eric Morel pour m'avoir formée en stage de licence, guidée en master et soutenue en thèse. Merci pour toutes ces belles conversations que l'on a eu tant d'un point de vue scientifique qu'humain, l'aide à mon déménagement, les conseils précieux que tu as pu m'apporter, les danses aux soirées des congrès, et pour ton amitié...

Je remercie Audrey Varin, pour sa gentillesse, ses bons conseils, sa disponibilité, sa joie de vivre, son aide précieuse, et tous ces moments d'amitié : les soirées shopping, le resto de ton frère entres filles, les discussions « filles », l'annonce émouvante pour Thibault... Le temps dans la même équipe fut trop court !

Je remercie Magali Berthouze pour avoir partagé la passion Carabine, pour m'avoir encadrée, pour m'avoir témoignée de son expérience, pour les belles discussions que l'on a pu avoir sur la vie, pour m'avoir fait apprendre sur moi, pour avoir été patiente. J'espère pouvoir être à ton mariage pour te prouver mon amitié pour ce jour si important.

Je remercie Alexandre Lucas, pour m'avoir formé au western blot avec patience et discrétion, pour avoir pris beaucoup de temps pour moi, ne pas avoir hésité à revenir le dimanche en soirée pour me faire travaillé mon oral de M2 (qu'est-ce que j'avais stressé...), pour tout ces bons moments passé en dehors du labo : ciné, resto, bowling, déménagement... pour ce soutien pour l'arrivée sur Toulouse, c'est bien de ne pas se sentir seule.

Un grand merci à Anne-Coline Laurent, avec qui on a presque commencé en même temps. Merci pour tout ce qu'on a pu partager : les manips qui ne fonctionnent pas toujours, les pull

down révélés le samedi matin (« I got a feeling...whou ou »), l'aide au « coupage de tête », le grattage des boites de teste lucas le vendredi soir, ... mais aussi pour les soirées de congrès avec « les plus belles filles de Chatenay » ou les « trimoules », les présentations posters in english le soir à 23H dans la chambre d'hôtel et en vrai à Goettingoen (« HDAC »), ... Merci pour ton amitié, ton soutien tout au long de cette thèse, les moments d'échange en arrivant à Toulouse, ta franchise qui fait réfléchir. Pardon pour ces derniers mois et tu pourras toujours compter sur moi.

Merci à Malik, petit dernier arrivé dans l'équipe, qui a su m'écouter et me remotiver dans les moments difficiles, les pauses café où on a refait le monde, et les soirées et WE où tu venais travailler, car c'est toujours plus agréable de ne pas se retrouver seule au labo un samedi. Merci pour ta philosophie de ne pas s'inquiéter trop tôt pour rien.

Merci à Mélanie Métrich, pour tout tes conseils, pour m'avoir rassurée, pour ta bonne humeur constante au labo, pour nous avoir permis de faire de l'escalade et du rappel (c'était juste génial !), pour tes invitations en Suisse que je n'ai pas encore honorées. Merci pour les bonnes soirées que nous avons passée ensemble et pour ton amitié.

Merci à Nicolas Dusquennes (ça ne sera bientôt « plus de ma faute ») pour ton grand soutien au moment des révisions de ma soutenance de M2, je n'oublierai pas (merci MSN), merci de ne pas avoir hésité à revenir le dimanche avec Alex pour m'écouter parler, pour le déménagement, pour m'avoir encouragée pendant ma thèse et pour tes bons conseils en début de thèse et cette transmission de l'effort au travail.

Merci à Bertrand Crozatier pour ta vision médicale que tu as su nous apporter lors des réunions ou des cours que tu nous as donné. Merci aussi pour la relecture de certains passages de ma thèse.

Merci aux stagiaires : à Medhi, c'était bien sympa de commencer à manipuler ensemble, et merci pour ton soutien, tes petites attentions et ton amitié. Merci à Chloé, pour ta discrétion, nos belles discussions, ces beaux spectacles de danses que nous avons vu ensemble et pour nos discussions passionnées, j'espère que nous pourrons voir le gala des élèves cette année ;) Merci à Alexis pour toutes ces belles conversations sur des sujets si variés. Continue de t'intéresser à tout comme ça. Merci à Yann, pour ton soutien et ton amitié, nos discussions sur Toulouse, l'avenir, l'emploi, l'agriculture, la connaissance de soi... Profite bien de ton année en Corée et reviens vite.

Merci à Céline de nous avoir fait partager tes connaissances et d'avoir été d'une bonne humeur si constante. C'était bien de t'avoir dans l'équipe.

Merci à Christophe Heymes et à son équipe : Marie (merci d'avoir rendu les samedis au labo plus sympathique), Pauline, Yannis, Caro, pour nous avoir fait partager leurs connaissances cardiaques et pour les discussions que nous avons pu avoir. Merci aussi d'avoir partagé cette aventure de déménagement, ça fera de sacrés souvenirs...

Merci à l'équipe 1 (« mitochondrie ») et l'équipe 2 (« PDE ») de Chatenay pour leur connaissances et leur appréhension différentes de la cardio, et pour tous les événements sympathiques « hors labo ». Merci également à Patrick, Françoise, Valérie, Sophie, Awa pour nous avoir aidés dans la vie au labo. Merci aussi à Valérie Domergue pour ta disponibilité et les belles conversations que l'on a eu ensemble. Un merci particulier à Mathieu le Toulousain,

pour ces merveilleuses conversations qu'on a eues, ton soutien si précieux (mon meuble Ikéa en est toujours témoin), à Delphine pour tout ce qu'on a pu partager et échanger, à Jérémy, Fabio, Zeineb, Fanny, Hind, Cristina,...

Merci à Alain Cazorla et Alain Lacampagne pour les manips de physio qu'ils ont réalisé pour le projet. Je remercie également Claudine délonnie de la plateforme transcriptome.

Merci au CODIM et à la région Ile de France pour m'avoir financé durant ces 3ans.

Merci aux copines de fac pour tout ces cours de masters bossés ensemble et ces partages rassurant sur «l'expérience these ».

Merci à mes pharmaciens toulousains pour les belles discussions scientifiques (et pour les conseils des visites en région midi-pyrénées) qu'on a eu et pour le fait que je sorte toujours de la pharmacie avec le sourire, même après les corrections des pages de thèses « thérapie ».

Merci à mes copines de danses, d'avoir suivi parfois heure par heure certaines avancées. Merci pour votre grand soutien, et d'être toujours là quand j'ai besoin de vous. Merci pour les merveilleux moments passés ensemble à danser, à manger, à rire... Merci de ne pas avoir hésité à m'écouter répéter ma présentation congrès après un stage d'Igor, franchement fallait le faire.

Un merci spécial à mes profs de danse (Françoise, Igor, Claire, Hélène, Zorica, Christine, Mouaze, Catherine et les autres...) pour m'avoir appris l'exigence et le travail et m'avoir montré qu'on arrive parfois à aller plus loin que ce que l'on pensait (toujours avec du travail). Merci aux filles de la danse de Toulouse et au secrétariat pour leur merveilleux accueil dans leur école et la région et pour toutes leurs attentions.

Merci à Marion qui m'a rendue ma vie toulousaine si sympathique (comme quoi internet ça rapproche ;)). Tu m'a bien soutenue, même si on ne se connaissait pas depuis longtemps... Merci de m'avoir fait découvrir la rando (et réaliser ces dangers, sacré Marion) à Stan et moi et pour tout ces petits repas partagés ou tu m'as patiemment écouté parlé de ma thèse.

Merci à ma frat d'avoir su m'encourager (j'ai jamais été très persuadée d'être plus à l'aise à l'oral depuis mon début de thèse Thibault...), être là quand il le fallait et pour tout ce que nous avons partagé. Un merci particulier à Christophe et Emmanuelle qui ont eu la bonne idée de venir sur Toulouse et d'avoir été là pour moi quand j'en avais le plus besoin (« je peux venir...ce soir ? ») et merci pour nous avoir accueillies Anne-Co et moi dans cette dure épreuve de la recherche d'appart.

Merci à Alexandra et Aude pour leur amitié et leur encouragement depuis des années (depuis la 1ere, pour le bac, la fac, la thèse et merci pour les relectures). Merci à Magaly pour toutes ces heures de conversation si passionnantes que l'on peut avoir au téléphone, tu es une amie précieuse (et j'espère que tu as raison concernant la recherche ;)). Merci à Maël pour ton soutien, ton écoute précieuse et ton amitié. Merci à Anne, pour les heures (il y a certains temps) où l'on a travaillé nos mémoires/thèses ensemble à la clinique, et pour ces beaux moments d'amitié depuis que l'on se connaît. Merci à Claire, d'avoir proposé de venir me soutenir depuis longtemps et pour me rassurer (avec critique constructive). Merci à Nathalie, tu as suivi mon parcours depuis longtemps et tu as toujours été là. Merci à Audrey, pour nos parcours « en parallèle », pour ton constant soutien et pour toutes tes petites attentions (le

paquet surprise m'avait tellement touchée !). Merci à Kevin pour ton soutien régulier au téléphone.

Encore merci à Emilie (grand grand merci pour le déménagement !!!!), Mael, Yumi, Alexandra, Audrey, Anne, Vivien et Marie-Elodie d'être venus me voir sur Toulouse ! ça fait tellement plaisir !!! Merci pour les courriers et paquets, ça fait plaisir de savoir qu'on pense à vous quand on est loin.

Je remercie profondément mes parents, qui m'ont toujours laissée libre de mes choix dans mes études (bon à part le latin, mais sans rancune ;)) et qui m'ont tant et tant soutenue. Merci de m'avoir fait confiance et d'être toujours présent sans jamais vous imposer. Vous êtes des parents formidables !

Merci à Marie pour ta disponibilité (à n'importe quelle heure) et ton soutien dans mes moments de doutes, pour tes conseils dans de nombreux domaines, pour être une petite sœur formidable avec qui on ne s'ennuie pas...

Enfin, un grand grand grand merci à Stan, pour ton soutien, ton écoute, ta patience pendant ces années. Merci pour tous les kilomètres parcourus (toi ou moi avec ta voiture), pour cette énergie qui fait que l'on arrive toujours à se voir, même en étant loin, pour être si rassurant, pour n'avoir jamais douté. Merci pour les sacrifices réalisés pendant ces derniers mois. Merci pour ta grande confiance, pour tout ce que tu m'apportes, pour ton amour... Les mots me manquent, merci d'être là, tout simplement.

Table des matières

TABLE DES MATIERES	2
TABLE DES ILLUSTRATIONS	10
INTRODUCTION	14
I - LE CŒUR	14
1) STRUCTURE ET FONCTION	14
1.1) Présentation	14
1.2) Anatomie du cœur	14
1.3) Les parois et les différentes cellules cardiaques	16
2) FONCTION COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION (CEC)	20
3) REGULATION DE LA FONCTION CARDIAQUE PAR LES HORMONES ET LES RECEPTEURS A 7 DOMAINES TRANSMEMBRANAIRES	20
3.1 Les hormones intervenant dans la fonction cardiaque	21
3.2) Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)	22
3.2.a) Les récepteurs α -adrénergiques (α -ARs)	23
3.2.b) Les récepteurs β -adrénergiques (β -ARs)	26
3.2.c) Les autres récepteurs impliqués dans la régulation cardiaque	28
3.3) Les adénylates cyclases (AC)	29
3.4) l'AMPc	29
3.5) Les effecteurs de l'AMPc	30
3.6) La PLC (phospholipase C)	33
II - HYPERTROPHIE ET INSUFFISANCE CARDIAQUE	34
1 – HYPERTROPHIE CARDIAQUE	34
1.1) Définition	34
1.2) Caractéristiques de l'hypertrophie cardiaque	34
2)- DIVERSITE DES STIMULI HYPERTROPHIQUES	37
2.2.a) Facteurs mécaniques	37
2.2.b) Facteurs hormonaux	38
3)-REMODELAGE CARDIAQUE VENTRICULAIRE	39
3.1) Modification des protéines contractiles	39
3.2) Modification de la matrice extracellulaire et de la fibrose	40
3.3) Modification liée à l'apoptose	41
3.4) Modification des récepteurs β -adrénergiques	41
4)- INSUFFISANCE CARDIAQUE	42
4.1) Définition	42
4.2) Caractéristiques de l'insuffisance cardiaque	42
5) TRAITEMENT DE L'IC	44
1) Les IEC	44
2) Les médicaments diurétiques	44
3) Les bêta-bloquants	45
4) Les inotropes positifs	45
5) Les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA2)	46
6) Les antagonistes de l'aldostérone	46

III - VOIES DE SIGNALISATION DE L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE	47
1- ALTERATIONS DES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G DANS L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE	47
1.a) Les récepteurs α -adrénergiques dans l'hypertrophie cardiaque	47
1.b) Les récepteurs β -adrénergiques dans l'hypertrophie cardiaque	49
2 - EPAC DANS L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE	50
3 - LES PETITES PROTEINES G	53
3-1 Introduction	53
3-2 Régulation des petites protéines G	53
3-3 Les petites protéines G de la famille Ras	54
3-3.1 La sous-famille de Ras et son activation	54
3-3.2 Les Effecteurs de Ras	55
3-4 Implication de la petite protéine G Ras dans l'hypertrophie cardiaque	55
4- VOIE DES MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES (MAPKS)	57
5-LES VOIES DE SIGNALISATION DES ENZYMES DEPENDANTES DU CALCIUM	58
5.1- Voie de la kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante de type II (CaMKII) et de ses effecteurs	58
5.1.1 Définition, fonction	58
5.1.2 Structure	58
5.1.3 Activation de la CaMKII	61
5.1.4 Les effecteurs de la CaMKII	61
5.1.5 La CaMKII et ses effecteurs dans l'hypertrophie	62
5.2- Voie de la calcineurine (CaN) et de ses effecteurs	63
5.2.1 Définition, fonction	63
5.2.2 Structure de la calcineurine	64
5.2.3 Régulation de la calcineurine	65
5.2.4 Les facteurs de transcription activés par la calcineurine	66
a) NFAT (nuclear of activated T cells)	66
b) MEF2	66
5.2.5 La calcineurine dans le noyau	67
5.2.6 Altérations de la voie CaN-NFAT	67
5.2.7 Implication de la calcineurine dans l'hypertrophie cardiaque	68
IV - INHIBITEURS DE LA CALCINEURINE	70
1 - INHIBITEUR PHARMACOLOGIQUE DE LA CALCINEURINE	70
2 - CABIN1/ CAIN	72
3 - AKAP79	73
4 - LA CALSARCINE	74
5 - PICOT (PKC-INTERACTING COUSIN OF THIOREDOXIN)	74
6 - L'ATROGINE-1	75
7 - MCIP1 (MODULATORY CALCINEURIN-INTERACTING PROTEINS)	76
V - PROBLEMATIQUE	79
1 - Position de l'étude	79
2 - Objectifs	81

MATERIEL ET METHODES	83
I - MATERIEL	83
1- SUBSTANCES CHIMIQUES ET REACTIFS	83
2- ANTICORPS	83
3- ADENOVIRUS	84
4- PLASMIDES	86
II - INDUCTION DE L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE PAR CONSTRICTION DE L'AORTE ASCENDANTE (TAC) ET INJECTION DES ADENOVIRUS <i>IN VIVO</i>	87
III - CULTURE PRIMAIRES DE CARDIOMYOCYTES	88
1- CULTURES PRIMAIRES DES CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES DE RATS ADULTES	88
2- CULTURES PRIMAIRES DES CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES DE RATS NOUVEAUX NES	89
IV - METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET DE BIOCHIMIE	91
1- LYSE CELLULAIRE	91
2- DOSAGE PROTEIQUE	91
3- PRECIPITATION PAR AFFINITE DE RAS-GTP	91
4- TRANSLOCATION HDAC	94
5- WESTERN BLOT	94
6- INCORPORATION DE [³ H]-LEUCINE	96
7- TESTS D'ACTIVITE ENZYMATIQUE	97
1- IMMUNOMARQUAGE	99
2- ACQUISITION D'IMAGES	100
VI - ANALYSES STATISTIQUES	100
RESULTATS	101
LA PROTEINE CARABINE INHIBE LES VOIES PRO HYPERTROPHIQUES DE LA CaN, RAS ET LA CaMKII DANS DES CARDIOMYOCYTES DE RATS	102
I - POSITION DU PROBLEME	102
II - RESULTATS	103
III - CONCLUSION	104
III-1 Présence de la protéine Carabine dans les cardiomyocytes et son effet sur la croissance cellulaire	104
III-2 Les effets anti-hypertrophiques de la protéine Carabine sur le remodelage cardiaque	104
III-3 La protéine Carabine inhibe les voies Ras, CaN et CaMKII	105
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	106
I - EXPRESSION DE CARABINE DANS LES CARDIOMYOCYTES DE RATS ET ANALYSE DE SON ROLE DANS LE REMODELAGE DES CARDIOMYOCYTES	107
II - CARABINE INHIBITEUR DE RAS	112
III - CARABINE INHIBITEUR DE LA CaMKII	114
IV - CARABINE INHIBITEUR DE LA CaN	118
V - CARABINE ET EPAC	120
VII - SUITE DE L'ETUDE	122
CONCLUSION GENERALE	123
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	126

ANNEXES **155**

ANNEXE 1 **156**

EPAC ACTIVATION INDUCES HISTONE DEACETYLASE NUCLEAR EXPORT VIA A RAS-DEPENDENT SIGNALLING PATHWAY. 156
MÉTRICH M, LAURENT AC, **BRECKLER M**, DUQUESNES N, HMITOU I, COURILLAU D, BLONDEAU JP, CROZATIER B, LEZOUALC'H F, MOREL E. 156
CELL SIGNAL. 2010 OCT;22(10):1459-68. EPUB 2010 MAY 27 156

ANNEXE 2 **157**

RAP-LINKED CAMP SIGNALING EPAC PROTEINS: COMPARTMENTATION, FUNCTIONING AND DISEASE IMPLICATIONS. 157
BRECKLER M, BERTHOUBE M, LAURENT AC, CROZATIER B, MOREL E, LEZOUALC'H F. 157
CELL SIGNAL. 2011 AUG;23(8):1257-66. EPUB 2011 MAR 22. REVIEW. 157

ANNEXE 3 **158**

NEW PERSPECTIVES IN CAMP-SIGNALING MODULATION. 158
BERTHOUBE M, LAURENT AC, **BRECKLER M**, LEZOUALC'H F. 158
CURR HEART FAIL REP. 2011 SEP;8(3):159-67. 158

ANNEXE 4 **159**

ROLE OF EPAC IN BRAIN AND HEART. 159
ANNE-COLINE LAURENT, **MAGALI BRECKLER**, MAGALI BERTHOUBE, FRANK LEZOUALC'H, 159
BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS. BIOCHEM SOC TRANS. 2012 FEB 1;40(1):51-7. 159

Table des illustrations

Figure 1 Représentation schématique du myocarde.....	15
Figure 2 Structure de la paroi du cœur	16
Figure 3 Anatomie et histologie du tissu musculaire cardiaque.....	18
Figure 4 Structure des éléments contractiles du cardiomyocytes.....	19
Figure 5 Système rénine angiotensine.....	22
Figure 6 Activation des protéines G.....	23
Figure 7 Récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) stimulant la fonction cardiaque et leurs voies de signalisation.....	25
Figure 8 Représentation schématique de la structure de la PKA et de son activation.	30
Figure 9 Facteur d'échange Epac, nouvelle cible de l'AMPc activant les GTPases Rap.	32
Figure 10 Schéma représentant la morphologie des cardiomyocytes dans les différents types d'hypertrophie cardiaque.....	36
Figure 11 Les intégrines.....	38
Figure 12 Remodelage ventriculaire survenant au cours de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaques.....	43
Figure 13 Voies de signalisation associées à l'hypertrophie cardiaque induite par Epac	52
Figure 14 Le cycle d'activation de la petite protéine G Ras.....	54
Figure 15 Structure et activation de la CaMKII.....	60
Figure 16 Activation de la CaMKII	62
Figure 17 Représentation schématique de la CaN et site d'expression tissulaires de ses sous-unités	64
Figure 18 Structure et activation de la calcineurine	65
Figure 19 Inhibiteurs de la calcineurine	71
Figure 20 Représentation schématique des domaines de Carabine.....	80
Figure 21 Etude du rôle de Carabine dans l'hypertrophie cardiaque	81
Figure 22 Adénovirus codant pour la forme sauvage de Carabine humaine (Ad.Carabine)	85
Figure 23 Représentation schématique des mutants de Carabine	86
Figure 24 Modèle d'hypertrophie cardiaque induite chez le rat.....	87
Figure 25 Schéma représentant la technique de précipitation par affinité des petites protéines G, exemple de Ras.....	93
Figure 26 Schéma de montage de la cassette de transfert pour le Western Blot.....	95
Figure 27 Mesure de l'ARNm de l'ANF et de Carabine dans le ventricule gauche de rats sténosés de 2 et 5 semaines	108
Figure 28 Mesure de la synthèse protéique par incorporation de leucine tritiée.....	110
Figure 29 Activité transcriptionnelle de l'ANF après activation des récepteurs α -ARs sur des cellules de rats néonataux qui surexpriment Carabine ou ses formes mutées.....	111
Figure 30 Localisation de Carabine endogène dans des cellules de rats nouveaux nés.....	115
Figure 31 Mesure de l'activité transcriptionnelle de MEF2 après activation des récepteurs α -ARs sur des cellules de rats néonataux qui surexpriment Carabine ou ses mutants.	116
Figure 32 Mesure de l'activité de Ras sur des cardiomyocytes de rats nouveaux nés.....	120
Figure 33 Représentation schématique des effets anti-hypertrophiques de Carabine.....	125

Tableau 1 Agonistes et antagonistes communément utilisés pour la classification des récepteurs $\alpha 1$ et $\alpha 2$ -adrénergiques.....	23
Tableau 2 Phénotypes de souris génétiquement modifiées pour les récepteurs α -ARs	48
Tableau 3 Propriétés de la famille des CaMKs	59
Tableau 4 Test d'activité de la calcineurine	98

Abréviations

8CPT : 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP
AC : adénylate cyclase
ADN : acide désoxyribonucléique
AKAP : Protéine d'ancrage des PKA (A kinase-anchoring protein)
AMPc : adénosine 3',5' monophosphate cyclique
ANF : peptide facteur atrial natriuretique (atrial natriuretic factor)
AngII : angiotensine II
ARA2 : antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II
ARF : ADP-ribosylation factors
ARNm : acide ribonucléique messenger
ATP : adénosine triphosphate
BNP : peptide natriuretique de type B
Ca²⁺ : calcium
CaM : calmoduline
CaMKII : kinase Ca²⁺/calmoduline-dépendante de type II
CaN : calcineurine
CEC : couplage excitation-contraction
CICR : calcium induce-calcium release
CK1 : kinase casein 1
CMD : cardiomyopathie dilatée
cMyPB-C : protéine C cardiaque liant la myosine
CnA et CnB : sous-unité catalytique A et d'une sous-unité régulatrice B de la calcineurine
COS : CV-1 in Origin and carrying SV-40
CREB : cAMP-response element binding protein
Crm1 : exportine 1
CsA : cyclosporine A
CVRN : cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveaux nés
CyA : cyclophiline A
DAG : diacylglycérol
EPAC : Exchange Protein directly Activated by cAMP
ERK : extracellular signal-regulated kinase
ET-1 : endothéline-1
FK506 : tacrolimus
FKBP12 : protéine 12 se liant à FK506
GAP: GTPase activating protein
GDI : guanine nucleotide-dissociation inhibitors
GDS : GDP dissociation stimulator
GEF : guanine exchange factor
GRK : kinase des récepteurs couplés aux protéines G
GSK3 β : kinase glycogen synthase 3β
HAT : histone acetyltransferase p300
HC : hypertrophie cardiaque
HCM : cardiomyopathies hypertrophiques humaines
HCN : Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated cation channels
HDAC : histone déacétylase
HDACII : histone déacétylase de classe II
IC : insuffisance cardiaque

IEC : inhibiteur de l'enzyme de conversion
 IGF1 : facteur de croissance à l'insuline 1 (insulin growth factor 1)
 IP : immunoprécipitation
 IP3 : inositol 1,4,5-triphosphate
 IP3R : récepteurs inositol triphosphate
 IRES : internal ribosomal entry site
 JKN : kinase N-terminal c-jun
 KO : knock-out
 LTCC : canaux calciques de type L
 MADS : MCM-1 agamous deficient serum response factor
 MAPK : mitogen-activated protein kinases
 MCIP : modulatory calcineurin interacting proteins
 MEC : matrice extracellulaire
 MEF2 : myocyte enhancer factor 2
 MEKK1 : protéine mitogen activé kinase kinase kinase 1
 MITR : MEF2-interacting transcription repressor
 MsrA : méthionine sulfoxide réductase de classe A
 NES : séquence d'export nucléaire
 NFAT : nuclear of activated T cells
 NLS : signal de localisation nucléaire
 NO : oxyde nitrique
 NOS : oxyde nitrique synthétase
 NYHA : « New York heart association »
 PDE : Phosphodiesterases
 PE : phénylephrine
 PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase
 PICOT : PKC-interacting cousin of thioredoxin
 PIP2 : phosphatidylinositol 4,5 biphosphate
 PKA ou PKC : protéine kinase A ou protéine kinase C
 PLC: phospholipase C
 PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate
 RA : domaine d'association à Ras
 Ral-GDS : Ral guanine nucleotide dissociation stimulator
 RBD : Ras binding domain
 RCPG : récepteur couplé aux protéines G
 RFP : Red Fluorescent Protein
 RHD : domaine d'homologie Rel
 ROS : reactive oxygen species
 RPTK : récepteurs aux protéines tyrosine kinase
 RS : réticulum sarcoplasmique
 RyR : récepteur de la ryanodine
 SBF : sérum de bovin fœtal
 SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
 SERCA : sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase
 SP : serine-proline
 TAC : sténose de l'aorte thoracique (transverse aortic constriction)
 TnC, TnI, TnT : Troponine C, I, T
 TNF : facteur de nécrose tumorale
 α-AR, β-AR : récepteur α-adrénergique, récepteur β-adrénergique
 αMHC : chaîne lourde de myosine α (myosin heavy chain)

INTRODUCTION

Introduction

1 - Le cœur

1) Structure et fonction

1.1) Présentation

Le cœur est un muscle exerçant une fonction de pompe grâce à des contractions rythmiques spontanées, pour assurer la distribution du sang dans tout l'organisme. Son rythme cardiaque varie pour s'adapter aux besoins de l'organisme. Le myocarde fait circuler 4 à 5 litres de sang en permanence et pompe chaque jour 8000 litres de sang. Le cœur bat en moyenne 100 000 fois par jour (soit 2 milliards de battements en moyenne dans une vie). Lorsque celui-ci est au repos, il bat environ 60 fois par minute.

1.2) Anatomie du cœur

Le cœur est un muscle strié composé de quatre cavités : les chambres auriculaires et ventriculaires droites séparées par la valve tricuspide, ainsi que les chambres auriculaires et ventriculaires gauches séparées par la valve mitrale (Figure 1). Lors de la relaxation, ou diastole, le sang provenant de la veine pulmonaire et des veines caves supérieures et inférieures remplit les cavités auriculaires droite et gauche respectivement. La pression ainsi exercée dans les cavités auriculaires permet d'ouvrir les valves cardiaques et de remplir les cavités ventriculaires. La contraction synchronisée des oreillettes puis des ventricules, appelée systole, permet dans un premier temps de vider les cavités auriculaires, puis d'éjecter le sang contenu dans les chambres ventriculaires droite et gauche vers l'artère pulmonaire et l'aorte respectivement.

La capacité du myocarde à se contracter et se relaxer est liée aux propriétés d'automatisme, d'excitabilité, de contraction et de relaxation des cellules qui le composent. Les cardiomyocytes du tissu nodal sont capables de générer spontanément un courant électrique (phénomène d'automatisme). Ce courant électrique dépolarise la membrane plasmique des cellules myocardiques et entraîne leur contraction (phénomène d'excitation). Afin de coordonner la contraction des oreillettes et des ventricules, le rythme de contraction des cellules cardiaques est imposé par les cellules du nœud sino-auriculaire. Ces cellules génèrent une onde d'excitation ou potentiel d'action qui se propage des oreillettes aux ventricules par l'intermédiaire du nœud auriculo-ventriculaire, du faisceau de His et du réseau de Purkinje.

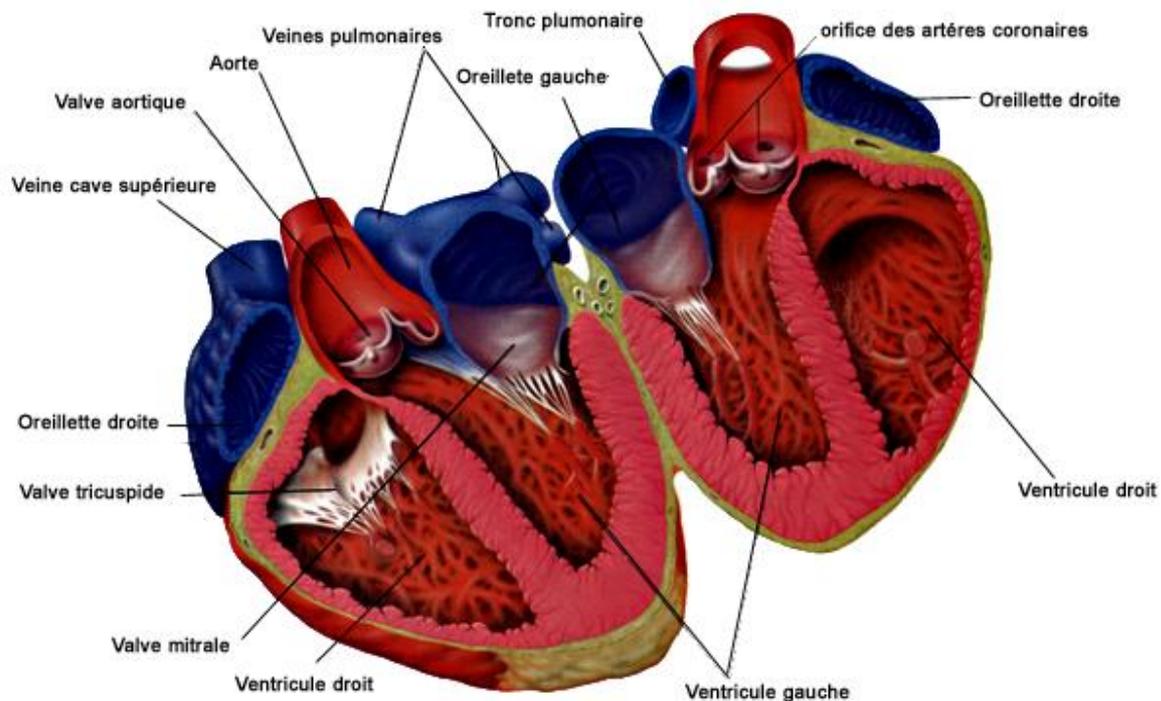


Figure 1 Représentation schématique du myocarde. Le cœur est constitué de quatre cavités formées par l'oreillette et le ventricule droits d'une part, et l'oreillette et le ventricule gauche d'autre part. Le cœur droit reçoit le sang provenant des veines caves supérieure et inférieure, et l'éjecte dans la petite circulation par l'artère pulmonaire où il sera réoxygéné. Le cœur gauche reçoit le sang des veines pulmonaires pour l'éjecter dans l'aorte afin d'irriguer l'ensemble de l'organisme.

1.3) Les parois et les différentes cellules cardiaques

Le cœur est composé de trois parois :

- le **myocarde**, le tissu cardiaque est un muscle strié, qui est tapissé
- à l'intérieur par un endothélium, l'**endocarde**, qui se prolonge avec l'endothélium vasculaire en dehors du cœur,
- et à l'extérieur par une séreuse, l'**épicarde**.

L'enveloppe extérieure du cœur est le péricarde.

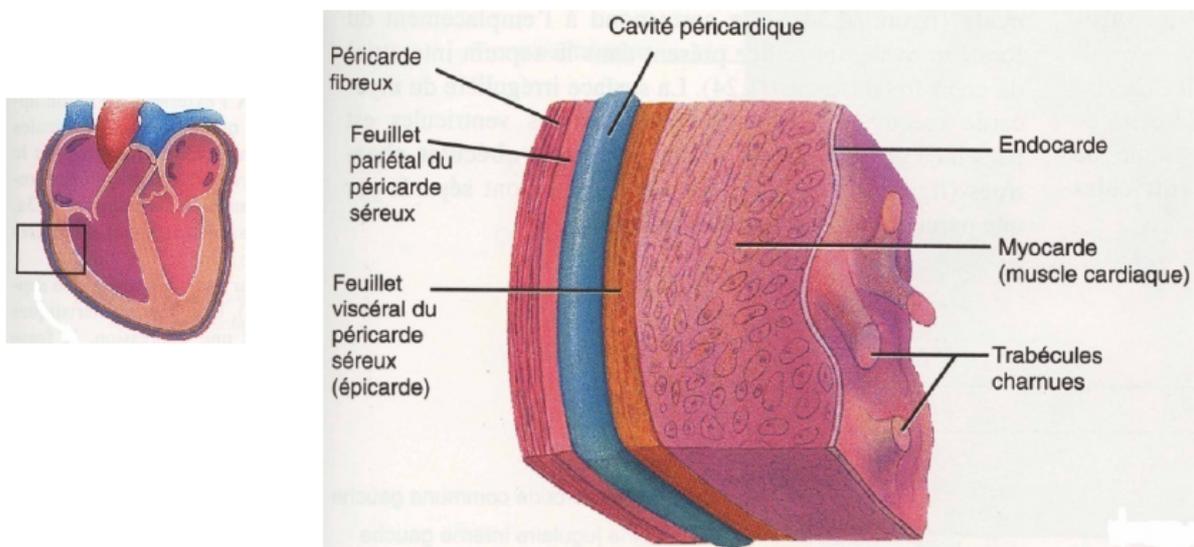


Figure 2 Structure de la paroi du cœur (D'après Totoro et Grabowski, 1994). Le myocarde, muscle strié, est tapissé à l'intérieur par l'endocarde et à l'extérieur par l'épicarde. Le péricarde est l'enveloppe extérieure du cœur.

Les cardiomyocytes adultes sont des cellules spécialisées, différenciées, qui ont perdu leur capacité à se diviser. Ils sont à la base de l'activité contractile du cœur, occupent environ 75% du volume myocardique, mais représentent en nombre seulement 20% des cellules cardiaques. Les cardiomyocytes isolés ont une forme grossièrement cylindrique d'environ 100 μm de long et 10 μm de large avec un noyau central. Ils sont généralement polynucléés, possèdent un cytoplasme riche en protéines et ions, et une grande quantité de mitochondries, essentielles dans le processus énergétique. De plus, ils possèdent un compartiment intracellulaire spécialisé dans le stockage et la libération du calcium : le réticulum sarcoplasmique (RS).

Le cardiomyocyte ventriculaire possède une membrane externe, le sarcolemme, qui présente des invaginations appelées tubule T qui peuvent être en contact avec les éléments contractiles de la cellule (Figure 3). Les myofibrilles sont des cylindres parallèles allongés dans le sens de la cellule, constitués de la succession régulière, de petits cylindres identiques appelés sarcomères. Les sarcomères représentent ainsi l'unité de base contractile des myofibrilles. Chaque sarcomère est fait d'un faisceau de myofilaments parallèles à son grand axe. Il existe 2 types de filaments (Figure 4) :

-Les filaments fins qui sont constitués de plusieurs protéines : l'actine, la tropomyosine et la troponine. La tropomyosine est une protéine qui s'intrique autour de l'actine pour la stabiliser et ainsi bloquer l'interaction des têtes de myosines avec l'actine. La troponine C (TnC) est la sous-unité responsable de la liaison avec le calcium. Une fois le calcium lié, le complexe troponine-calcium se déplace et libère la liaison entre la myosine et l'actine. A l'inverse, la troponine I (TnI) est la sous-unité responsable de l'inhibition de la liaison entre la myosine et l'actine. Elle a donc une fonction inhibitrice qui a pour effet d'amorcer la relaxation musculaire. Enfin, la troponine T (TnT) est la sous-unité responsable de la liaison avec la tropomyosine.

-Les filaments épais sont essentiellement constitués de la myosine. Au repos, la myosine est couplée à de l'ADP et du phosphate inorganique (Pi). Le Pi, puis l'ADP se détachent de ce complexe pour permettre un glissement des filaments d'actine sur les filaments de myosine, ce qui entraîne la contraction des fibres musculaires. L'adénosine triphosphate (ATP), en se fixant sur la myosine provoque un changement conformationnel, qui détache en partie la myosine du filament.

Outre les myocytes cardiaques, le cœur est composé de cellules endothéliales, qui recouvrent la paroi interne des vaisseaux sanguins (intima) et des cavités cardiaques. Ces cellules jouent un rôle essentiel dans le contrôle du tonus vasculaire et dans l'hémostase.

Le cœur est également composé de fibroblastes qui synthétisent la matrice extracellulaire assurant ainsi la cohésion du tissu musculaire et la transmission des forces exercées par les cardiomyocytes. Les fibroblastes représentent à eux seuls 70% des cellules cardiaques (Porter et Turner, 2009).

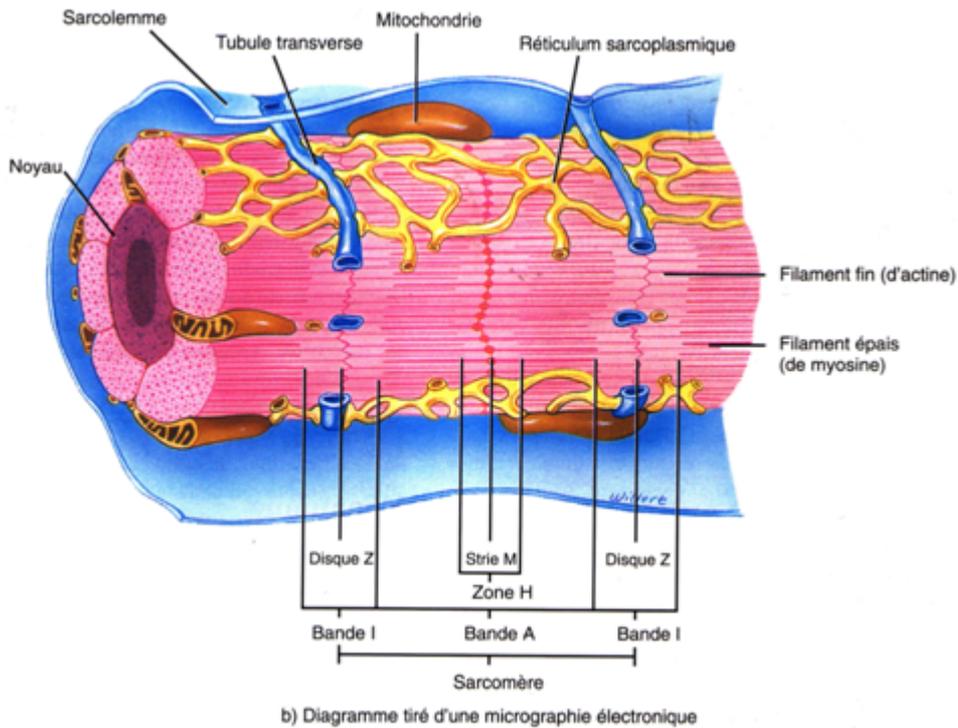
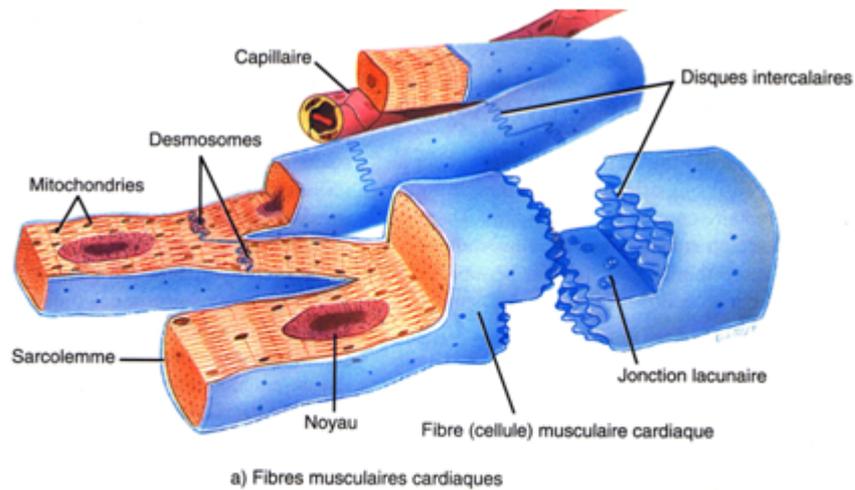


Figure 3 Anatomie et histologie du tissu musculaire cardiaque (D'après Totor et Grabowski, 1994).

Le sarcolemme est la membrane externe des cardiomyocytes et présente des invaginations : les tubules Transverses. Les noyaux sont au centre du cytoplasme. Le sarcoplasme des cellules cardiaques possède beaucoup de mitochondries. Le réticulum sarcoplasmique est un compartiment de stockage et de libération de calcium.

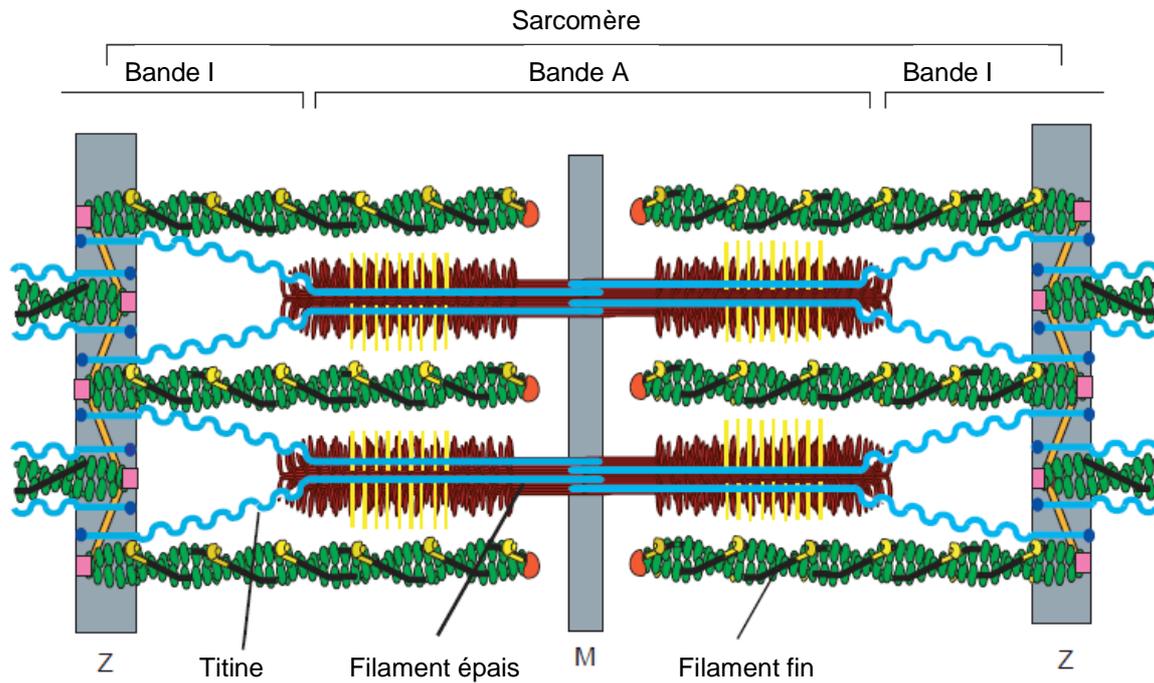


Figure 4 Structure des éléments contractiles du cardiomyocytes (D'après Gregorio et al., 2000). Le sarcomère est l'unité contractile des myofibrilles. La titine régule l'élasticité des sarcomères. Les filaments fins, insérés dans les stries Z, en les rapprochant, permettent un raccourcissement des sarcomères. Le filament épais, formé de myosine, est le facteur actif de la contraction musculaire en fournissant de l'énergie par l'hydrolyse de l'ATP. Les myofilaments d'actine en glissant sur les myofilaments de myosine assurent la contraction musculaire.

2) Fonction couplage excitation-contraction (CEC)

Le CEC est l'ensemble des processus assurant la transformation du stimulus électrique, c'est-à-dire du potentiel d'action, en un signal intracellulaire permettant la contraction des cellules myocardiques.

L'excitation des cardiomyocytes, induite par un potentiel d'action au cours de la systole, active les canaux calciques de type L (LTCC) sensibles à la dépolarisation membranaire. Ces canaux sont présents dans les tubules T. L'entrée de Calcium (Ca^{2+}) par ces LTCC va activer l'ouverture des canaux calciques du réticulum sarcoplasmique (récepteur de la ryanodine ou RyR), et ainsi induire une augmentation du calcium libre intracellulaire et amplifie le courant calcique appelé I_{Ca} . Ce mécanisme est appelé « calcium induced-calcium release » (CICR). L'augmentation globale du calcium intracellulaire active les myofilaments et donc le développement de la contraction cardiaque. La fixation des ions calcium à la TnC entraîne un changement de conformation des complexes troponine-myosine. Des ponts se forment entre l'actine et la myosine, permettant le glissement des filaments épais sur les filaments fins. Le raccourcissement des sarcomères induit alors une contraction cardiaque. Pour permettre la relaxation du muscle cardiaque, la concentration de Ca^{2+} cytosolique doit diminuer rapidement. La relaxation se produit lorsque le Ca^{2+} est libéré par la troponine C, puis « repompé » par la pompe calcique du réticulum sarcoplasmique, la SERCA (Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase) dont l'activité est régulée par le phospholamban. Enfin, l'inhibition exercée par le phospholamban sur l'activité de SERCA est levée lorsque celui-ci est phosphorylé.

3) Régulation de la fonction cardiaque par les hormones et les récepteurs à 7 domaines transmembranaires

La fonction cardiaque est régulée par de nombreux signaux mécaniques et hormonaux qui stimulent un large éventail de récepteurs présents à la surface des cardiomyocytes, des cellules endothéliales et des fibroblastes. En modulant les voies de signalisation intracellulaires, ces signaux influencent le rythme cardiaque (effet chronotrope), la force de la contraction (effet inotrope) et la vitesse de relaxation (effet lusitrope).

3.1 Les hormones intervenant dans la fonction cardiaque

La fonction cardiaque est régulée par différentes hormones qui peuvent réguler la contraction cardiaque et permettre au cœur de s'adapter aux divers stress qu'il reçoit.

Les catécholamines adrénaline et noradrénaline sont synthétisées à partir de la tyrosine par les cellules de la médullo-surrénale et par les neurones postganglionnaires du système nerveux sympathique. L'adrénaline agit comme hormone dans la circulation sanguine et en tant que neurotransmetteur dans le système nerveux central. La noradrénaline est un neurotransmetteur du système nerveux sympathique périphérique et est libérée dans le sang comme hormone de la médullo-surrénale. Ces neurohormones appelées hormones du stress, activent les récepteurs α et β -adrénergiques et induisent des effets chronotropes, inotropes et lusitropes positifs puissants (Salazar et al., 2007). Lors de pathologies, comme l'insuffisance cardiaque, le niveau de noradrénaline circulante et l'activité du système nerveux sympathique augmentent (Leimbach et al., 1986).

A l'inverse, **le neurohormone du système nerveux parasympathique** (acétylcholine) régulent négativement la fonction cardiaque en se liant aux récepteurs muscariniques (Salazar et al., 2007). L'acétylcholine est un neurotransmetteur qui joue un rôle important aussi bien dans le système nerveux central où elle est impliquée dans la mémoire et l'apprentissage, que dans le système nerveux périphérique, notamment dans l'activité musculaire et les fonctions végétatives.

De même, **les hormones du système endocrinien**, telles que l'endothéline-1 (ET-1) et l'angiotensine II (AngII), stimulent la contraction du myocarde. L'ET-1, produite par les cellules endothéliales vasculaires, induit de puissants effets vasoconstricteurs, ainsi que des effets chronotropes et inotropes positifs en se liant aux récepteurs de l'ET-1 (ET_A-R et ET_B-R). L'AngII est l'hormone clé du système rénine-angiotensine qui joue un rôle important dans la régulation du système cardiovasculaire. Elle contrôle la réabsorption hydro-sodée et la pression artérielle en stimulant la production d'aldostérone au niveau des glandes surrénales et stimule aussi la production de protéines par la matrice extracellulaire. L'angiotensinogène est la protéine inactive précurseur des peptides angiotensine I et II, produite par le foie (Figure 5). En cas de baisse de la pression dans l'artère rénale, la rénine est sécrétée au niveau des reins. L'angiotensinogène est clivé par la rénine en angiotensine I inactive. L'angiotensine I est ensuite principalement transformée en angiotensine II active par l'enzyme de conversion

de l'angiotensine. Ces différentes hormones sont impliquées dans l'hypertrophie cardiaque en agissant via leurs récepteurs membranaires.

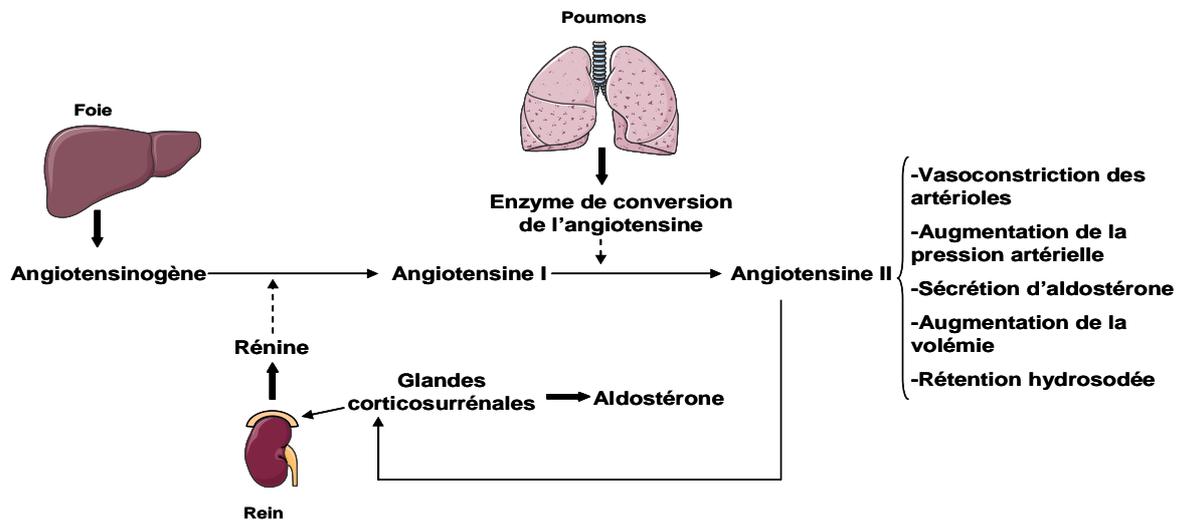


Figure 5 Système rénine angiotensine. Le foie produit l'angiotensinogène, qui est clivé par la rénine pour former l'angiotensine I. Elle est ensuite transformée par l'enzyme de conversion en angiotensine II. L'aldostérone est produite par les glandes corticosurrénales en réponse à l'angiotensine II. L'angiotensine II favorise l'élévation de la pression artérielle.

3.2) Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

Les récepteurs à 7 domaines transmembranaires, sont constitués de sept domaines hydrophobes par lesquels la chaîne d'acides aminés traverse successivement la membrane plasmique d'une face à l'autre. L'extrémité N-terminale est extracellulaire alors que l'extrémité C-terminale est cytoplasmique. Ils sont appelés RCPGs car ils sont couplés aux protéines G. Toutes les protéines G hétérotrimériques sont composées de sous-unités G_α et $G_{\beta\gamma}$. La liaison du ligand sur le site actif extracellulaire de leur RCPGs, induit l'activation des récepteurs par leur changement de conformation. Cette liaison active la protéine G, dissocie les sous unités G_α et $G_{\beta\gamma}$, et induit l'hydrolyse du GDP (guanosine diphosphate) en GTP (guanosine triphosphate) par la sous unité α (Figure 6). Les quatre principales familles de G_α (α_s , α_i , α_q , et $\alpha_{11/12}$) vont activer différents messagers intracellulaires et induire ainsi différentes réponses aux stimuli hormonaux. Les RCPGs sont impliqués dans de multiples processus cellulaires comme la croissance et la différenciation.

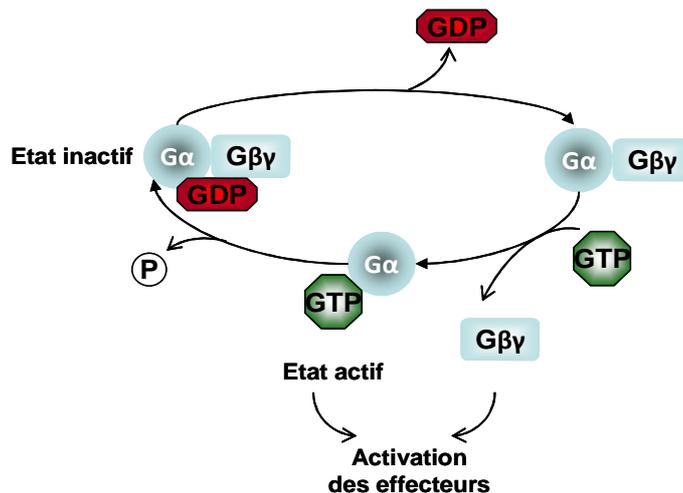


Figure 6 Activation des protéines G. A l'état inactif la protéine G est liée au GDP. La liaison de l'agoniste sur son récepteur active la protéine G hétérotrimérique. Les sous-unités G_{α} et $G_{\beta\gamma}$ se dissocient et la sous-unité G_{α} se lie alors au GTP. G_{α} .GTP et $G_{\beta\gamma}$ régulent ensuite divers effecteurs. Puis, les deux sous-unités se réassocient pour retourner à l'état initial.

GDP (guanosine diphosphate) ; GTP (guanosine triphosphate)

3.2.a) Les récepteurs α -adrénergiques (α -ARs)

Les récepteurs α -adrénergiques sont activés par l'adrénaline et la noradrénaline, ils répondent à une stimulation du système nerveux sympathique (Figure 7 et Tableau 1). Les récepteurs α -ARs sont majoritairement couplés à $G_{\alpha q}$ et régulent la contraction et la croissance cellulaire, l'apoptose des myocytes et l'hypertrophie cardiaque. La voie des récepteurs couplés à $G_{\alpha q}$ est plus stimulée lors de la mise en place de l'hypertrophie. Il existe deux sous-types de récepteur α -ARs : α_1 et α_2 -ARs qui existent sous différentes formes : α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} . Ils ont été classés selon l'étude de leur ligand et de leurs fonctions (Tableau 1). Dans le cœur les formes majoritaires sont : α_{1A} et α_{1B} .

	Agonistes	Antagonistes
Récepteur α_1-adrénergique	phényléphrine methoxamine Cirazoline Amidephrine Sgd 101/75	prazosine WB-4101 Corynanthine phenoxybenzamine
Non sélectif	noradrénaline Adrénaline	phentolamine Tolazoline
Récepteur α_2-adrénergique	Clonidine α -methylnoradrénaline BHT-933 BHT-920 UK-14,304	Rauwolscine Yohimbine Idazoxan

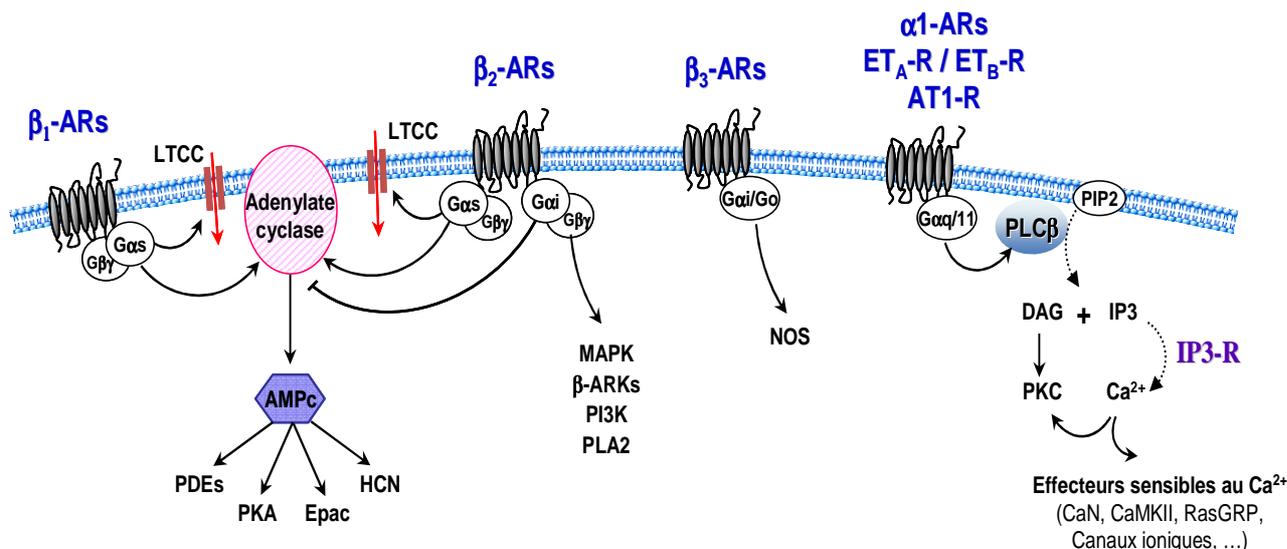
Tableau 1 Agonistes et antagonistes communément utilisés pour la classification des récepteurs α_1 et α_2 -adrénergiques (D'après Ruffolo et al., 1991).

-Les récepteurs α_1 -adrénergiques (α_1 -ARs)

Les récepteurs α_1 sont activés par la phényléphrine et inhibés irréversiblement par le phénoxybenzamine (Minneman, 1988) (Tableau 1). Les récepteurs α_{1A} ont une forte affinité pour le prazosine alors que son affinité est faible pour les récepteurs α_{1B} . Les récepteurs se retrouvent dans quasiment tous les tissus. Les sous types α_{1A} et α_{1B} -ARs sont présents dans le myocarde humain (Jensen et al., 2009). α_{1A} est le plus exprimée chez l'homme, tandis que α_{1B} est majoritairement présent chez les rongeurs (Woodcock et al., 2008 ; Cotecchia, 2010). La stimulation des récepteurs α_1 -ARs induit des réponses inotropes positives dans différentes espèces incluant l'homme, ainsi qu'une réponse chronotrope positive dans le cœur de rat (Minneman, 1988 ; Landzberg et al., 1991 ; Flavahan et al., 1981). Classiquement les récepteurs α_1 -ARs sont couplés à Gq (Hubbard et Kepler, 2006). La surexpression des récepteurs α_{1B} -ARs sous contrôle du promoteur α -MHC chez des souris diminue la réponse contractile induite par les récepteurs β -ARs, qui est un des premiers mécanismes qui se met en place pour augmenter les performances du cœur (Akhter et al., 1997). Le récepteur α_1 -AR est aussi présent dans les fibroblastes cardiaques. Ce récepteur régule la synthèse protéique, et la sécrétion d'interleukine comme l'interleukine 6 (Burger et al., 2001). Enfin, ces récepteurs sont particulièrement abondants dans les muscles vasculaires lisses et augmentent leurs contractions. Les récepteurs α_{1A} , α_{1B} et α_{1D} -ARs contribuent au tonus vasculaire avec un rôle prédominant de α_{1A} et α_{1D} (Cotecchia, 2010).

-Les récepteurs α_2 -adrénergiques (α_2 -ARs)

Tous les récepteurs α_2 -ARs sont inhibés par la yohimbine et la rauwolscine (Tableau 1). Le récepteur α_{2A} -AR a une faible affinité pour le prazosine contrairement aux récepteur α_{2B} - et α_{2C} -ARs. Le récepteur α_{2C} -AR a une forte affinité pour la rauwolscine (Bylund et al., 1994). Le récepteur α_{2D} -AR, quand à lui, a une faible affinité pour la rauwolscine, mais le récepteur α_{2D} -AR de rat n'est peut être que l'homologue du récepteur α_{2A} -AR humain (Bylund et al., 1994 ; Rump et al., 1995). Les récepteurs α_2 -ARs sont localisés près des terminaisons nerveuses présynaptiques noradrénergiques, ou ils inhibent le relargage de l'adrénaline et de la noradrénaline (Parker et al., 1995 ; Rump et al., 1995). Dans les oreillettes cardiaques de souris, ce sont particulièrement les sous types α_{2C} et α_{2A} -ARs qui inhibent le relargage de la noradrénaline des terminaisons nerveuses sympathiques (Hein et al., 1999). L'activation des récepteurs α_2 -ARs inhibe l'activité de l'adénylate cyclase (Limbird, 1988). Dans le muscle vasculaire lisse, le récepteur α_{2B} -AR fortement exprimé y régule la vasoconstriction. Il est aussi exprimé dans le système nerveux central (Link et al., 1996 ; MacDonald et al., 1997).



RCPGs	β_1 -ARs	β_2 -ARs	β_3 -ARs	α_1 -ARs / $ET_{A,B}$ -R / AT1-R
Agonistes	Adrénaline, Noradrénaline	Adrénaline, Noradrénaline	Adrénaline, Noradrénaline	Adrénaline, Noradrénaline / Entothéline-1 / Angiotensine II
Effets	Chronotrope positif Inotrope positif Lusitrope positif	Inotrope positif Lusitrope positif (?)	Inotrope négatif	Chronotrope positif Inotrope positif

Figure 7 Récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) stimulant la fonction cardiaque et leurs voies de signalisation. L'activité du myocarde est régulée par différents types de RCPGs présents à la surface des cardiomyocytes et des cellules non-myocardiques. Ces récepteurs activent un ensemble complexe de voies de signalisation intracellulaires permettant de contrôler le rythme cardiaque (effet chronotrope), la force de la contraction (effet inotrope) et la vitesse de relaxation (effet lusitrope). Ainsi, les β_1 -ARs et β_2 -ARs sont positivement couplés à la protéine Gs et à la production du second messager Adénosine 3',5', monophosphate cyclique (AMPC) via l'activation de l'adénylate cyclase. Ce second messager active différents effecteurs tels que la protéine kinase A (PKA), les protéines Exchange protein directly activated by cAMP (Epac), les phosphodiesterases (PDEs) ou les canaux Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated cation channels (HCN). Les β_2 -ARs sont également couplés à la protéine Gi qui inhibe l'adénylate cyclase et active différentes voies de signalisation par l'intermédiaire de la sous unité $G_{i\beta\gamma}$. Les β_3 -ARs induisent des effets inotropes négatifs en activant la voie oxyde nitrique synthétase (NOS). Enfin les récepteurs α -ARs, de l'ET-1 et de l'AngII sont couplés aux protéines Gq qui stimulent la PLC β (phospholipase C). Cette dernière hydrolyse les phosphoinositols de la membrane plasmique en diacylglycérol (DAG) et en inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) qui activent respectivement les protéines kinase C (PKC) et la libération de Ca^{2+} par les récepteurs de l'inositol triphosphate (IP3R).

3.2.b) Les récepteurs β -adrénergiques (β -ARs)

Les récepteurs β -ARs représentent l'un des plus puissants régulateurs de la fonction cardiaque. A l'état physiologique, les récepteurs β -ARs régulent la force de contraction et de relaxation du myocarde, permettant une réponse appropriée en fonction de l'exercice ou du stress physiologique. Ils modèrent aussi la glycogénolyse et le débit cardiaque. En réponse à une demande croissante en oxygène et nutriments de la part des organes et tissus, le système nerveux sympathique active les récepteurs β -ARs par les catécholamines (adrénaline, noradrénaline). Les récepteurs β -ARs sont classiquement couplés à la protéine Gs induisant ainsi, via l'activation de l'adénylate cyclase, une augmentation de la production du second messenger Adénosine 3',5' monophosphate cyclique (AMPc). Ils peuvent aussi être couplés à la protéine Gi, qui inhibe l'adénylate cyclase (Figure 7).

Chez les mammifères il existe 4 types de récepteurs β -ARs : β_1 , β_2 , β_3 , β_4 , qui par leur capacité à activer différents types de protéines G et différentes voies de signalisation, offrent une réponse très diversifiée qui permet une régulation fine de la fonction cardiaque (Berthouze et al., 2011).

-Le récepteur β_1 -adrénergique (β_1 ARs) est prédominant dans le cœur (environ 75-80% des récepteurs β -ARs totaux). Ils sont distribués au niveau des sarcolemmes et tubules T. La stimulation des récepteurs β_1 -ARs par les catécholamines induit des effets inotropes et lusitropes positifs puissants liés à l'activation de la voie de l'AMP cyclique, et à la PKA (protéine kinase A) qui phosphoryle et active les protéines clés du couplage excitation-contraction comme les LTCC et RyR2, et augmente ainsi la probabilité et le temps d'ouverture de ces canaux calciques (Tilley et Rockman, 2006). La PKA augmente ainsi les concentrations cytosoliques de Ca^{2+} et favorise la contraction des myofilaments (Bers, 2008). Les récepteurs β_1 -ARs sont aussi présents à la membrane nucléaire, couplés à Gs ils activent l'adénylate cyclase (Boivin et al., 2006).

- Les **récepteurs β_2 -adrénergiques (β_2 -ARs)** représentent 20 à 25% des récepteurs β -ARs cardiaques (Madamanchi, 2007). Ils sont distribués au niveau des sarcolemmes et tubules T. La distribution des β_2 -ARs dans les cavéoles (invagination de la membrane plasmique) induit un effet plus local lors des stimulations adrénérgiques (Tilley et Rockman, 2006). Les récepteurs β_2 -ARs sont couplés aux protéines G_{α_s} et une stimulation prolongée des récepteurs β_2 -ARs induit préférentiellement un couplage à G_{α_i} . Les mécanismes par lesquels les β_2 -ARs modulent la fonction contractile sont controversés. Ils exerceraient des réponses inotropiques sur l'oreillette humaine mais auraient beaucoup moins d'effets dans le ventricule (El-Armouche et al., 2009). Des études réalisées sur des cardiomyocytes de souris néonatales ou adultes montrent que les β_2 -ARs induisent une augmentation locale d'AMPc et activent uniquement les canaux calciques LTCC au voisinage du récepteur. Ils stimuleraient ainsi la contraction mais pas la relaxation (Kuschel et al., 1999 ; Devic et al., 2001 ; Xiao 2000). Certaines études indiquent que les β_2 -ARs sont directement couplés aux LTCC et qu'ils induisent une contraction indépendante de la PKA (Devic et al., 2001). A l'inverse, d'autres travaux réalisés sur des cardiomyocytes de rats adultes montrent que les β_2 -ARs sont capables de phosphoryler le phospholamban, la TnI et la protéine C cardiaque liant la myosine (cMyBP-C) par l'intermédiaire de la PKA, et influenceraient ainsi la relaxation (Bartel et al., 2003). L'utilisation de modèles expérimentaux distincts (espèces animales, âges et protocoles variables) explique probablement les différences observées.

-**Le récepteur β_3 -adrénergique (β_3 ARs)** est le sous-type de récepteur le moins abondant dans le cœur. Le récepteur β_3 -AR à 50% d'homologie avec les récepteurs β_1 et β_2 -ARs mais nécessite une forte concentration de catécholamines pour être activé (Perrone et Scilimati, 2011 ; Moens et al., 2010). Il est couplé à G_s mais aussi à G_i (Moens et al., 2010). Contrairement aux β_1 - et β_2 -ARs, la stimulation des β_3 -ARs diminue la contraction cardiaque (Gauthier et al., 1998 ; Moens et al., 2010 ; Tilley et Rockman, 2006 ; Moniotte et al., 2001). Des études réalisées sur des tissus ventriculaires humains ou sur des souris invalidées pour le gène β_3 -AR montrent que les effets inotropes négatifs des β_3 -ARs sont liés à l'activation d'une voie atypique impliquant la protéine G_i/o et la production d'oxyde nitrique (NO). (Gauthier et al., 1998 ; Varghese et al., 2000). Dans le tissu atrial humain en revanche, les β_3 -ARs induisent des effets inotropes positifs liés à l'activation de la PKA (Skeberdis et al., 2008). Dans les cardiomyocytes ventriculaires, les récepteurs β_3 -ARs localisés à la membrane nucléaire régulent la transcription (Boivin et al., 2006). Enfin, il régule aussi la relaxation des muscles lisses vasculaire.

-L'existence d'une quatrième forme de β -ARs (**β_4 -ARs**) a été suggérée (Molenaar et al., 1997). Ce récepteur serait cependant attribué à un état conformationnel particulier du β_1 -AR (Skeberdis, 2004).

3.2.c) Les autres récepteurs impliqués dans la régulation cardiaque

Il existe d'autres récepteurs qui peuvent intervenir dans la régulation cardiaque. Ceux couplés à -Gi, tels que le récepteur muscarinique, le récepteur à l'adénosine, le récepteur aux opiacés et le récepteur de facteur natriurétique atrial. La forme majoritaire du **récepteur muscarinique** dans le cœur est l'isoforme M2. Ce récepteur est activé par l'acétylcholine, il induit des effets inotropes négatifs (Salazar et al., 2007). La densité des récepteurs M2 muscarinique augmente chez les patients avec une insuffisance cardiaque (Le Guludec et al., 1997).

-Gs, tels que les récepteurs à l'adénosine, les récepteurs au glucagon, les récepteurs aux prostanoides, et les récepteurs histaminiques. Le **récepteur à l'adénosine** est connu pour avoir des effets cardioprotecteurs dans l'ischémie (Ely et al., 1992). Ce récepteur peut aussi être couplé à Gi. **Le récepteur aux prostanoides** joue un rôle dans la croissance cellulaire chez les myocytes nouveaux nés et régule la pression sanguine (Mendez et LaPointe, 2002). Dans le cœur sain, la production d'**histamine** augmente l'activité atriale et le débit cardiaque.

-Gq, tels que les récepteurs à l'angiotensine et les récepteurs à l'endothéline. L'endothéline est un vasoconstricteur et un facteur de croissance qui favorise l'inotropisme positif, le chronotropisme positif et l'hypertrophie. **Le récepteur de l'endothéline-1** intervient dans le remodelage cardiaque et l'hypertrophie (Asano et al., 2002). **Le récepteur à l'angiotensine** existe sous deux isoformes : AT1 et AT2. La stimulation des récepteurs de l'AngII dans le myocarde, notamment des récepteurs AT1-R, induit des effets chronotropes, inotropes positifs et lusitropes négatifs (Mattiuzzi, 1997). La densité des récepteurs AT1 et AT2 augmente de manière homogène dans le ventricule gauche de rats âgés (Heymes et al., 1998).

3.3) Les adénylates cyclases (AC)

Après stimulation des β -ARs, la sous-unité $G_{\alpha s}$ se dissocie de la protéine G, et active l'adénylate cyclase. Le rôle de l'adénylate cyclase est de synthétiser le second messenger AMPc intracellulaire, à partir de l'ATP cytosolique en libérant deux phosphates. L'AMPc peut ensuite activer ses différents effecteurs. Il existe 9 isoformes d'adénylate cyclase (AC1 à AC9) et une AC soluble (ACs), surtout présente au niveau des testicules. Cette AC n'est pas régulée par les hormones ni par les protéines G mais par le bicarbonate et le calcium (Kamenetsky et al., 2006). Les 2 isoformes d'adénylates cyclases les plus présentes dans le cœur sont la V et la VI. L'AC V est surtout exprimée dans les oreillettes tandis que l'AC VI est exprimée aussi bien dans les oreillettes que dans les ventricules et est localisée près des récepteurs β_1 -ARs (Wang et Brown, 2004). Le développement cardiaque ontogénique est associé à un changement dans le niveau de l'acide ribonucléique messenger (ARNm) codant pour l'AC V et l'AC VI. L'isoforme AC de type V est un isoforme adulte alors que l'isoforme AC de type VI est plus exprimé dans le cœur de nouveau-né. L'AC VI est fortement exprimée dans le cœur fœtal, diminue graduellement avec l'âge et atteint des niveaux relativement faible dans le cœur adulte. Le profil d'expression de l'AC V est inversé. Le niveau d'expression est faible chez le fœtus, augmente graduellement avec l'âge et atteint un niveau maximal chez l'adulte (Espinasse et al., 1995).

3.4) l'AMPc

L'AMPc est un second messenger qui a un rôle primordial dans la régulation de la fonction cardiaque. La voie de l'AMPc est activée et régulée par les β -ARs. Le niveau intracellulaire de l'AMPc résulte d'une balance entre deux types d'enzymes : les adénylates cyclases qui assurent sa synthèse et les phosphodiésterases (PDEs) qui le dégradent en 5' AMP. L'AMPc agit par l'intermédiaire de trois effecteurs : la PKA, EPAC (Exchange protein directly activated by cAMP) et les canaux HCN (Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated cation channels).

3.5) Les effecteurs de l'AMPc

- La PKA

Après activation de l'AC, l'augmentation en AMPc intracellulaire active la PKA. La PKA est une kinase composée de 4 sous-unités : deux sous-unités catalytiques et deux sous-unités régulatrices. La fixation de l'AMPc sur les sous-unités régulatrices de la PKA induit la dissociation des sous-unités catalytiques de la PKA (Figure 8). La kinase peut alors phosphoryler des résidus sérines thréonines spécifiques sur ces cibles. La réponse de la PKA est aussi régulée par les protéines AKAP (Protéine d'ancrage des PKA), liées aux sous-unités régulatrices de la PKA. Le rôle de la PKA est de phosphoryler et d'activer les protéines clés du couplage excitation-contraction tel que les LTCC, RyR, et les protéines du myofilaments (Bers, 2002).

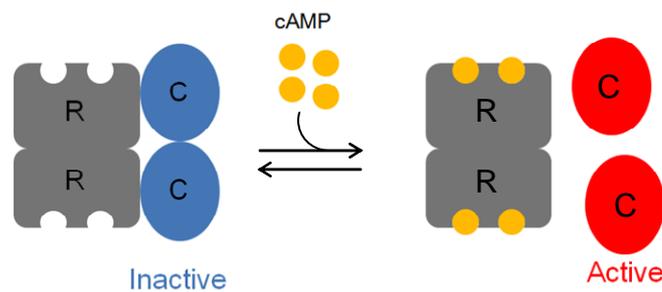


Figure 8 Représentation schématique de la structure de la PKA et de son activation. La PKA est une holoenzyme constituée de deux sous unités-catalytiques (C) reliées de manière non-covalente à un dimère de sous-unités régulatrices (R). Chaque sous-unité régulatrice possède deux sites de liaison à l'AMPc (sites A et B). Sous sa forme inactive, seul le site B est accessible à l'AMPc. La fixation de l'AMPc sur le site B, induit un changement de conformation qui libère l'accès au site A. La liaison de 4 molécules d'AMPc sur les sous unités régulatrices libère les sous unités catalytiques. Ces dernières, ainsi activées, phosphorylent les résidus sérine et thréonine sur leurs substrats spécifiques.

- *La protéine EPAC*

Les effets de l'AMPc sont classiquement attribués à la PKA. Cependant il existe aussi une famille de protéines liant directement l'AMPc et qui s'appelle EPAC (de Rooij et al., 1998 ; Kawasaki et al., 1998). Epac est un facteur d'échange pour les petites protéines G Rap 1, Rap 2 et Ras (de Rooij et al., 1998) (Figure 9). Il existe 2 isoformes de la protéine Epac : Epac1 et Epac 2. Chez l'homme, les ARNm codant pour Epac1 sont particulièrement abondants dans le cœur, le rein, la thyroïde et les ovaires, et plus faiblement exprimés dans le cerveau (de Rooij et al., 1998 ; Kawasaki et al., 1998). Les ARNm codants pour Epac2 sont principalement exprimés dans le cerveau ainsi que dans les tissus endocrines (Kawasaki et al., 1998). Epac est exprimé dans différents compartiments cellulaires comme le noyau, le cytosol, la membrane plasmique et nucléaire et sa localisation varie selon le type cellulaire et le cycle cellulaire (Breckler et al., 2011). Epac 1 est fortement exprimé dans les cardiomyocytes de ventricules et est localisé dans le sarcolemme et autour du noyau. Epac possède une région N-terminale liant l'AMPc et un domaine catalytique C-terminal qui est responsable de l'activation des petites protéines G Rap1 et Rap2. Suite à la fixation de l'AMPc, Epac catalyse l'échange du GDP en GTP sur les petites protéines GTPases Rap, permettant ainsi leurs interactions avec leurs effecteurs spécifiques (Figure 9) (Schmidt et al., 2007). Epac régule l'exocytose dans différents types cellulaires (comme par exemple la sécrétion d'insuline ou la libération de neurotransmetteur). Il joue un rôle important dans l'adhésion et la formation des jonctions cellulaires, dans les processus inflammatoires (en régulant l'adhésion des cellules lymphocytaires) et régule la croissance et la prolifération cellulaires. La protéine Epac régule le couplage excitation contraction par des effets inotropes positif et en influençant la sensibilité du Ca^{2+} et des myofilaments (Pereira et al., 2007 ; Cazorla et al., 2009). La contraction cardiaque est aussi affectée par une augmentation des jonctions communicantes qui régulent le passage des ions et de petites molécules. Epac régule aussi la formation de jonctions communicantes (Somekawa et al., 2005). Enfin, l'activation de Epac par le récepteur β -AR dans les cardiomyocytes induits l'hypertrophie cardiaque (Morel et al., 2005 ; Metrich et al., 2008) (Cf. III).

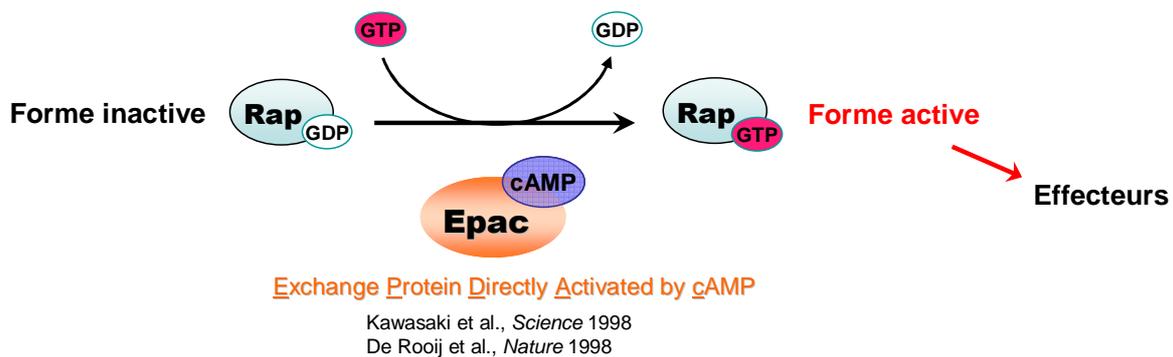


Figure 9 Facteur d'échange Epac, nouvelle cible de l'AMPc activant les GTPases Rap.

Les protéines Epac ont été identifiées il y a une dizaine d'années comme de nouvelles cibles de l'AMPc agissant indépendamment de la PKA. Ce sont des facteurs d'échange des GTPases de la famille Ras, Rap1 et Rap2. En effet, les GEFs Epac catalysent l'échange du GDP contre du GTP sur ces petites protéines G, favorisant ainsi la forme active de Rap qui peut alors activer ses effecteurs.

- Les canaux HCN

Les canaux HCN sont des canaux voltage-dépendants, activés par une hyperpolarisation et régulés par l'AMPc. Chez les vertébrés, la famille des canaux HCN est composée de quatre membres (HCN1-4). Les canaux HCN détectés au niveau du cœur sont HCN 1, 2 et 4. Le courant associé à ces canaux est connu sous le nom du courant If ou courant pacemaker (Biel et al., 2002 ; Mangoni et Nargeot, 2008).

3.6) La PLC (phospholipase C)

Chez les mammifères, il existe 6 familles d'enzymes PLC (PLC β , γ , δ , ϵ , ζ et η) qui sont divisées en 13 isoformes chez l'homme (Bunney et Katan, 2011). L'activation des α_1 ARs par les catécholamines induit le recrutement à la membrane et l'activation de la protéine PLC β via la protéine Gq. La PLC β hydrolyse alors le PIP2 (phosphatidylinositol 4,5 biphosphate) en diacylglycérol (DAG) et inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) (Hubbard et al., 2006 ; Rhee, 2001).

- L'IP3, en se fixant sur les récepteurs à l'IP3 (IP3R) du réticulum sarcoplasmique, induit le relargage du Ca²⁺ dans le cytoplasme et l'activation de protéines Ca²⁺ dépendantes.

- Le DAG active plusieurs isoformes de la sérine thréonine kinase PKC, composée d'un domaine régulateur et d'un domaine catalytique. Il y a trois familles principales de PKC (Naruse et King, 2000) :

- les conventionnelles (PKC α , β et γ): qui sont dépendantes du Ca²⁺ et du DAG

- les nouvelles (PKC δ , ϵ , η , et θ): sont indépendantes du Ca²⁺ mais sont activées par le DAG.

- les atypiques : sont indépendantes du Ca²⁺ et du DAG.

La PKC joue un rôle dans l'apoptose, la nécrose et la transcription des gènes de l'hypertrophie (Duquesnes et al., 2011 ; Simpson et al., 1991). L'isoforme PKC α altère la contraction cardiaque mais n'a pas d'effet sur la croissance cardiaque *in vivo*, bien qu'elle induise tous les marqueurs de l'hypertrophie cardiaque *in vitro* (Hahn et al., 2003 ; Braz et al., 2004). L'isoforme PKC β joue un rôle dans la contraction, l'hypertrophie, la croissance des cardiomyocytes (Wakasaki et al., 1997). La PKC δ participerait à la dysfonction cardiaque (Chen et al., 2001). Un des traitements de l'infarctus du myocarde est la reperfusion de l'artère coronaire occluse, mais il produit des lésions. Les inhibiteurs de la PKC δ préviennent les lésions de la reperfusion dans un modèle porcin d'infarctus du myocarde aigu *in vivo* en inhibant en partie l'apoptose (Inagaki et al., 2003). Des souris surexprimant la PKC ϵ ou un activateur spécifique de la PKC ϵ dans le myocarde, ont également une masse ventriculaire augmentée avec une fonction myocardique normale suggérant que la PKC ϵ induit une hypertrophie cardiaque fonctionnelle de type physiologique (Mochly-Rosen et al., 2000 ; Takeishi et al., 2000).

Après avoir vu les protéines clés impliquées dans la régulation cardiaque, nous allons étudier l'hypertrophie cardiaque et ces différents stimuli et conséquences, ainsi que l'insuffisance cardiaque et ces traitements.

II - Hypertrophie et insuffisance cardiaque

1 – Hypertrophie cardiaque

1.1) Définition

L'hypertrophie cardiaque (HC) est un processus d'adaptation qui se développe en réponse à une surcharge de travail hémodynamique. Elle se traduit par un remodelage cardiaque qui conduit à une augmentation de la masse musculaire myocardique permettant de normaliser la pression exercée sur la paroi du myocarde et d'améliorer la capacité de pompage du cœur (Heineke et Molkentin, 2006 ; Swynghedauw, 2006) (Figure 10 et Figure 12). L'HC adapte le cœur à de nouvelles conditions de travail en multipliant les protéines contractiles et en tentant de réduire l'étirement de la paroi. Au niveau histologique, l'HC est caractérisée par une augmentation de la taille des myocytes sans hyperplasie (prolifération cellulaire). De multiples stimuli biomécaniques, neurohormonaux et génétiques peuvent être responsables d'une HC dont on distingue généralement deux formes : l'hypertrophie physiologique et l'hypertrophie pathologique.

1.2) Caractéristiques de l'hypertrophie cardiaque

Dans un premier temps, l'hypertrophie est fonctionnelle et compensatoire en augmentant la force développée par les ventricules. Néanmoins, elle devient délétère et représente un risque majeur de morbidité et mortalité dans les pays industrialisés car elle conduit à l'insuffisance cardiaque (Gardin et al., 2004). L'HC est un facteur de risque pouvant conduire à l'ischémie, l'arythmie et la mort subite.

L'hypertrophie cardiaque compensée, dite physiologique, est associée à une adaptation bénéfique car elle augmente les capacités de pompage du cœur. Elle est caractérisée par un épaississement uniforme de la paroi des ventricules et du septum, et elle est réversible. Ce type d'HC s'observe lors de la cardiogenèse et de la croissance normale du cœur après la naissance, ainsi que chez les sportifs et peut également survenir pendant la grossesse (Pluim et al., 2000).

En revanche, **l'hypertrophie cardiaque dite pathologique**, est très souvent associée à un remodelage cardiaque entraînant une dysfonction du ventricule gauche. Ce remodelage a été défini par Cohn et al. (2000) comme « l'expression génomique [qui] aboutit à des modifications moléculaires, cellulaires et interstitielles qui se manifestent cliniquement par des modifications de taille, de formes, et de fonction du cœur au décours d'une atteinte cardiaque ». Elle se développe généralement de manière secondaire à une pathologie préexistante. Les différents stimuli hypertrophiques induisent deux types d'hypertrophie pathologique (Hill et Olson, 2008).

-**L'hypertrophie concentrique** se traduit par un épaississement de la paroi des ventricules et du septum accompagné d'un élargissement des myocytes (Figure 10) (Hunter et Chien, 1999). Elle se développe en réponse à une augmentation chronique et excessive de la post-charge (résistance rencontrée lors de l'éjection systolique). La surcharge de pression entraîne une augmentation du diamètre des myocytes sans modification significative de leur longueur. Une réorganisation et une synthèse de nouveaux sarcomères en parallèle, conduisant à un épaississement des cardiomyocytes, permet une augmentation de la force développée par les ventricules. L'hypertrophie concentrique s'observe le plus souvent dans les cas d'hypertension artérielle chronique ou de sténose des valves aortiques (Towbin et Bowles, 2002 ; Barry et Townsend, 2010).

-**L'hypertrophie excentrique** est caractérisée par une dilatation de la cavité ventriculaire qui permet d'augmenter le volume des ventricules et de maintenir (dans un premier temps) le volume de sang éjecté. Ce phénotype est associé à une élongation des cardiomyocytes (Figure 10) (Hunter et Chien, 1999). Elle est induite par une augmentation de la pré-charge (distension des cardiomyocytes lors de la diastole). Elle entraîne une faible augmentation du diamètre des cellules et une augmentation significative de leur longueur. Une réorganisation et une synthèse de nouveaux sarcomères en série conduit à un allongement des cardiomyocytes, améliorant la force de contraction. L'hypertrophie excentrique s'observe dans les cardiomyopathies dilatées, la régurgitation mitrale ou après infarctus du myocarde (Towbin et Bowles, 2002 ; Barry et Townsend, 2010).

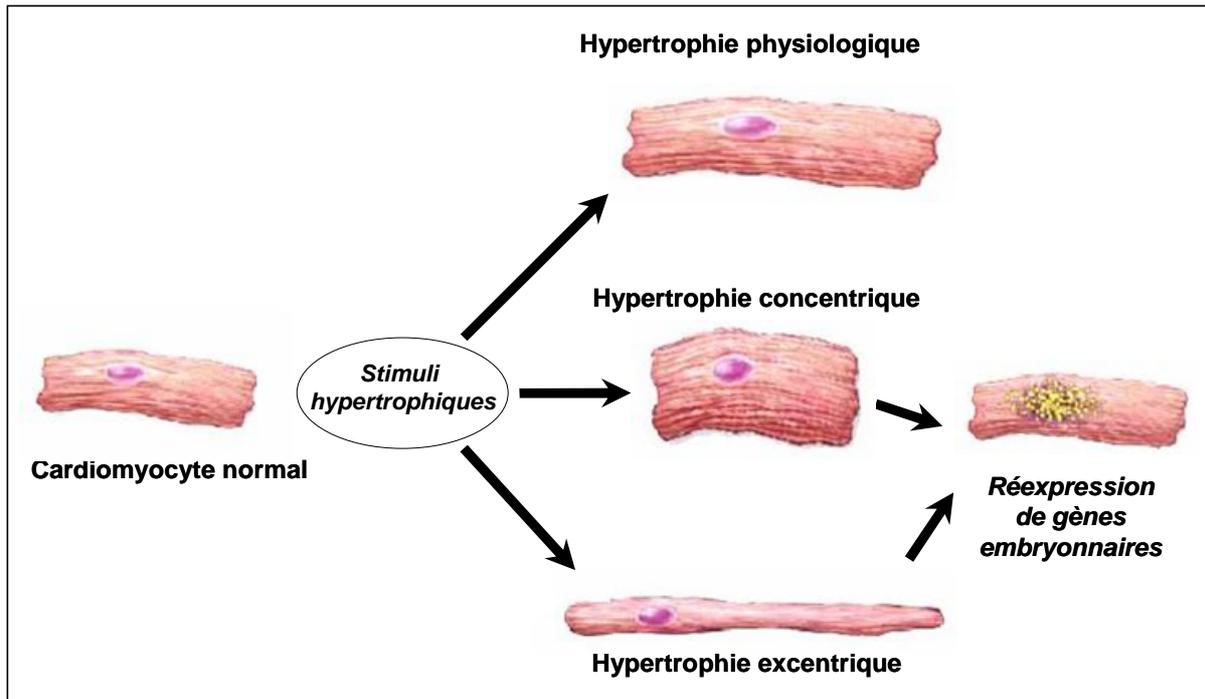


Figure 10 Schéma représentant la morphologie des cardiomyocytes dans les différents types d'hypertrophie cardiaque (D'après Hunter et Chien, 1999). Au niveau cellulaire l'hypertrophie cardiaque est caractérisée par une augmentation de la taille des cardiomyocytes. Selon le type d'hypertrophie, physiologique, concentrique ou excentrique, la morphologie des cellules n'est pas la même. Dans le cas des hypertrophies pathologiques, ces changements morphologiques sont associés à la réexpression des gènes fœtaux tels que les gènes de l' α -actine squelettique, de la chaîne lourde de la myosine ou encore le peptide natriurétique ANF.

2)- Diversité des stimuli hypertrophiques

Les stimuli de l'hypertrophie cardiaque peuvent avoir plusieurs origines : des facteurs mécaniques ou hormonaux. Lorsque les cellules myocardiques perçoivent un stress provenant d'un étirement ou des signaux neuro-hormonaux, une réponse se met en place pour augmenter la force de contraction. A long terme, cela peut conduire à l'hypertrophie cardiaque.

2.2.a) Facteurs mécaniques

L'application de forces sur un organe entraîne une réponse cellulaire. Lors du cycle cardiaque, le cœur est en permanence soumis à des variations de pression auxquelles il doit s'adapter. L'augmentation continue de la surcharge de pression hémodynamique étire les fibres et le sarcomère. Une réponse se met alors en place pour améliorer la force de contraction. Tout d'abord le stress mécanique est perçu grâce à différents senseurs mécaniques incluant : les canaux sensibles à l'étirement qui régulent les courants ioniques ; la titine (protéine liée au myofilament qui régule l'élasticité des sarcomères) ou encore les intégrines (protéines permettant la liaison du cytosquelette à la matrice extracellulaire) (Linke, 2008 ; Liu et al., 2000) (Figure 11). Les intégrines transmettent le signal d'étirement par l'intermédiaire des protéines du cytosquelette telle que l' α -actinine, et peuvent aussi participer à la libération autocrines/paracrines d'hormones, ainsi qu'à la transactivation des récepteurs de facteurs de croissances. En effet, lors de stress mécanique, les facteurs de croissance sont sécrétés. D'autre part, certaines voies de signalisation comme celle de l'endothéline ou de l'angiotensine II sont activées par la libération de facteurs autocrines/paracrines ou par les protéines impliquées dans l'adhésion de la cellule à son support (van Wamel et al., 2001). La dernière phase de la réponse musculaire à l'étirement est l'augmentation de la synthèse protéique. En effet, la phosphorylation des facteurs de croissance, activera les protéines régulatrices du cytoplasme, qui migreront dans le noyau pour réguler la transcription des gènes pouvant mener à l'hypertrophie cardiaque.

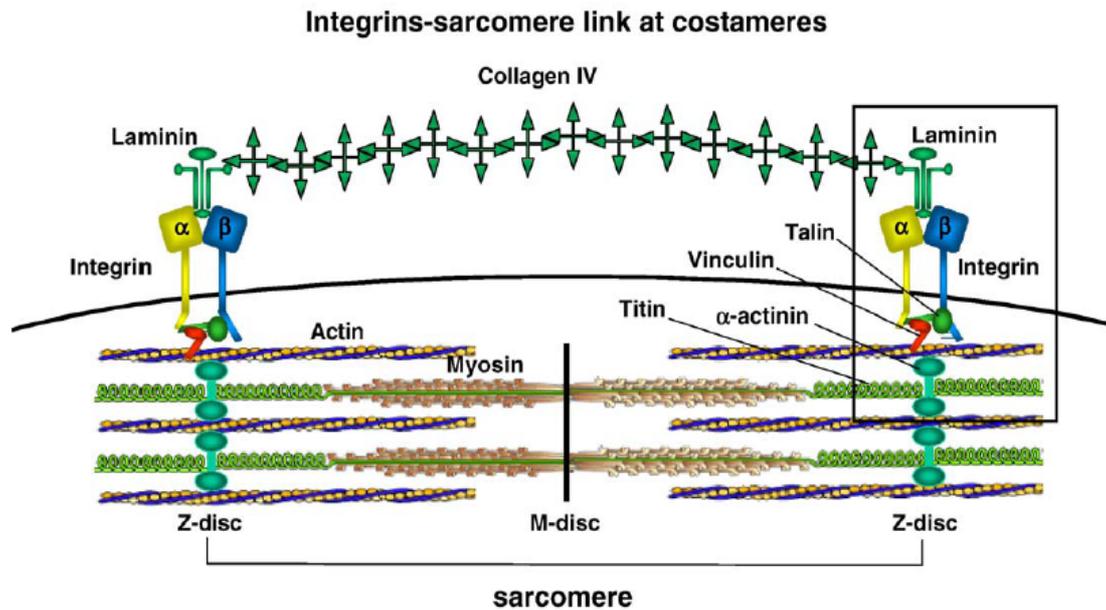


Figure 11 Les intégrines (D'après Brancaccio et al., 2006). Les intrégrines permettent la liaison du cytosquelette à la matrice extracellulaire. Le sarcomères est ancré aux intégrines à la membrane plasmique via les protéines du disque Z et l' α -actinine.

2.2.b) Facteurs hormonaux

Le stress mécanique provoque des signaux paracrines et autocrines qui induisent la synthèse et la production de puissants facteurs de croissance comme le facteur de croissance 1 à l'insuline (IGF1) ou l'AngII. En effet, la production d'IGF1 est augmentée chez des sportifs comparés aux sujets contrôles, mais ce n'est pas le cas pour la production de l'AngII ou de l'ET-1 (Neri Serneri et al., 2001). En revanche, la surcharge de pression est associée à une élévation du niveau d'AngII, de catécholamines et d'ET-1 (Schunkert et al., 1990 ; Rapacciuolo et al., 2001). La synthèse d'AngII dans le cœur est augmentée chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque (Serneri et al., 2001). Comme nous l'avons aussi vu précédemment, les hormones (comme par exemple les catécholamines) agissent sur la fonction cardiaque en se fixant sur les récepteurs tels que les récepteurs ARs, les récepteurs de l'angiotensine ou les récepteurs de l'endothéline, qui une fois stimulés, induisent une réponse cellulaire allant jusqu'à la régulation de l'expression génique. Lorsque cette stimulation est chronique, cela peut entraîner l'hypertrophie cardiaque (Cf. I 3.1).

3)-Remodelage cardiaque ventriculaire

Le remodelage qualifie un changement qui résulte d'un réarrangement de structures existantes. Bien que le remodelage ne soit pas nécessairement représentatif d'un état pathologique, celui du myocarde est habituellement observé lors de conditions pathologiques. Il sert d'adaptation à la fonction cardiaque. Le remodelage concerne les deux éléments du système cardiovasculaire : le myocarde et les vaisseaux. Dans l'hypertrophie cardiaque, c'est majoritairement un remodelage du ventricule gauche. Quand les capacités d'adaptation sont dépassées, la fraction d'éjection du ventricule gauche diminue et l'insuffisance ventriculaire gauche apparaît. Ce remodelage cardiaque est accompagné d'une augmentation de la masse et du volume du ventricule gauche, ainsi qu'un changement de sa forme. Ce processus est asymétrique.

3.1) Modification des protéines contractiles

Dans le myocyte, de nouvelles protéines contractiles sont synthétisées et de nouveaux sarcomères réorganisés. L'HC est caractérisée par une modification des isoformes des protéines contractiles par le programme génique fœtal, ainsi que par une modification de leur régulation qui affectent la vitesse de contraction et de relaxation des myofibrilles (Swynghedauw, 2006). Lors de stimuli hypertrophiques, les gènes codant pour des isoformes de protéines fœtales, comme la chaîne lourde de la β -myosine ou l'actine α -squelettique, sont surexprimés (Schwartz et al., 1986). Au contraire les isoformes adultes correspondantes, l' α -MHC (chaîne lourde de myosine) et l' α -actine cardiaque, sont diminués (Swynghedauw, 1999). Il a été mis en évidence une diminution de l'expression de l'isoforme α -MHC chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque, bien que cette isoforme soit exprimée de façon minoritaire dans le tissu ventriculaire humain à l'âge adulte (Miyata et al., 2000). Les effets de ces modifications sur la fonction cardiaque chez l'homme restent toutefois à déterminer.

La phase décompensée de l'HC est également caractérisée par un changement de l'état de phosphorylation des protéines contractiles, telles que la chaîne légère de la myosine, la TnI ou la protéine cMyBP-C, qui diminue la sensibilité des myofilaments au Ca^{2+} et altère la vitesse de contraction et de la relaxation des myofibrilles (Layland et al., 2005 ; El-Armouche et al.,

2007). Notons également que de nombreuses cardiomyopathies sont associées à des mutations de ces différentes protéines contractiles (Richard et al., 2003)

L'HC altère aussi l'expression, la structure et la fonction de protéines régulant le cycle du Ca^{2+} . Dans la phase décompensée de l'HC, cela se traduit par la déplétion des stocks calciques du RS ainsi qu'un prolongement de la transitoire calcique qui ralentit la contraction et la relaxation cardiaques. Ces anomalies sont principalement liées à un défaut du repompage du Ca^{2+} dans le RS et une fuite de ce Ca^{2+} par le canal RyR2 (Yano et al., 2005 ; Bers, 2008). Des anomalies de l'activité des LTCC participent également aux troubles de l'homéostasie calcique (Bers, 2008). Ainsi, la transition de l'hypertrophie à l'insuffisance cardiaque est souvent associée à une dérégulation du calcium intracellulaire (Molkentin, 2004).

Par ailleurs le peptide facteur atrial natriuretique (ANF pour atrial natriuretic factor) et le peptide natriuretique de type B (BNP), sont aussi rapidement surexprimés dans le ventricule en réponse à la distension anormale des ventricules lors de l'HC (Mercadier et al., 1989). Ces marqueurs de stress et de l'hypertrophie cardiaque, diminuent la surcharge artérielle par vasodilatation et natriuresis. Ainsi, l'expression de l'isoforme β -MHC, de l'actine α squelettique et de l'ANF ou du BNP, sont des marqueurs d'hypertrophie couramment utilisés dans les modèles d'HC.

3.2) Modification de la matrice extracellulaire et de la fibrose

Le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) et le développement de la fibrose liée à l'accumulation du collagène sont des événements majeurs du remodelage ventriculaire (Cohn et al., 2000). Ils résultent des actions paracrines et autocrines des facteurs de croissance et des médiateurs neurohormonaux. En effet, leur régulation se fait majoritairement par le système rénine-angiotensine et l'aldostérone. Les principales protéines de structure de la matrice sont les collagènes de type I et III. Leur production est assurée par les fibroblastes après avoir augmenté en taille et proliféré, et leur dégradation est indispensable au remodelage de la MEC. La réorganisation de la MEC et le développement de la fibrose contribue alors à la rigidité et à la dysfonction myocardique (Brower et al., 2006). Ces modifications sont perçues par les cardiomyocytes par l'intermédiaire des récepteurs liant les éléments de la MEC, telles que les intégrines, qui altèrent la transcription génique et activent les gènes pro-hypertrophiques. Enfin, l'activation de l'enzyme collagenase, contribue à la diminution de myocytes.

3.3) Modification liée à l'apoptose

La mort cellulaire programmée, ou apoptose, est un élément important du processus général de remodelage dans la phase de transition de l'hypertrophie à l'insuffisance cardiaque, voie finale de l'HC (Haunstetter et Izumo, 2000 ; Kang et al., 2000). L'apoptose désigne une séquence d'altérations morphologiques comprenant la condensation du cytosol et du noyau, la fragmentation de l'ADN (acide désoxyribonucléique), le bourgeonnement de la membrane plasmique et une perte de l'asymétrie membranaire. Les corps apoptotiques ainsi formés sont éliminés par les macrophages. L'apoptose résulte d'un déséquilibre entre les signaux de mort et les signaux de survie. Les signaux de mort sont stimulés par deux voies distinctes : la voie intrinsèque (ou mitochondriale) et la voie extrinsèque induite par les récepteurs membranaires (récepteurs du TNF α (facteur de nécrose tumorale), Fas), qui aboutissent à l'activation des protéases à cystéines, ou caspases, et au clivage de divers substrats associés à la survie. L'apoptose, due à une augmentation des cytokines circulantes (TNF α) et de l'AngII, marque la transition de la période compensée de l'HC à la défaillance cardiaque. Elle s'observe également au cours de l'ischémie.

3.4) Modification des récepteurs β -adrénergiques

L'HC est caractérisée par une activation chronique et excessive du système sympathique qui se traduit par une augmentation du taux de catécholamines circulantes et une modification de l'expression des récepteurs β -ARs.

Lors de l'insuffisance cardiaque, les récepteurs β_1 -ARs sont désensibilisés, diminuant ainsi l'efficacité du signal généré à la membrane (Bristow et al., 1982 ; Port et Bristow, 2001). Ce mécanisme implique, les protéines kinases GRK (kinase des récepteurs couplés aux protéines G) spécifiques de ces récepteurs qui phosphorylent les récepteurs β -ARs. Cette phosphorylation entraîne une augmentation de l'affinité des β -ARs pour les β -arrestines, protéines cytosoliques qui régulent la désensibilisation des β -ARs. La diminution de l'expression des β_1 -ARs (d'environ 50%) est corrélée à la sévérité de la maladie et entraîne une diminution de la contraction. Le niveau d'expression des β_2 -ARs, quant à lui, reste inchangé. Enfin, au niveau de l'apoptose, les récepteurs β_1 -ARs ont des effets pro-apoptotiques et les récepteurs β_2 -ARs ont des effets anti-apoptotiques (Lohse et al., 2003).

L'expression et la résistance à la désensibilisation des récepteurs β_3 -ARs augmentent (Cheng et al., 2001 ; Moniotte et al., 2001). En effet, ces récepteurs ne possèdent pas les sites de déphosphorylation impliqués dans la désensibilisation du récepteur β . Les récepteurs β_3 -ARs contribuent donc à la diminution de la contraction cardiaque lors de l'HC.

4)- Insuffisance cardiaque

4.1) Définition

L'hypertrophie maladaptative peut progresser en insuffisance cardiaque (IC) qui est définie comme l'incapacité du cœur à maintenir au repos et à l'effort un débit suffisant pour répondre aux besoins métaboliques de l'organisme (Swynghedauw, 2006). L'IC est un risque majeur de morbidité et mortalité dans les pays industrialisés et constitue un problème majeur de santé publique. En effet, elle affecte près de 4% de la population avec une prévalence de 10-20 % chez les personnes âgées de 70 à 80 ans, et atteint plus particulièrement les hommes. Par ailleurs, la mortalité liée à l'IC, bien que diminuée grâce à divers traitements, reste élevée avec 50% des patients qui décèdent dans les 4 ans suivant le diagnostic de l'IC (Dickstein et al., 2008).

4.2) Caractéristiques de l'insuffisance cardiaque

L'IC est l'aboutissement de la plupart des maladies cardiaques mais elle est principalement causée par l'ischémie myocardique. Elle est la conséquence directe d'un remodelage cardiaque et elle est caractérisée par une altération de l'hémodynamisme, de la consommation d'oxygène et de la capacité à l'exercice (Figure 12).

La sévérité de la maladie est évaluée selon des symptômes fonctionnels sur l'échelle de l'association de NYHA (« New York Heart Association »). La transition d'une HC vers une IC peut survenir à cause de trois raisons :

- l'incapacité de s'adapter plus à la surcharge de travail
- l'aggravation de la fonction diastolique par la fibrose et l'apparition d'une arythmie
- la perte de masse musculaire due à la mort cellulaire.

Les principaux signes cliniques de l'IC sont une fatigue/et ou l'apparition d'une dyspnée (difficulté respiratoire) au repos et dans l'effort, diminution de la fonction cardiaque. La présence d'autres signes cliniques (congestion pulmonaire, atteinte hépatique ou rénale, syndrome de bas débit cardiaque...) est souvent liée aux conséquences de l'IC et représente un élément de gravité (Dickstein et al., 2008).

Beaucoup de voies de signalisation régulant l'hypertrophie sont impliquées dans le développement de l'insuffisance cardiaque, mais elle peut aussi se développer de manière indépendante à partir de l'apoptose des cardiomyocytes ou d'une dérégulation calcique.

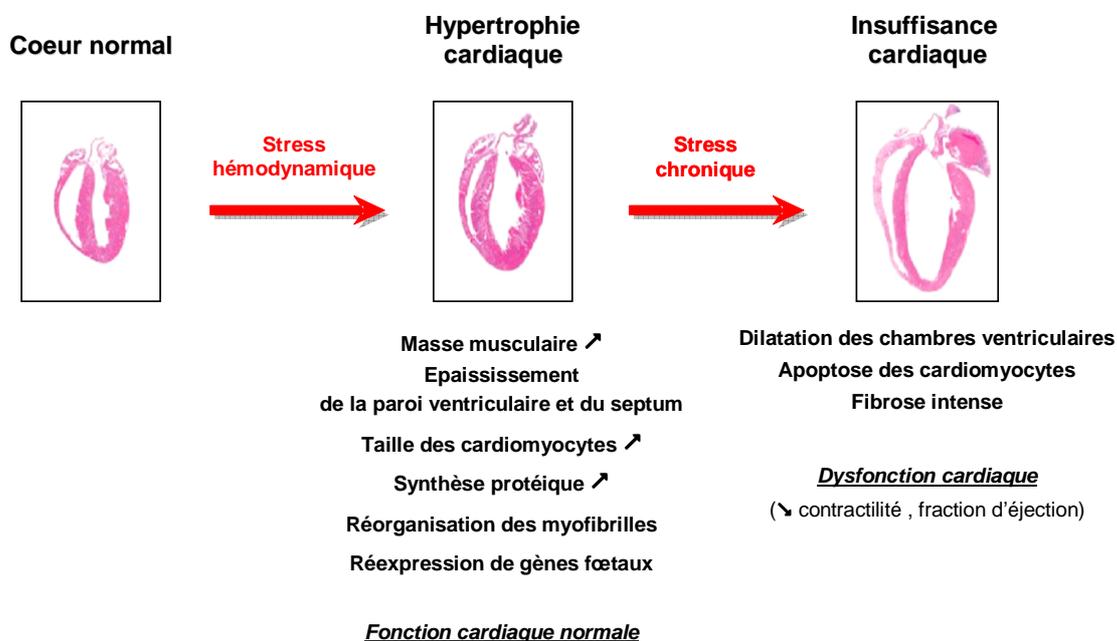


Figure 12 Remodelage ventriculaire survenant au cours de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaques (D'après Hill, 2003). En réponse à une surcharge hémodynamique, le myocarde s'adapte en augmentant sa masse musculaire afin de diminuer la pression s'exerçant sur les parois des ventricules et afin d'assurer un débit sanguin suffisant pour subvenir aux besoins de l'organisme. Ce processus appelé hypertrophie cardiaque, est caractérisé au niveau cellulaire par une augmentation de la taille des cardiomyocytes et de la synthèse protéique, une accumulation et une réorganisation des myofibrilles ainsi que la réexpression de gènes fœtaux. Cette hypertrophie est dite pathologique dans la mesure où, à long terme, ce remodelage ventriculaire devient délétère et altère la fonction cardiaque qui décline progressivement vers l'insuffisance cardiaque, un risque majeur de mortalité. Cette phase décompensée de l'HC est caractérisée par une dilatation des chambres ventriculaires ainsi qu'une fibrose et une mort cellulaire importantes qui contribuent à la dysfonction myocardique.

5) Traitement de l'IC

L'objectif du traitement médical de l'insuffisance cardiaque est de freiner la progression de la maladie, d'améliorer l'espérance et la qualité de vie des malades, de diminuer les symptômes et de réduire les hospitalisations à répétition. Actuellement, la base actuelle du traitement associe trois classes thérapeutiques : les IEC (inhibiteurs de l'enzyme de conversion), les diurétiques et les bêta-bloquants, pour diminuer les actions neurohormonales.

1) Les IEC

L'enzyme de conversion transforme l'angiotensine I en angiotensine II (peptide actif) et la bradykinine en peptide inactif. Les IEC sont des inhibiteurs compétitifs de l'enzyme de conversion (Figure 5). Ils agissent au niveau des reins en bloquant la synthèse de l'angiotensine II qui est un puissant vasoconstricteur et qui stimule la libération d'aldostérone (rétention hydro-sodée) par la cortico-surrénale. Ils inhibent la dégradation de la bradykinine, qui a des effets vasodilatateurs, l'augmentation de la libération de noradrénaline (effet pré-synaptique) induite par l'angiotensine II, la stimulation de la croissance cellulaire et la production de collagène par les fibroblastes. Le traitement avec des IEC induit une baisse de la pression artérielle ainsi qu'une augmentation de la fonction ventriculaire, de la capacité à l'effort, de l'activation neuro-hormonale et une augmentation de l'espérance de vie des patients. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion ont des effets antihypertenseurs, anti-ischémiques et vasodilatateurs dans le traitement de l'insuffisance cardiaque.

2) Les médicaments diurétiques

Les médicaments diurétiques augmentent l'élimination urinaire de sodium, pour diminuer la volémie et la surcharge sodique de l'organisme, permettant de diminuer la pression artérielle. Ils sont incontournables dans le traitement de l'IC congestive ou de l'œdème aigu du poumon car il existe chez l'insuffisant cardiaque une altération de la capacité du rein à éliminer le sodium.

3) Les bêta-bloquants

Les bêta-bloquants inhibent le système sympathique et les effets du système adrénargique. Certains bêta-bloquants inhibent à la fois récepteurs β_1 -ARs et les récepteur β_2 -ARs, d'autres inhibent seulement les récepteurs β_1 -ARs. Leurs effets ont été montrés pour baisser la production de rénine (Campbell et al., 2001). Les bêta-bloquants ont des effets antihypertenseurs, anti-ischémiques, protecteurs myocardiques, antiarythmismants et bradycardismants (diminution de la fréquence cardiaque). La première utilisation en cas d'insuffisance cardiaque date de 1975 (Waagstein et al., 1975). Tous les bêta-bloquants n'ont cependant pas été étudiés dans cette indication : seuls le **métoprolol**, le **bisoprolol**, le **nébivolol** et le **carvédilol** ont prouvé une efficacité en cas d'insuffisance cardiaque (1999a ; 1999b ; Packer et al., 1996 ; Flather et al., 2005). Les essais réalisés avec les différents bêta-bloquants sur patients, démontrent tous une réduction de la mortalité de l'ordre de 30-35%.

4) Les inotropes positifs

Les agonistes beta-ARs induisent un effet inotrope positif important (augmentation de la force des contractions cardiaques du muscle cardiaque isolé pouvant atteindre 100 %), mais sont soumis à la tachyphylaxie de par le phénomène de désensibilisation des récepteurs. Les inotropes positifs ont un effet sur les symptômes et la qualité de vie mais à long terme, leur efficacité s'atténue, le risque arythmogène augmente et l'espérance de vie diminue (Felker et O'Connor, 2001).

Le levosimendan représente le chef de file d'une nouvelle classe d'agents inotropes positifs qui agissent en se liant à la troponine C, augmentant ainsi la sensibilité des protéines contractiles au calcium et la force de contraction.

La digoxine, qui a été utilisée dès le XVIII^{ème} siècle, est un dérivé de la fleur digitale. Les digitaliques induisent un effet inotrope positif en inhibant la pompe Na^+/K^+ ATPase, provoquant une accumulation de sodium intracellulaire, ce qui stimule l'échangeur Na^+-Ca^+ et augmente la concentration calcique intracellulaire. Le taux élevé de Ca^{2+} fait augmenter la contractilité du myocarde. Elle diminue la fréquence cardiaque, de ce fait elle est utilisée chez des patients au cours de la fibrillation auriculaire.

5) Les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA2)

Les antagonistes des récepteurs AT1 ont des effets semblables à ceux des IEC, mais ils n'inhibent pas les récepteurs AT2 qui ont peut être un rôle bénéfique et ils n'inhibent pas la dégradation de la bradykinine. Les **sartans** (ARA2) sont des antagonistes des récepteurs AT1 de l'angiotensine II. Ils entraînent souvent une diminution de la pression artérielle.

6) Les antagonistes de l'aldostérone

Un des facteurs qui contribue à la rétention d'eau et de NaCl est l'aldostérone. Elle est fabriquée par les glandes cortico-surrénales principalement en réponse à une stimulation par l'angiotensine II (Figure 5) ou à une élévation de la kaliémie (concentration de potassium dans le plasma sanguin). L'aldostérone augmente lors de l'IC.

L'**éplérénone** (INSPRA®), un antagoniste sélectif du récepteur de l'aldostérone, est indiqué en complément du traitement standard incluant les bêta-bloquants pour réduire le risque de morbi-mortalité cardiovasculaire chez les patients stables présentant une dysfonction ventriculaire gauche (Pitt et al., 2003).

Un futur traitement envisagé pour l'insuffisance cardiaque est la thérapie génique cardiaque. En effet, des essais concluant de thérapie génique avec les gènes SERCA2 ont été fait chez le rat, et même chez l'homme (Niwano et al., 2008 ; Jaski et al., 2009). Chez le rat, quinze jours après un infarctus du myocarde, un vecteur lentivirus contenant le gène SERCA2 a été délivré dans le cœur par injection intracoronaire et cette injection de SERCA2 a protégé la dilatation ventriculaire gauche (Niwano et al., 2008) .

En cas d'IC réfractaire au traitement médical avec dysfonction ventriculaire gauche systolique sévère, le traitement à long terme est la **transplantation cardiaque**, c'est pourquoi il est important de continuer de chercher de nouveaux médicaments.

III - Voies de signalisation de l'hypertrophie cardiaque

Le remodelage cardiaque à l'origine de l'IC débute par une suractivation des récepteurs membranaires impliqués dans la régulation de la fonction et de la croissance cardiaques. Ces récepteurs activent des voies de signalisation qui aboutissent à l'altération de gènes conduisant à une prolifération cellulaire ou une diminution de la contraction cardiaque, et induisent la réponse hypertrophique. Après avoir décrit l'implication des récepteurs α -ARs et β -ARs dans le remodelage cardiaque, je présenterai ici les effecteurs impliqués dans l'HC telles que les petites protéines G, les MAPKs (Mitogen-activated protein kinases), la calcineurine et la CaMKII (kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante de type II).

1- Altérations des récepteurs couplés aux protéines G dans l'hypertrophie cardiaque

1.a) Les récepteurs α -adrénergiques dans l'hypertrophie cardiaque

L'activation chronique des récepteurs α -ARs via la libération de catécholamines par le système nerveux sympathique conduit à la mise en place de la réponse hypertrophique. Lors de l'IC, la densité de récepteur α_1 -ARs reste inchangé (Bristow et al., 1988). La stimulation des récepteurs α -ARs accroît la taille des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveaux nés (Simpson et al., 1982 ; LaMorte et al., 1994). De plus, l'activation des récepteurs α_1 -ARs augmente les niveaux des ARNm qui codent pour les gènes exprimés lors des premiers stades de développement ou de l'HC induite par surcharge de pression : c-myc, α -actine ou le β -MHC et l'expression des protéines myofibrilles (Starksen et al., 1986 ; Waspe et al., 1990 ; Shannon et al., 2006).

Les récepteurs α_1 -ARs augmentent et préservent la contraction cardiaque lors de l'HC et protège de l'apoptose (Perez et Doze, 2011). Il existe deux sous-types de récepteurs α_1 -ARs, qui ont des effets distincts (Knowlton et al., 1993 ; Autelitano et al., 1998). L'ARNm des récepteurs α_{1A} -ARs est plus abondant que celui des récepteurs α_{1B} -ARs dans le cœur humain sain ou insuffisant (Jensen et al., 2009). Les récepteurs α_{1A} -ARs réguleraient l'hypertrophie adaptative et compensatoire (via la voie ERK(extracellular signal-regulated kinase)/Ras) alors

que les récepteurs α_{1B} -ARs induiraient l'hypertrophie de type maladaptative (via la voie Gq) (Lemire et al., 2001 ; O'Connell et al., 2006 ; Xiao et al., 2001).

Tableau 2 Phénotypes de souris génétiquement modifiées pour les récepteurs α -ARs

Souris KO			Souris Transgéniques (surexpression)		
KO α_{1B}	Prévient du remodelage cardiaque induit par stimulation adrénergique indépendamment de la surcharge de pression	(Vecchione et al., 2002)	α_{1b}	HC et activation des voies pro-hypertrophiques (CaN, ERK)	(Lemire et al., 2001; Benoit et al., 2004)
			α_{1a}	Pas d'HC mais apparition d'une dysfonction ventriculaire	(Akhter et al., 1997; Grupp et al., 1998)
KO α_{1a}	Diminution de la contraction cardiaque	(Tanoue et al., 2002)	α_{1a}	Pas d'HC mais expression d'ANF augmentée	(Lin et al., 2001)
Double KO α_2	Augmentation de la masse cardiaque	(Hein et al., 1999)	α_{1b} activé par la PE	Sévère HC, cardiomégalie, fibrose, réexpression de gènes fœtaux, et taux de mortalité important	(Iaccarino et al., 2001)
Double KO α_{1a} et α_{1B}	Croissance et débit cardiaque réduits (pour les ♂)*	(O'Connell et al., 2003)	forme constitutivement active de α_{1a} ou α_{1b}	HC adaptative pour α_{1a} et pathologique pour α_{1B}	(Milano et al., 1994b ; Wang et al., 2000 ; Perez et Doze, 2011)
Double KO α_{1a} et α_{1B} avec TAC (2 semaines)	Taux de mortalité aggravé (pour les ♂)* fibrose et apoptose augmentés Gènes fœtaux non réexprimés	(O'Connell et al., 2003 ; O'Connell et al., 2006)	forme constitutivement active de α_{1a}	HC adaptative car les souris sont protégées de l'ischémie	(Rorabaugh et al., 2005)
			La forme constitutivement active de α_{1b}	HC évoluant rapidement en IC suite à une surcharge de pression	(Zuscik et al., 2001)
Conclusion	α_1 sont importants dans la croissance et le maintien de la fonction cardiaque après la naissance - α_{1a} est nécessaire pour une réponse adaptative au stress cardiaque - α_{1b} induit l'hypertrophie maladaptative				

*Ces changements n'ont été observés que chez les mâles. Les femelles ont une activation du tonus sympathique plus faible et leur croissance cardiaque est moins dépendante de l'activation des récepteurs α_{1a} .

ANF : Atrial natriuretic factor ; CaN : calcineurine ; HC : hypertrophie cardiaque ; IC : insuffisance cardiaque ; KO : Knock out ; PE : phénylphrine

1.b) Les récepteurs β -adrénergiques dans l'hypertrophie cardiaque

L'HC et l'IC sont caractérisées par une suractivation du système β -AR. Initialement, cette suractivation des β -ARs présente des effets bénéfiques sur la fonction cardiaque car elle augmente la fréquence et la contractilité du myocarde à travers l'activation de la voie AMPc/PKA qui stimule le CEC. Cependant, de nombreuses études ont en effet montré qu'une activation soutenue des β -ARs produit des effets délétères qui conduisent à une hypertrophie cardiaque, une dysfonction ventriculaire gauche et une IC (Towbin et Bowles, 2002 ; Lohse et al., 2003). La cardiotoxicité est surtout régulée par les récepteurs β_1 -ARs alors que les récepteurs β_2 -ARs ont plutôt un rôle cardioprotecteur (Zheng et al., 2005 ; Bernstein et al., 2011).

Ces effets ont notamment été mis en évidence par différents modèles de souris transgéniques. Les souris KO β_1 -ARs sont létales à l'état embryonnaire et leur performances cardiaques sont altérées (Rohrer et al., 1996). Les cardiomyocytes des souris surexprimant les récepteurs β_1 -ARs ont un remodelage cardiaque identique à celui d'une hypertrophie, avec de la fibrose. Les souris surexprimant les récepteurs β_1 -ARs sous le promoteur α -MHC développent à un jeune âge une cardiomyopathie dilatée et une IC (Engelhardt et al., 1999). Chez ces souris transgéniques, une apoptose accrue associée à une augmentation des protéines pro-apoptotiques est également observée (Bisognano et al., 2000). De nombreux travaux montrent également les effets néfastes d'une stimulation chronique des β_1 -ARs sur le taux d'apoptose (Communal et al., 1999 ; Zhu et al., 2003 ; Wang et al., 2004 ; Patterson et al., 2004). Par ailleurs, une activation soutenue des β -ARs dans des cœurs intacts mime l'IC en réactivant le programme génique fœtal (Lowes et al., 2002 ; Boluyt et al., 1995).

A l'inverse, les souris déficientes pour le récepteur β_2 -AR montrent un développement et des fonctions cardiovasculaires normales, ainsi qu'une capacité à l'exercice accrue par rapport aux souris WT (Chruscinski et al., 1999). La surexpression des β_2 -ARs dans le myocarde de souris accroît la contraction et la fonction cardiaque sans augmenter la mortalité des animaux suggérant un rôle protecteur des β_2 -ARs dans l'IC (Liggett et al., 2000 ; Patterson et al., 2004 ; Milano et al., 1994a). Il a également été montré que la stimulation chronique des β_2 -ARs active la voie anti-apoptotique PI3K/Akt par l'intermédiaire de la protéine G_i , favorisant ainsi la survie cellulaire (Zhu et al., 2001). Cependant, les souris ayant une forte surexpression du

récepteur β_2 -AR développent rapidement une hypertrophie et une insuffisance cardiaque (Liggett et al., 2000). Elles présentent une détérioration de la fonction cardiaque après une surcharge de pression (Freeman et al., 2001 ; Du et al., 2000). Une faible surexpression des récepteurs β_2 ARs protège de l'IC alors qu'une forte surexpression a un effet délétère et similaire à une surexpression des récepteurs β_1 ARs.

Enfin, les récepteurs β_3 sont activés lors de la mise en place de l'HC et la stimulation des β_3 -ARs diminue la contraction cardiaque (Gauthier et al., 1998 ; Tilley et Rockman, 2006 ; Cheng et al., 2001 ; Moniotte et al., 2001). Les récepteurs β_3 -ARs ont des effets inotropes négatifs. La persistance des effets inotropes négatifs des β_3 -ARs au cours de l'IC est probablement liée au fait que ces récepteurs n'ont pas de sites de phosphorylation par les GRKs ou la PKA et sont donc résistants au phénomène de désensibilisation (Liggett et al., 1993). En revanche, la surexpression spécifique de récepteurs β_3 -ARs dans le cœur de souris augmente la contraction cardiaque via Gs, et diminue l'expression du récepteur β_1 -AR. Ces souris ne développent pas d'hypertrophie ou de fibrose, suggérant un effet cardioprotecteur de la stimulation β_3 -AR dans l'insuffisance cardiaque chronique (Kohout et al., 2001 ; Tavernier et al., 2003).

2 - Epac dans l'hypertrophie cardiaque

Dans différents modèles d'hypertrophie cardiaque (injection d'isoprénaline, constriction de l'aorte thoracique), l'expression de la protéine Epac 1 augmente dans les cardiomyocytes (Ulucan et al., 2007 ; Metrich et al., 2010). Le rôle de Epac a été étudié avec le 8CPT (8-pCPT-2'-O-Me-cAMP), analogue de l'AMPC qui active spécifiquement Epac (Enserink et al., 2002). Les premières évidences suggérant un rôle fonctionnel des GEFs Epac dans les cardiomyocytes proviennent d'une étude *in vitro* de notre équipe, montrant que l'activation de Epac1 induit les marqueurs de l'HC tels que la myofibrillogénèse, l'augmentation de la taille cellulaire et de la synthèse protéique, ainsi qu'une réexpression de gènes fœtaux dans les cardiomyocytes de rats néonataux en culture (Morel et al., 2005). En réponse à une stimulation des récepteurs β -ARs, Epac 1 induit une hypertrophie des cardiomyocytes de manière AMPC dépendante et PKA indépendante (Figure 13) (Metrich et al., 2008). De manière intéressante, l'effecteur classique de Epac 1, Rap1, n'est pas impliqué dans la croissance cellulaire induite par Epac 1 (Metrich et al., 2008). L'augmentation de l'ANF via

Epac est activé par Rap2B (Métrich et al., 2010). Rap2B peut activer la PLC qui produit de l'IP3 et du DAG. L'IP3 libère le Ca^{2+} de l'enveloppe nucléaire et du RE, et régule ainsi l'activité de la CaMKII et du programme hypertrophique (Schmidt et al., 2001 ; Oestreich et al., 2007 ; Wu et al., 2006 ; Métrich et al., 2010 ; Breckler et al., 2011).

Durant le remodelage cardiaque induit par l'HC il y a aussi apparition de fibrose tissulaire (Beltrami et al., 1994). Dans des conditions pathologiques comme celles de l'IC, un dépôt excessif de collagène se produit dans le myocarde. La cytokine profibrosante TGF β 1 inhibe l'expression de Epac 1 dans les fibroblastes. La surexpression de Epac1 inhibe TGF β 1 dans les fibroblastes cardiaques (Yokoyama et al., 2008). Une diminution de l'expression d'Epac est donc requise pour la réponse profibrotique et après infarction du myocarde. Epac inhibe l'expression de collagène de type I et III et donc pourrait reverser la fibrose des tissus.

Au cours de l'hypertrophie il y a une dérégulation de la transitoire calcique (Fabiato 1983 ; Berridge et al., 2003). La stimulation de Epac par le 8CPT pour des cardiomyocytes augmente la fréquence de sparks calcique, c'est-à-dire la fréquence d'ouverture des canaux du récepteur de la ryanodine RyR2 (Pereira et al., 2007). Epac induit donc des effets inotropes positifs. Une augmentation anormale de libération calcique via Epac induit des arythmies (Hothi et al., 2008).

Epac est un activateur des petites protéines G et induit les voies pro-hypertrophiques. Ainsi, après activation de Ras, via la voie Epac-Rap2B-PLC ϵ , l'activité de la calcineurine et de la CaMKII augmente (Métrich et al., 2008).

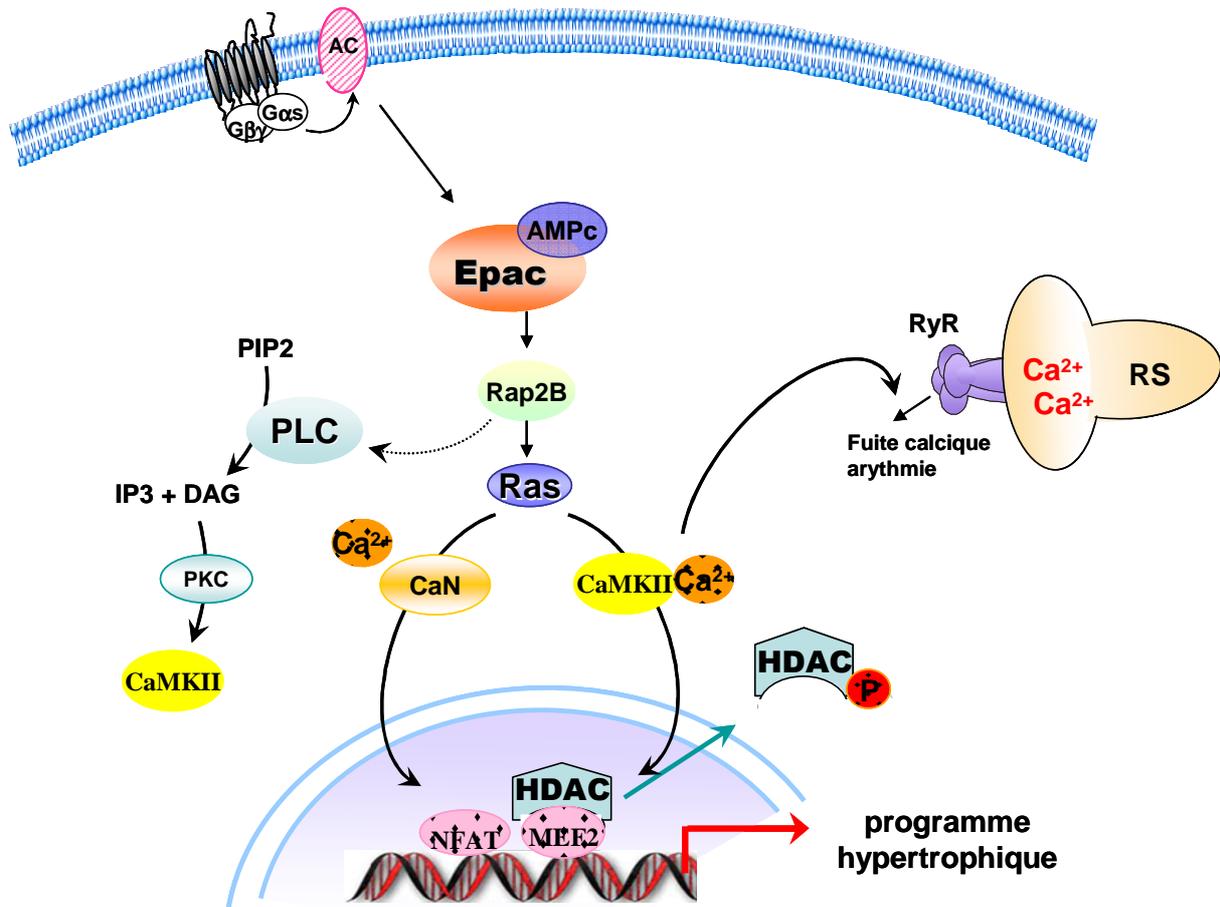


Figure 13 Voies de signalisation associées à l'hypertrophie cardiaque induite par Epac (D'après Métrich et al., 2010).

Suite à une stimulation des récepteurs β -ARs et une fois lié à l'AMPc, Epac induit l'activation de la PLC, qui hydrolyse le PIP2 en DAG et IP3, entraînant l'activation de la PKC et la CaMKII, ces deux kinases sont impliquées dans la contraction et la phosphorylation des myofilaments. Epac active les protéines dépendantes du calcium, la calcineurine et la CaMKII, qui activent le programme hypertrophique par les facteurs de transcriptions comme NFAT ou MEF2. La CaMKII induit aussi la phosphorylation de RyR2, donc une fuite calcique, ce qui potentiellement induit des arythmies.

AC : adénylate cyclase ; AMPc : adénosine 3',5'monophosphate cyclique ; Ca^{2+} : calcium ; CaMKII : kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante de type II ; CaN : calcineurine ; DAG : Diacylglycérol ; EPAC : Exchange Protein directly Activated by cAMP ; HDAC : histone déacétylase ; IP3 : inositol 1,4,5-triphosphate ; MEF2 : myocyte enhancer factor 2 ; NFAT : nuclear of activated T cells ; PIP2 : phosphatidylinositol 4,5 biphosphate ; PKC : protéine kinase C ; PLC: phospholipase C ; RS : réticulum sarcoplasmique ; RyR : récepteur de la ryanodine

3 - Les petites protéines G

3-1 Introduction

Les petites protéines G sont monomériques de masse moléculaire d'environ 20-40 kDa. Elles sont nombreuses, plus de 150 membres chez l'homme, et régulent une grande variété de processus cellulaires comme la division, la migration et la différenciation. Elles sont divisées en 5 principales sous-familles sur la base de leurs séquences en acides aminés et de leur similitude fonctionnelles : Ras, Rho, Rab, ARF (ADP-ribosylation factors) et Ran.

La majorité de ces protéines ont des modifications lipidiques qui permettent leur adressage à la membrane cellulaire. Les petites protéines G agissent comme des interrupteurs moléculaires, changeant entre l'état actif lié au GTP et l'état inactif lié au GDP. Dans l'état actif, elles interagissent avec un ensemble de protéines effectrices dont la plupart sont des kinases (Figure 14).

3-2 Régulation des petites protéines G

Les petites protéines G présentent une capacité intrinsèque d'hydrolyse du GTP et d'activité d'échange GDP-GTP relativement faible, donc des protéines régulatrices sont nécessaires pour les activer. Ainsi les **GEF** (Guanine exchange factor) favorisent l'échange du GDP en GTP. L'activité des GEF peut être régulée par un signal en amont comme un RCPG et les protéines G hétérotrimériques. Au contraire les **GAP** (GTPase activating protein) augmentent l'activité intrinsèque d'hydrolyse du GTP, entraînant l'inactivation des GTPase. Ainsi les GEF et les GAP sont d'importants régulateurs de l'activité des GTPases. Pour les protéines des familles Rab et Rho, il existe un niveau de contrôle supplémentaire impliquant les **GDI** (guanine nucleotide-dissociation inhibitors) qui inhibent le recrutement à la membrane de petites protéines G en masquant leur résidus lipidiques (Lezoualc'h et al., 2008).

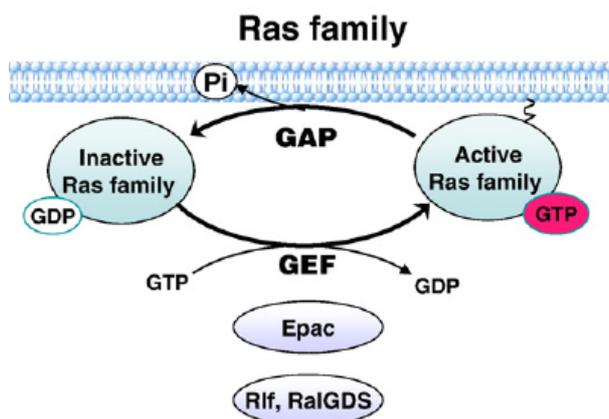


Figure 14 Le cycle d'activation de la petite protéine G Ras (D'après Lezoualc'h et al., 2008). Les petites protéines G de la famille de Ras agissent comme des interrupteurs moléculaires oscillant entre l'état actif lorsqu'elles sont liées au GTP et l'état inactif liées au GDP. Les GEFs favorisent l'état actif des petites protéines G alors que les GAPs favorisent l'état inactif. Epac et Ral-GDS (Ral guanine nucleotide dissociation stimulator) sont des facteurs d'échange de Ras impliqués dans l'HC.

EPAC : Exchange Protein directly Activated by cAMP ; GAP : GTPase Activating Protein ; GDP : guanosine diphosphate ; GEF : Guanine Exchange Factor ; GTP : guanosine triphosphate ; Ral-GDS : Ral guanine nucleotide dissociation stimulator

3-3 Les petites protéines G de la famille Ras

3-3.1 La sous-famille de Ras et son activation

Chez l'homme, la sous famille Ras contient 36 membres. Les trois membres « classiques » de la sous-famille Ras ont été identifiées comme des cibles connues dans les mutations gains de fonction des cancers : Harvey (HRas ou HA-Ras), Kirsten (Kras ou Ki-Ras) et NRas (pour Not Hras ou Kras) (Ferro et Trabalzini, 2010 ; Schubbert et al., 2007). Il existe d'autres membres de la sous famille de Ras dont R-Ras, Ral, Rap, Rheb, Rin et Rit.

La voie Ras est initiée par les RCPG et les RPTK (récepteurs aux protéines tyrosine kinase). Dans les cellules en division, le signal des RPTK prédomine. Le signal de la voie Ras dans le cœur peut aussi être directement activé par les sous-unités $G\beta\gamma$. L'activation induite par les récepteurs α_1 -ARs augmente la charge en GTP de Ras (Wang et al., 2002 ; LaMorte et al., 1994).

3-3.2 Les Effecteurs de Ras

Les protéines Ras activées interagissent avec de nombreux effecteurs pour réguler l'expression des gènes, la prolifération, la mobilité, la différenciation et la survie cellulaire (Lezoualc'h et al., 2008). Une même région d'environ 100 acides aminés a été identifiée dans tous les effecteurs comme responsable de l'interaction avec Ras. En général, Ras active son effecteur par un changement structural qui augmente son affinité pour ses cibles (Herrmann, 2003).

Les effecteurs les plus importants de Ras sont : **Raf** (une sérine-thréonine kinase), le phosphatidylinositol 3-kinase (**PI3K**), et **RAL-GDS** (Ral guanine nucleotide dissociation stimulator) (Proud, 2004).

-Raf 1 cytosolique, en se liant à Ras est recruté à la membrane, et phosphoryle ensuite les protéines MAPKs et ERK (Proud, 2004).

-L'activation de PI3K par sa liaison au Ras-GTP induit la phosphorylation du phosphatidylinositol triphosphate et de Akt (Rodriguez-Viciano et al., 1994).

-RAL-GDS est un GEF pour la petite protéine G Ral et son activation régule l'induction de gènes associés à la réponse hypertrophique de Ras (Kawai et al., 2003).

Certains effecteurs de Ras ont une fonction catalytique comme Raf et la PI3K, tandis que d'autres comme AF6 ou Nore1 semblent agir comme des adaptateurs protéiques (Khokhlatchev et al., 2002 ; Pannekoek et al., 2009).

3-4 Implication de la petite protéine G Ras dans l'hypertrophie cardiaque

La petite protéine G Ras est un médiateur important de l'hypertrophie cardiaque. Ras est activé par de nombreux stimuli hypertrophiques comme le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), l'ET-1, ou la phényléphrine (PE) (Chiloeches et al., 1999). *In vitro*, la surexpression d'une forme constitutivement active de Ras (RasG12V) dans des cardiomyocytes de rats nouveaux nés conduit à la réexpression des gènes fœtaux associée à une croissance cellulaire et une augmentation de la myofibrillogenèse (Fuller et al., 1998 ; Thorburn et al., 1993). Étonnamment RasG12V n'induit pas la synthèse protéique des cardiomyocytes (Thorburn et al., 1993). À l'inverse, la surexpression du mutant Ras N17, dominant négatif de Ras, se lie plus fortement aux RAS-GEF comparé à la forme sauvage de Ras (Feig, 1999).

La fonction de la voie Ras dans l'HC *in vivo* a été étudiée dans un modèle de souris transgéniques où Ras G12V est exprimé dans le ventricule. Ce modèle montre les caractéristiques de l'hypertrophie cardiaque en l'absence de l'hypertension systémique et de changement du rythme cardiaque (Hunter et al., 1995). De plus, les souris adulte ayant une induction conditionnelle de Ras G12V dans leur cœur développent une hypertrophie ventriculaire et une arythmie avec une surrégulation de $G\alpha$ (Ruan et al., 2007). Dans d'autres modèles de souris transgéniques où l'expression plus forte du transgène était contrôlée par l' α MHC, Ras G12V induit les phénotypes d'une cardiomyopathie hypertrophique sévère semblables aux caractéristiques cliniques observées dans les cardiomyopathies hypertrophiques humaines (HCM) (Zheng et al., 2004). Une telle corrélation entre l'expression de Ras et la sévérité de l'hypertrophie cardiaque a été reportée chez des patients atteints de HCM (Kai et al., 1998). Des souris transgéniques ont permis de montrer que Raf-1 kinase, un effecteur direct de la voie Ras, qui appartient à la cascade de transduction ERK, régule l'apoptose et la croissance des cardiomyocytes en réponse à une augmentation de pression (Harris et al., 2004 ; Yamaguchi et al., 2004). Les découvertes de mutations chez différents membres des voies de signalisation de Ras (HRAS, KRAS, RAF1, BRAF, MEK1 et MEK2) chez des patients développant des maladies associées au CMH, conforte le rôle de la voie de signalisation de Ras dans les cardiomyopathies hypertrophiques (Niihori et al., 2006 ; Rodriguez-Viciano et al., 2006 ; Pandit et al., 2007). Une activation de la voie Ras est associée aux pathologies d'hypertrophie des cardiomyocytes.

De nombreuses études ont montré que les effets de Ras dans l'hypertrophie cardiaque sont liés à l'activation de son effecteur Raf et de la voie MEK/ERK.

4- Voie des Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)

La plupart des protéines effectrices des GTPases sont des kinases qui contrôlent les fonctions cellulaires. Les MAPKs sont des sérines thréonines kinases activées et régulées par une série de phosphorylation au niveau des résidus thréonine et tyrosine. De nombreux stimuli activent les cascades des MAPKs parmi lesquelles les hormones, les facteurs de croissance et les facteurs de stress. Les cascades des MAP kinases sont impliquées dans les voies de signalisation conduisant à la mitose, la prolifération, la différenciation, la croissance cellulaire, l'expression génique ou la mort cellulaire. Elles sont classiquement divisées en trois catégories : les kinases régulées par les signaux extracellulaires 1 et 2 (ERK1/2), les c-Jun N-terminal kinases 1, 2 et 3 (JNK1,2,3), et les p38 MAPK α , β , γ , et δ .

L'activation de ERK1/2 est liée à la phosphorylation par les kinases MEK1/2, elles même activées par la kinase Raf (Chong et al., 2003). De nombreuses études ont montré l'implication de cette voie Raf/MEK/ERK dans les processus hypertrophiques. En effet, Raf, MEK et ERK sont activées par les stimuli hypertrophiques tels que l'ET-1, l'AngII et les agonistes α -ARs. De plus, l'inhibition de la voie Raf/MEK/ERK par des constructions dominantes négatives ou des inhibiteurs pharmacologiques, bloque l'hypertrophie induite *in vitro* par ces agonistes hypertrophiques (Yue et al., 2000 ; Xiao et al., 2001 ; Proud 2004). L'activation ou l'inhibition de MEK et de Raf dans des modèles de souris transgéniques confirment l'implication de cette voie dans l'HC (Bueno et al., 2000 ; Harris et al., 2004 ; Yamaguchi et al., 2004). L'inhibition de cette voie seule n'est pas suffisante pour inhiber complètement la réponse à l'hypertrophie et l'activation de cette voie n'entraîne pas une hypertrophie maximale. Par ailleurs, ERK active des facteurs de transcription régulant la croissance cardiaque et la traduction des protéines tels que GATA-4, Elk-1 et NFAT (Purcell et al., 2004 ; Sanna et al., 2005 ; van Berlo et al., 2011).

Les protéines de stress JNK et p38 sont activées par les stimuli hypertrophiques. Cependant leur rôle dans l'HC est controversé (Petrich et Wang, 2004 ; Clerk et al., 2007). Les études réalisées *in vitro* ou sur des modèles de souris transgéniques, montrent que l'activation de JNK ou de p38 n'est pas suffisante pour induire l'HC mais que ces protéines kinases modulent les voies impliquées dans l'HC. Des inhibiteurs pharmacologiques des MAPKs ont démontré l'implication de p38 dans la croissance hypertrophique des cultures de rats et dans l'organisation des myofibrilles lors d'une stimulation avec la PE. La voie p38 permettrait de maintenir les cellules dans l'hypertrophie (Clerk et al., 1998).

5-Les voies de signalisation des enzymes dépendantes du calcium

L'augmentation du calcium active différentes enzymes calcium-dépendantes, qui peuvent induire la transcription des gènes, processus appelé couplage excitation-transcription. Nous allons tout d'abord présenter la Calmoduline kinase dépendante de type II, puis la calcineurine.

5.1- Voie de la kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante de type II (CaMKII) et de ses effecteurs

5.1.1 Définition, fonction

Les CaMKs sont des sérines thréonine kinases qui sont régulées par le Ca^{2+} lié à la Calmoduline (CaM). Il en existe 4 formes distinctes (CaMKs I, II, IV et K) ayant des distributions et des substrats différents (Tableau 3) (Skelding et al., 2011). La CaMKII ubiquitaire, est l'isoforme majeur exprimé dans le cœur. La CaMKI est présente dans le cœur mais sa fonction reste à définir dans cet organe car son expression n'est pas augmentée dans l'hypertrophie (Zhang et Brown, 2004).

5.1.2 Structure

La CaMKII est une protéine multimère composée de 12 sous-unités. Chaque unité contient trois domaines distinctes : un domaine de liaison à la CaM, un domaine régulateur qui contient le domaine auto-inhibiteur et contrôle l'activation de l'enzyme et un domaine catalytique qui s'associe avec le substrat et améliore la fonction de l'enzyme. La région C-ter est le domaine d'interaction responsable de l'assemblage de sous-unités (Figure 15).

La CaMKII est codée par différents gènes α , β , γ , ou δ . L'isoforme majoritaire dans le cœur est la CaMKII δ . L'isoforme γ est aussi présent dans le cœur mais y est peu exprimée (Singer et al., 1997 ; Zhang et Brown, 2004). On connaît 13 variants d'épissage pour la forme CaMKII δ . δ_B (δ_3) et δ_C (δ_2) sont présents dans le myocarde de mammifère. L'isoforme δ_B de la CaMKII est plus présent dans le noyau alors que la sous-unité δ_C est majoritaire dans le cytoplasme.

	CaMKI	CaMKII	CaMKIV	CaMKK
Number of genes	4 (α , β , γ , δ)	4 (α , β , γ , δ)	1	2 (α , β)
Number of splice variants	>5	>30	2	Unknown
Enzyme structure	Monomeric	Multimer (dodecamer) of dimers	Monomeric	Monomeric
Molecular weight	38–53 kDa	500–600 kDa (holoenzyme); 50–60 kDa (subunit)	600–720 kDa (holoenzyme); 50–60 kDa (subunit)	54–68 kDa
Tissue distribution	Ubiquitous	CaMKII γ and CaMKII δ are ubiquitous, CaMKII α and CaMKII β are neuronal	Neuronal, immune cells, testis	Neuronal, thymus, spleen, testis
Requirement for activation	Ca ²⁺ /CaM binding, phosphorylation	Ca ²⁺ /CaM binding	Ca ²⁺ /CaM binding, phosphorylation	Ca ²⁺ /CaM binding
Regulation	Phosphorylated (activated) by CaMKK, targeting (?)	Autophosphorylation (autonomous and inhibitory), targeting	Phosphorylated (autonomous activation) by CaMKK, targeting (?)	Phosphorylation (inhibitory)
Number of phosphorylation sites	1 (T 174–180, depending on isoform)	Multiple	1 (T 196–200, depending on isoform)	Multiple
Capable of autonomous activity?	No	Yes	Yes	Yes
Inhibition by KN-62 and KN-93 (K _i)	0.8 μ M ^{111,112}	0.8 μ M ^{111,112}	3 μ M ^{111,112}	No effect
Inhibition by AIP (IC ₅₀)	Not determined	40 nM ⁵²	>10 μ M ⁵²	Not determined
Inhibition by AIP-II (IC ₅₀)	Not determined	4 nM ⁶¹	>10 μ M ⁶¹	Not determined
Inhibition by AC3-1 (IC ₅₀)	>10 μ M ⁶²	150 nM ⁶²	Not determined	>10 μ M ⁶²

Tableau 3 Propriétés de la famille des CaMKs (d'après Skelding et al., 2011).

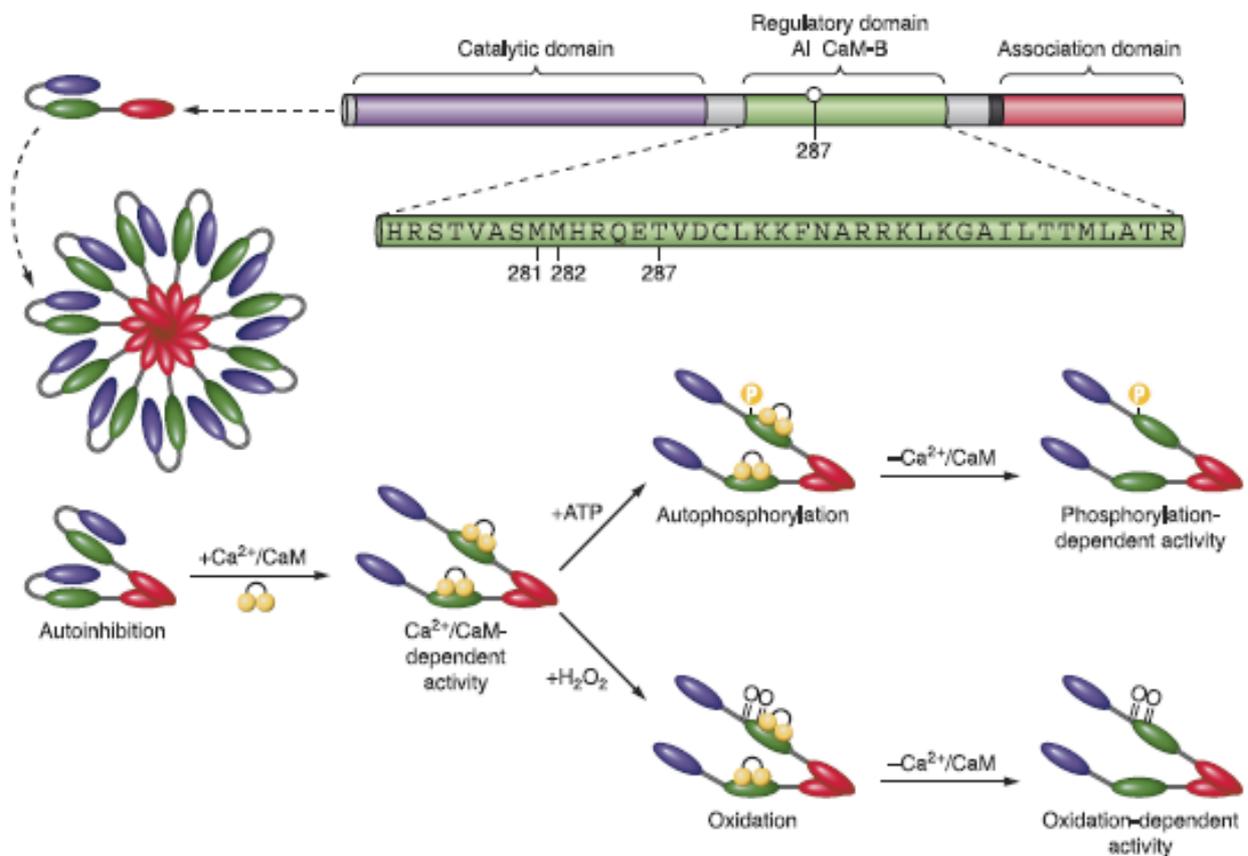


Figure 15 Structure et activation de la CaMKII (D'après Erickson et al., 2011).

La sous-unité monomérique de la CaMKII est composée d'un domaine catalytique au niveau N-terminal, d'un domaine régulateur et d'un domaine d'association au niveau C-terminal. Douze de ces sous-unités s'assemblent ensemble pour former l'holoenzyme CaMKII. C'est le domaine d'association qui est responsable de l'holoenzyme. Dans le domaine régulateur se situe la séquence qui se lie au domaine catalytique, à la calmoduline et la thréonine 287 qui est auto-phosphorylée par un autre monomère voisin de la CaMKII. Les méthionines 281/282 peuvent être oxydées.

Quand le calcium se fixe à la calmoduline, ils se lient ensuite au domaine régulateur. Cela induit un changement de conformation, qui libère le domaine catalytique permettant un transfert d'un groupement phosphate. La thréonine 286 étant libérée dans cette conformation, sa phosphorylation se produit grâce à une sous-unité monomérique voisine préalablement activé par le calcium. L'autophosphorylation de la Thr286 permet de maintenir l'activité catalytique en absence de calcium.

Comme l'autophosphorylation de la thréonine 287, l'oxydation des méthionines 281/282 dépendent de l'activité du calcium et d'un fort niveau d'espèces réactives oxygénées.

5.1.3 Activation de la CaMKII

En condition basale, les domaines régulateurs et catalytiques de la CaMKII sont liés, empêchant son activité. La fixation de Ca^{2+} -CaM sur son domaine régulateur active la CaMKII par un changement de conformation qui libère son site catalytique (Figure 16). Le domaine régulateur devient alors accessible pour l'autophosphorylation ou l'oxydation (Erickson et al., 2011). La phosphorylation de la thréonine 287 augmente l'affinité de la CaM pour la CaMKII et empêche la réassociation des domaines catalytique et régulateur. Ainsi, l'activité de la CaMKII est maintenue. La CaMKII est aussi régulée par certaines phosphatases comme par exemple les isoformes PP1, PP2A, PP2C ou par stress oxydatif (Ishida et al., 2003 ; Zhang et Brown, 2004 ; Couchonnal et al., 2008 ; Howe et al., 2004). Les méthionines 281/282 de la CaMKII oxydée sont réduites et inactivées par la méthionine sulfoxide réductase de classe A (MsrA) (Erickson et al., 2008). Enfin, la CaMKII est régulée par Epac de manière indépendante de la PKA (Metrich et al., 2008).

5.1.4 Les effecteurs de la CaMKII

Une fois activée, la CaMKII phosphoryle les histones déacétylases HDAC4 ou HDAC5 alors liés à MEF2 (Bers, 2011). Les HDACs sont des enzymes qui favorisent la déacétylation des histones et des protéines, la condensation de la chromatine et par conséquent la répression transcriptionnelle. Il existe 17 HDACs chez l'homme, qui sont regroupés en 3 classes (I, II, et III). HDAC -4, -5, et -7 font partie de la classe de HDACII qui interagit avec le facteur de transcription MEF2 qui contribue à l'hypertrophie cardiaque (McKinsey et al., 2002). HDAC phosphorylé est dissocié de MEF2, puis transloque du noyau vers le cytoplasme où il sera séquestré par la protéine chaperonne 14-3-3 (Figure 16) (Zhang et al., 2002 ; Wu et al., 2006). MEF2 induit alors la transcription des gènes pro-hypertrophiques grâce à sa région C-terminale, tandis que la dimérisation et la liaison à l'ADN est permise par la boîte MADS (MCM-1 agamous deficient serum response factor) (Nurrish et al., 1995 ; Molkenin et al., 1996).

La CaMKII contrôle donc l'expression génique majoritairement par le facteur de transcription MEF2 mais régule aussi CREB, C/EBP, ATF-1, AP-1 et SRF (Sheng et al., 1991 ; Wegner et al., 1992 ; Zhang et Brown, 2004).

La CaMKII cible aussi plusieurs protéines identiques à la PKA comme : le RyR, le LTCC, le phospholamban, MyBPC, et crée ainsi une voie de signalisation parallèle à celle de la PKA (Grimm et Brown, 2010 ; Banyasz et al., 2011).

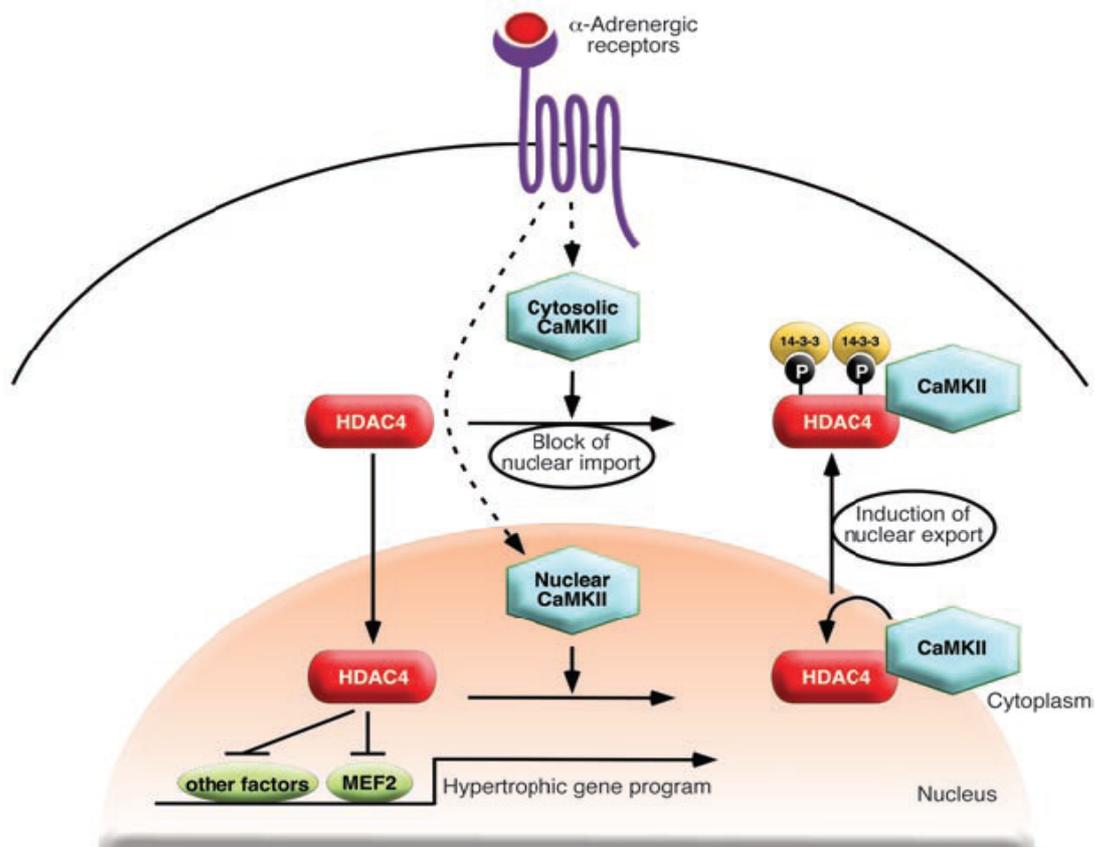


Figure 16 Activation de la CaMKII (D'après Backs et al., 2006).

En condition basale, HDAC4 est dans le noyau et est associé au facteur de transcription MEF2. Une stimulation α -adrénergique active la CaMKII qui phosphoryle HDAC4, permettant sa translocation du noyau au cytoplasme. HDAC4 est séquestré dans le cytoplasme par la protéine chaperonne 14-3-3. MEF2 et les facteurs de transcriptions qui lui sont associés sont ainsi libérés et peuvent transcrire les gènes pro-hypertrophiques.

5.1.5 La CaMKII et ses effecteurs dans l'hypertrophie

La CaMKII induit l'hypertrophie des cardiomyocytes en libérant MEF2 des HDACs de classe II (Lu et al., 2000). Elle régule aussi la libération du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique en phosphorylant le récepteur InsP3 (Ferris et al., 1991 ; Zhu et al., 1996 ; Bare et al., 2005).

La CaMKII en réponse à une stimulation hypertrophique exprime les marqueurs de l'hypertrophie ANF et BNP alors que son inhibition bloque l'augmentation de la taille cellulaire, l'activation de la β -MHC et la synthèse protéique (Ramirez et al., 1997 ; He et LaPointe, 2000 ; Zhu et al., 2000 ; Sucharov et al., 2006). L'expression ainsi que l'activité de la CaMKII augmentent sur des modèles de rats hypertendus (Hempel et al., 2002). Ce sont plus particulièrement les isoformes de la CaMKII δ_4 et δ_9 qui augmentent alors que δ_B (δ_3) et

δ_C (δ_2) ne varient pas (Hagemann et al., 2001). Dans des cœurs humains insuffisants, l'expression et l'activité de la CaMKII sont altérées (Sossalla et al., 2010). L'isoforme CaMKII δ augmente chez des patients atteints de cardiomyopathie (Hoch et al., 1999 ; Kirchhefer et al., 1999). Les deux variants d'épissage pour cette isoforme ont des rôles différents dans l'HC.

L'isoforme nucléaire CaMKII δ_B régule la transcription (Zhang et al., 2007). Les souris transgéniques CaMKII δ_B induisent une hypertrophie cardiaque (Zhang et al., 2002). Après 2 jours de sténose aortique, les isoformes CaMK δ_B et δ_C s'autophosphorylent et leur expressions augmentent, et l'activité de l'isoforme δ_C augmente après 7 jours de TAC (Colomer et al., 2003 ; Zhang et al., 2003). Les souris transgéniques surexprimant l'isoforme δ_C développent une cardiomyopathie dilatée, avec une diminution de la fonction contractile et meurent prématurément (Zhang et al., 2003). De plus, l'isoforme cytoplasmique CaMKII δ_C contribue au développement de l'IC en faisant varier le CEC par l'augmentation de la phosphorylation de RyR2 et du phospholamban (Maier et al., 2003 ; Zhang et al., 2007 ; Grimm et Brown, 2010).

Il est intéressant de noter qu'*in vitro* les études avec les formes constitutivement actives des CaMK I et CaMK IV induisent une réponse hypertrophique sur des cardiomyocytes (Passier et al., 2000).

5.2- Voie de la calcineurine (CaN) et de ses effecteurs

5.2.1 Définition, fonction

La CaN a été purifiée à la fin des années 1970 par le docteur Claude Klee, et nommée ainsi du fait de sa régulation par le calcium et sa forte concentration dans le tissu neuronal (Klee et al., 1979). C'est une sérine-thréonine phosphatase Ca^{2+} -CaM dépendante. La CaN est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires comme l'activation des cellules T dans le système immunitaire ou la libération de neurotransmetteurs.

5.2.2 Structure de la calcineurine

Cette protéine phosphatase, phylogéniquement très conservée, se présente sous forme d'hétérodimère composé d'une sous-unité catalytique A (CnA) et d'une sous-unité régulatrice B (CnB).

Chez les mammifères 3 gènes codent pour la sous-unité catalytique A : CnA α , CnA β , CnA γ , mais seuls CnA α et CnA β sont exprimés dans le cœur (Taigen et al., 2000). La sous-unité A est composée de plusieurs sous-domaines : un domaine catalytique localisé dans son extrémité N-terminale, de deux domaines de liaison : un à la calmoduline et un autre à la sous-unité B et enfin de son domaine inhibiteur qui réprime le domaine catalytique lorsque l'enzyme est sous sa forme inactive (Figure 17).

Chez les mammifères 2 gènes codent pour la sous-unité régulatrice B (CnB1 et B2), seul CnB1 est exprimé dans le cœur. La sous-unité régulatrice se lie au Ca²⁺.

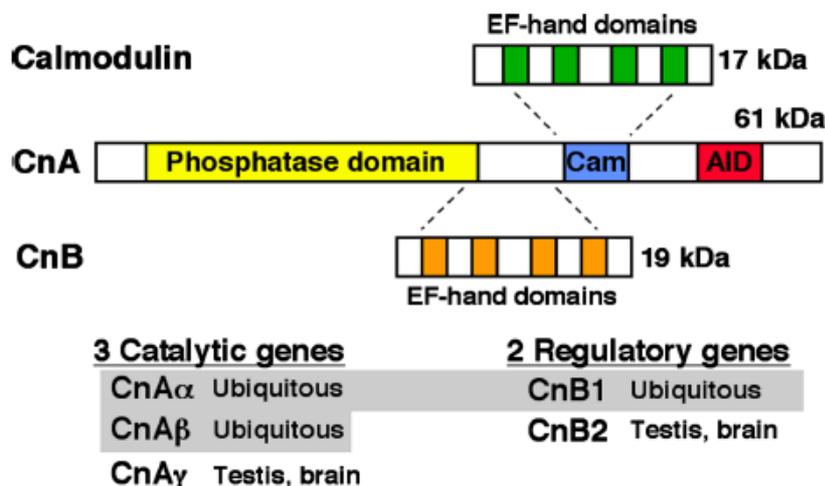


Figure 17 Représentation schématique de la CaN et site d'expression tissulaires de ses sous-unités (D'après Wilkins et Molkenin, 2004). La CaN est un hétérodimère composée d'une sous-unité catalytique A (CnA), d'une sous-unité régulatrice (CnB), et de la calmoduline. Ces différentes sous-unités sont reliées entre elles par des liaisons de hautes affinités au Ca²⁺. Localisation des différentes isoformes des sous-unités de la CaN. CnA α , CnA β , et CnB1 sont ubiquitaires.

Cam : domaine de liaison à la calmoduline et AID : domaine auto-inhibiteur

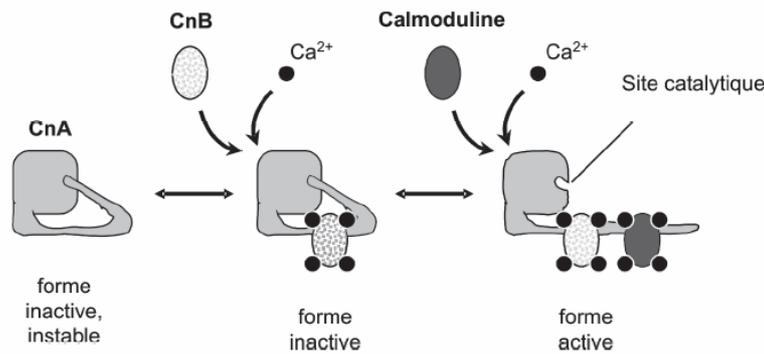


Figure 18 Structure et activation de la calcineurine. (D'après Seyer et al., 2006). La forme active de la CaN est composée de la CnA, la CnB et la calmoduline. Pour de faibles concentrations de Ca²⁺, les domaines phosphatases N-terminaux de la sous-unité CnA sont bloqués par le site d'autoinhibition C-terminal. En réponse à une augmentation de Ca²⁺, la calmoduline se fixe à la sous-unité CnA et induit un changement de conformation qui libère le site catalytique.

CnA : sous-unité catalytique, CnB : sous unité régulatrice

5.2.3 Régulation de la calcineurine

Le mécanisme de régulation de la CaN est conservé entre les espèces. L'activité de la CaN est contrôlée par la concentration de Ca²⁺ intracellulaire. A faible concentration de Ca²⁺, la sous-unité B se lie faiblement à la sous-unité A et la CaM n'est pas liée au complexe. De plus, le domaine auto-inhibiteur de la CaN se lie au domaine catalytique, bloquant ainsi le site actif de façon stérique, gardant la CaN inactive (Hashimoto et al., 1990). L'augmentation de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire active la CaM qui libère le domaine auto-inhibiteur de son site actif en se liant avec le domaine de liaison de la sous-unité A de la CaN. La fonction phosphatase de la CaN est alors activée (Figure 18).

La CaN est aussi régulée par les phospholipides (Politino et al., 1987) et l'état oxydatif de ses ions métalliques Fe-Zn contenu dans son centre catalytique. Ainsi, la superoxide dismutase protège la CaN de l'inactivation en prévenant son oxydation. A l'inverse, l'anion superoxide inactive la CaN par oxydation (Rusnak et al., 2000 ; Namgaladze et al., 2002 ; Wang et al., 1996). Enfin, la CaN est régulée par différents inhibiteurs (Voir Chapitre IV) (Wilkins et Molkentin, 2004 ; Heineke et Ritter, 2012).

5.2.4 Les facteurs de transcription activés par la calcineurine

La plupart des effets cardiaques de la CaN sont exercés par les facteurs de transcription NFAT et MEF2.

a) NFAT (nuclear of activated T cells)

Les facteurs de transcription NFAT sont les cibles majeures de la CaN. Sur les cinq isoformes de NFAT, quatre (NFATc1-4) sont régulés par l'activité de la CaN. Les facteurs NFATc résident dans le cytoplasme des cellules non stimulées sous un état hyperphosphorylé. A l'état déphosphorylé, NFAT est transloqué dans le noyau où il se fixe à une séquence d'ADN consensus GGAAAAT par le biais de son domaine d'homologie Rel (RHD). Pour renforcer l'interaction NFAT-ADN, les facteurs de transcriptions interagissent avec d'autres protéines comme AP-1, GATA-4 et MEF2 (Wilkins et al., 2004).

b) MEF2

Bien que MEF2 soit classiquement régulé par les HDACs de classe II indépendamment de la CaN, il représente un régulateur majeur de la transcription d'un certains nombre de gènes hypertrophiques induit par un stress mécanique, une stimulation adrénérgique ou l'activation de la CaN. En effet, la surexpression de la CaN dans le cœur de souris augmente l'activité transcriptionnelle de MEF2 (Passier et al., 2000). Quatre gènes codent pour le facteur de transcription MEF2A,-B,-C, et -D (Potthoff et al., 2007). MEF2 se lie à l'ADN pour induire l'expression de plusieurs gènes cardiaques dont l' α -MHC, l'ANF, les troponines, SERCA2 et la desmine (Barry et al., 2010). Un des mécanismes de l'activation de MEF2 par la CaN implique le recrutement de la protéine NFAT (McKinsey et al., 2002). Dans les lymphocytes T, après la translocation de NFATc2 au noyau par la CaN, NFATc2 s'associe directement à MEF2A et MEF2D et stimule la transcription de MEF2 en facilitant le complexe avec p300 (Blaeser et al., 2000 ; Youn et al., 2000). Dans le cœur, c'est NFATc3 qui interagit avec MEF2 (van Oort et al., 2006). Le facteur de transcription MEF2 est donc activé par la CaN de manière NFAT dépendante (van Oort et al., 2006).

Les souris transgéniques qui expriment le dominant négatif de MEF2, inhibant son activité transcriptionnelle, ne développent pas de dilatation ventriculaire et de défauts de contractions (van Oort et al., 2006). La surexpression de MEF2A et MEF2C dans le cœur de souris transgéniques induit des problèmes de fonction cardiaque, une hypertrophie excentrique et une cardiomyopathie dilatée (CMD) (Xu et al., 2006). Par ailleurs, l'absence de MEF2D, réduit la dilatation ventriculaire gauche, la taille des myocytes et de la fibrose en réponse à

une surcharge de pression. En revanche, la surexpression de MEF2D dans le cœur de souris transgéniques est suffisante pour induire le remodelage pathologique (Kim et al., 2008).

5.2.5 La calcineurine dans le noyau

Dans le cœur insuffisant, la quantité de CaN dans le noyau augmente (Burkard et al., 2005). La présence de la CaN dans le noyau assure l'activité transcriptionnelle de NFAT (Zhu et McKean, 1999). Ceci est dû à une autre voie de l'activation de la CaN qui se fait par la protéase calpaïne qui protéolyse son domaine auto-inhibiteur C-terminal. Le site de clivage se situe dans le domaine de la sous-unité A de la CaN. La lyse induite par la calpaïne induit la perte du domaine auto-inhibiteur, qui révèle le domaine phosphatase et le signal de localisation nucléaire, résultant dans l'activation de la phosphatase et l'import nucléaire de la CaN ; et la CnA perd sa séquence d'export nucléaire (NES), restant donc nucléaire. L'inhibition de la calpaïne permet l'exportation nucléaire de la CaN et diminue l'activité CaN (Burkard et al., 2005). Le clivage du domaine auto-inhibiteur induit par la calpaïne et le lien avec l'HC ont été démontrées dans le tissu myocardique humain.

L'analyse de la séquence de la CnA a identifié deux régions distinctes comprenant un signal de localisation nucléaire (NLS) et une séquence d'export nucléaire, qui sont tous deux essentiels pour le transport de CnA à travers le complexe de pore nucléaire. Habituellement, ces séquences sont cachées au sein de la molécule, mais sont exposées par la fixation du Ca^{2+}/CaM ou par le clivage par la calpaïne. Les protéines navette pour la CnA sont l'importine $\beta 1$ pour l'importation et l'exportine 1 (Crm1) pour l'exportation.

5.2.6 Altérations de la voie CaN-NFAT

La cascade des MAPKs régule la signalisation de la CaN (Liang et Molkentin, 2003). Ainsi, les kinases JNK et p38 phosphorylent respectivement NFATc3 et NFATc4, entraînant leur export nucléaire (Chow et al., 1997 ; Yang et al., 2002). Wilkins et Molkentin (2004) émettent l'hypothèse que p38 et JNK, agissent comme des facteurs anti-hypertrophiques *in vivo* en inhibant la voie CaN-NFAT.

Un autre modulateur de la voie CaN dans le cœur est GSK-3 β , une sérine-thréonine kinase, qui phosphoryle les facteurs de transcriptions NFATs, inhibant ainsi leur localisation nucléaire et leur liaison à l'ADN (Neal et al., 2001). De plus, GSK-3 β est un effecteur connu de la voie PI3K-Akt. L'activation d'Akt conduit à la phosphorylation et à l'inhibition de GSK-3 β . On peut donc prédire que des stimuli physiologiques de croissance (comme IGF-1)

induiraient l'activation d'Akt, l'inhibition de GSK-3 β , et l'activation de NFAT. Cependant, il n'y a pas de changement de l'activité NFAT dans l'hypertrophie après surexpression de Akt (Wilkins et Molkentin, 2004). La raison la plus probable devant ces différences est liée aux effets multifactoriels attribués à GSK-3 β .

5.2.7 Implication de la calcineurine dans l'hypertrophie cardiaque

Les récepteurs β -ARs activent la voie CaN/NFAT3/GATA4 (Yang et al., 2010a). Mais l'activité CaN est aussi augmentée par l'AngII, la PE et le SBF (sérum de bovin fœtal) (Taigen et al., 2000). *In vitro*, un adénovirus codant pour la forme constitutivement active de la CaN favorise la croissance hypertrophique des cellules cardiaques de rats nouveaux nés (De Windt et al., 2000). La CaN est nécessaire et suffisante pour induire l'hypertrophie cardiaque (Wilkins et Molkentin, 2004).

Les formes constitutivement actives de la CaN ou de NFATc4 exprimées dans des cœurs de souris transgéniques sont suffisantes pour induire une hypertrophie cardiaque massive qui peut progresser vers une cardiomyopathie dilatée avec de la fibrose interstitielle, une insuffisance cardiaque congestive et une mort subite (Molkentin et al., 1998). De manière générale pour NFAT, des souris transgéniques contenant le gène NFAT lié au gène rapporteur luciférase montre que l'activité NFAT est plus élevée en réponse à une hypertrophie induite par une charge de pression ou à une insuffisance cardiaque associé à un infarctus en comparaison avec les souris sauvages (Wilkins et al., 2004). De plus, l'expression d'un mutant constitutivement actif de la CaN augmente l'activité transcriptionnelle de MEF2 par une voie NFAT indépendante, indiquant que les effets hypertrophiques de la CaN ne sont pas exclusivement induit par le facteur de transcription NFAT (Fiedler et al., 2002). Lors d'une surcharge de pression cardiaque, la CaN diminue l'augmentation de la phosphorylation du phospholamban, agissant comme un régulateur négatif de performance contractile durant la stimulation des β -ARs (MacDonnell et al., 2007).

Les souris KO inductibles de la sous-unité CnB1 développent une IC sévère et meurent plus rapidement que les sauvages. La délétion du gène CnB1 chez la souris induit une délétion quasi totale de la CaN, car la CnA n'est stable qu'en présence de CnB (Maillet et al., 2010). Les souris portant la délétion CnA β ont un cœur à l'état basal plus petit que les souris sauvages et ont une réponse à l'hypertrophie cardiaque réduite suite à des stimuli

hypertrophiques (Bueno et al., 2002). De plus, la CaN doit jouer un rôle important dans l'hypertrophie maladaptative car les souris portant une délétion de NFATc3 suite à différents stimuli hypertrophique pathologiques montrent des réponses hypertrophiques diminuées. NFATc3 est donc un effecteur direct de la CaN dans le cœur. Il est nécessaire pour induire l'hypertrophie cardiaque mais n'est pas suffisant pour l'insuffisance cardiaque (Wilkins et al., 2002). En revanche, NFATc4 n'est pas un effecteur direct de la CaN car les souris délétées de NFATc4 répondent aux stimuli hypertrophiques (Bueno et al., 2002 ; Wilkins et al., 2002). Enfin, la perte du gène NFATc1 induit une mortalité embryonnaire dû à une malformation d'une valve du cœur et une insuffisance cardiaque (de la Pompa et al., 1998 ; Ranger et al., 1998).

IV - Inhibiteurs de la calcineurine

La meilleure compréhension des voies de signalisation conduisant à l'hypertrophie et à l'insuffisance cardiaque permet de cibler les protéines dont il faut restreindre l'activité et rechercher ainsi de nouveaux inhibiteurs.

1 - Inhibiteur pharmacologique de la calcineurine

Les premiers inhibiteurs de la CaN utilisés ont été les agents pharmacologiques. La CaN est inhibée distinctement par deux agents immunosuppresseurs : la cyclosporine A (CsA) et le tacrolimus (FK506). Les cyclophilines (cyclophiline A) et les FKBP (FKBP12) forment la famille des immunophilines, qui ont la capacité de fixer les immunosuppresseurs. Ainsi, la CsA se lie à la protéine cytoplasmique Cyclophiline A et s'associe ensuite avec la CaN pour inhiber son activité phosphatase (Handschumacher et al., 1984). De même pour le FK506, la liaison FKBP12/FK506 se fixe à la CaN pour l'inhiber (Bram et al., 1993).

VIVIT, un peptide synthétique, prévient l'interaction CaN/NFAT et l'activation de NFAT par la CaN, sans inhiber l'activité phosphatase de la CaN (Aramburu et al., 1999 ; Yu et al., 2007). A la différence de la CsA, VIVIT n'a pas d'effet sur l'activation basal de ERK (Yu et al., 2007).

In vitro, le traitement de cardiomyocytes par la CsA, le FK506 ou VIVIT, inhibe l'hypertrophie des cardiomyocytes de rats nouveaux nés induite par les stimuli hypertrophiques (Molkentin et al., 1998 ; Pu et al., 2003).

De plus, l'administration de CsA ou FK506, prévient le développement de l'IC dans des modèles murins de cardiomyopathie dilatés (souris transgéniques qui surexpriment la tropomoduline, la chaîne légère de myosine2 et la β -tropomyosine fœtal) (Sussman et al., 1998). De plus, chez les rats, FK506 inhibe l'HC ainsi que la fibrose cardiaque induite par surcharge de pression (Shimoyama et al., 1999). La CsA ainsi que VIVIT ont aussi été reportés pour prévenir l'hypertrophie cardiaque induite par une surcharge de pression, mais ce résultat est controversé car ce n'est pas le cas dans toutes les études *in vivo* (Ding et al., 1999 ; Zhang et al., 1999 ; Kuriyama et al., 2006). L'utilisation efficace de CsA ou du FK506 contre l'HC réalisée dans des modèles animaux, suggèrent donc une application possible à l'homme (Sussman et al., 1998).

Cependant, la CsA et le FK506 présentent des effets non spécifiques de l'activité de la CaN (Meyer et al., 1997 ; duBell et al., 1998 ; Kaibori et al., 1999). Les inhibiteurs pharmacologiques CsA et FK506 sont déjà utilisés chez l'homme pour des transplantations. Il existe une littérature clinique décrivant les effets indésirables d'une thérapie à long-terme avec la CsA. Les patients recevant des transplantations cardiaques par exemple, qui reçoivent une thérapie associée à la CsA, souffrent de toxicité néphrogénique et d'hypertension (Morgan et al., 1991). Le traitement au FK506 pour les bénéficiaires de transplantation cardiaque semble être plus bénéfique à celui de la CsA à l'égard de l'hypertension, de l'hyperlipidémie, de l'hirsutisme et de l'hyperplasie gingivale (Penninga et al., 2010). Il est donc important de découvrir et développer de nouveaux inhibiteurs de la CaN, qui auraient moins d'effet indésirables. La CaN étant présente dans différents domaines subcellulaires, une approche thérapeutique prometteuse pourrait impliquer une inhibition de la CaN dans des domaines subcellulaires principalement impliqués dans la signalisation pro-hypertrophique (Heineke et Ritter, 2012). L'activité de la CaN est régulée par de nombreux inhibiteurs ou facteurs modulateurs tels que Cabin1/Cain, AKAP79, MCIP1 ou la calsarcine, localisés dans des distributions subcellulaires différentes (Figure 19).

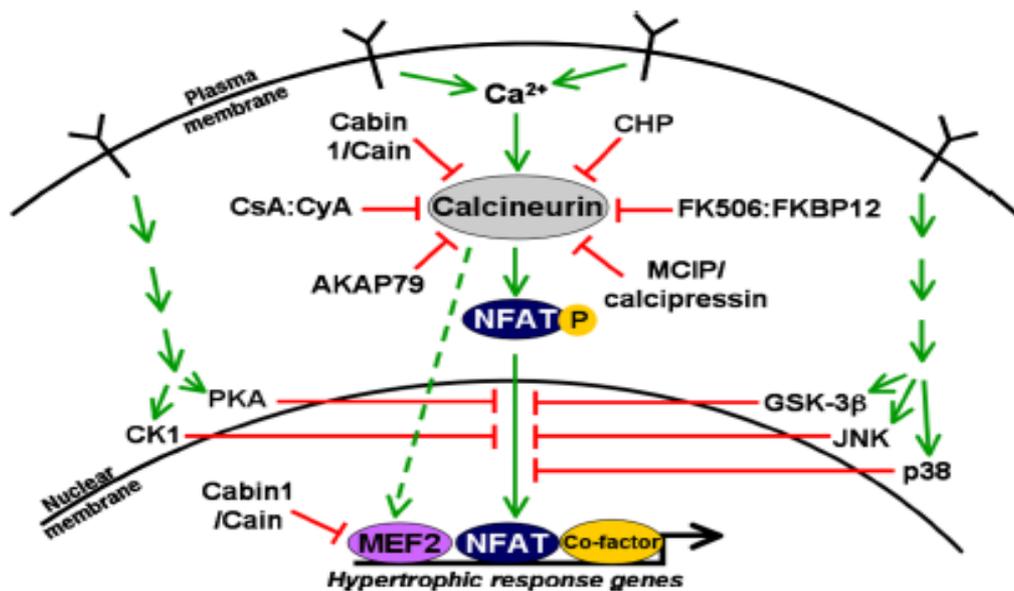


Figure 19 Inhibiteurs de la calcineurine (d'après Wilkins et Molkenin, 2004)

Schéma des voies de signalisations de la CaN induisant la déphosphorylation et la translocation nucléaire de NFAT ou l'activation de MEF2 dans le noyau. Plusieurs inhibiteurs de la CaN se situent dans le cytoplasme, tandis que la transduction du signal des autres voies active différentes kinases qui phosphorylent NFAT ou facilitent sa translocation nucléaire. Les lignes vertes représentent l'activation alors que les lignes rouges représentent les inhibitions. CyA : cyclophiline A.

Protéines inhibitrices dans l'espace proche des sarcolemmes

La CaN est localisée sur le sarcolemme et les tubules T. Fait intéressant, la CaN peut interagir directement avec les phospholipides membranaires grâce à sa sous-unité CnB ainsi qu'avec différentes protéines associées au sarcolemme (comme CIB1, MLP, les canaux calciques de type L) et les protéines du disque Z (comme la calsarcine, MLP). Nous allons examiner comment les protéines du sarcolemme des cardiomyocytes modifient la localisation de la CaN, son activation et la régulation de l'hypertrophie. La CaN peut aussi être localisée au niveau du noyau et certaines protéines régulatrices comme Cabin1/Cain agissent dans chacune de ses localisations.

2 - Cabin1/ Cain

Cabin 1/Cain : cette protéine (2200 acides aminés) possède un domaine C-terminal qui agit comme un inhibiteur endogène puissant non compétitif de la CaN (Lai et al., 1998 ; Sun et al., 1998). Les protéines Cain et Cabin, découvertes en même temps, ont donc été nommées différemment mais il s'agit de la même protéine. La protéine Cain a été découverte dans le cerveau, majoritairement dans le cytosol, et en parallèle Cabin 1 a été découverte dans les lymphocytes T, majoritairement dans le noyau. Elle est cependant présente dans tous les organes, mais faiblement exprimée dans le cœur, avec du splicing (Lai et al., 1998 ; Sun et al., 1998). La liaison de Cabin 1/Cain à la CaN est dépendante du Ca^{2+} et de la PKC. La PKC entraîne l'hyperphosphorylation de Cabin 1/Cain, augmentant son affinité pour la CaN (Szijgyarto et al., 2007). Enfin, la constante d'inhibition, le K_i de Cabin 1/Cain, qui représente la concentration en inhibiteur pour laquelle la moitié des sites enzymatiques sont occupés, est de $0.4\mu M$. C'est donc un puissant inhibiteur endogène de la CaN (Lai et al., 1998). L'expression de Cabin 1/Cain sauvage ou de son domaine C-terminal inhibe la déphosphorylation de NFAT *in vivo* en réponse à une stimulation PMA ou ionomycine (Sun et al., 1998). Cabin 1/Cain inhibe aussi MEF2 activé par ERK5 (Kasler et al., 2000). MEF2 se lie à Cabin 1/Cain au niveau de son extrémité C-terminale pour bloquer son activité transcriptionnelle mais Cabin 1/Cain n'inhibe pas la liaison de MEF2 à l'ADN (Youn et al., 1999). Pendant l'apoptose, Cabin 1 /Cain est clivée par la calpaïne à son domaine de liaison à la calcineurine, ce qui active la CaN (Kim et al., 2002).

Cain/Cabin dans l'hypertrophie cardiaque

In vitro, la surexpression de Cabin diminue l'activité CaN endogène, la réponse transcriptionnelle de NFAT, l'hypertrophie des cardiomyocytes et l'expression de l'ANF induite par PE ou AngII (Taigen et al., 2000). Cabin 1/ Cain inhibe aussi le facteur de transcription MEF2 (De Windt et al., 2001). La surexpression de Cabin 1/Cain par un adénovirus injecté dans l'aorte coronaire de cœurs de rats adultes avec surcharge de pression, inhibe aussi l'activité CaN et l'hypertrophie (De Windt et al., 2001). Les souris transgéniques qui surexpriment Cabin 1/Cain spécifiquement dans le cœur présentent une diminution de l'activité de la CaN et de l'HC, en réponse à l'isoprénaline ou à une surcharge de pression (De Windt et al., 2001). De plus, Cabin 1/Cain semble également réguler l'HC adaptative, car son expression augmente dans le cœur de rat entraîné à l'exercice (Iemitsu et al., 2005).

3 - AKAP79

AKAP79 forme un complexe à la membrane plasmique lié à la cavéoline 3, aux LTCC, aux récepteurs β -ARs, à l'adénylate cyclase 6, à la PKA et à la CaN dans les cardiomyocytes de souris adultes. C'est un complexe essentiel dans l'initiation du signal intracellulaire en réponse à une stimulation à l'isoprotérénol dans les cardiomyocytes (Nichols et al., 2010).

In vitro, la protéine d'échafaudage AKAP79 se lie directement à la CaN induisant son inhibition de manière non compétitive, indépendamment du Ca^{2+} et de la CaM (Coghlan et al., 1995). La région de la CaN nécessaire à la liaison de AKAP 79 se situe entre les acides aminés 30-98 de la sous unité A de la CaN (Kashishian et al., 1998). La surexpression d'AKAP 79 inhibe la déphosphorylation de NFAT par la CaN endogène, entraînant ainsi une diminution de l'activation de NFAT (Kashishian et al., 1998). L'infection des cardiomyocytes par un adénovirus codant pour AKAP79 inhibe l'activité de la CaN, l'hypertrophie cellulaire et l'expression de l'ANF induite par un agoniste α -adrénergique (Taigen et al., 2000). Enfin, *in vivo*, les souris transgéniques exprimant dans le myocarde le domaine inhibiteur de la CaN de AKAP79, développe moins d'HC en réponse à une sténose aortique ou une stimulation à l'isoprotérénol (De Windt et al., 2001). Une surexpression de AKAP79 atténue donc l'hypertrophie des cardiomyocytes par une inhibition spécifique de la CaN.

4 - La Calsarcine

La calsarcine est une protéine du muscle strié dont la famille est composée de trois membres : calsarcine 1, 2 et 3 (Heineke et Ritter, 2012). La Calsarcine 1 est le seul membre de cette famille qui est exprimée dans le cœur où elle est localisée dans les disques Z des sarcomères pour interagir avec l' α -actinine, la γ -filamin, la T-Cap/telethonin et ZASP/Cypher/Oracle (Frey et al., 2000 ; Frey et al., 2004). La calsarcine est aussi exprimée dans le noyau où sa fonction reste à déterminer (Paulsson et al., 2010).

Des études *in vitro* montrent que la surexpression de la calsarcine 1 inhibe l'activité de la CaN et l'HC induite par la PE, l'AngII et l'ET-1 (Frank et al., 2007).

Les souris délétées de *Myoz*, le gène de la calsarcine 1, ont des cœurs normaux, mais présentent une activité de NFAT augmentée, une réexpression des gènes fœtaux et un élargissement des disques Z (Frey et al., 2004). Pour étudier les effets de l'absence de calsarcine 1 sur la réponse hypertrophique, les souris *Myoz* KO ont été croisées avec des souris surexprimant la CaN dans le myocarde. L'hypertrophie habituellement observée chez les souris surexprimant la CaN, est fortement augmentée chez les souris délétées de la calsarcine. De plus, chez ces mêmes souris, une constriction de l'aorte induit une réponse hypertrophique exagérée (Frey et al., 2004). On peut donc conclure que la perte de calsarcine augmente l'hypertrophie mais la surexpression l'en protège. Ces études montrent que la calsarcine est un régulateur négatif de la voie CaN dans le cœur (Leenders et al., 2011).

5 - PICOT (PKC-interacting cousin of thioredoxin)

La protéine PICOT est un inhibiteur de la PKC. PICOT exerce un rétrocontrôle négatif sur l'HC car elle est exprimée par des stimuli hypertrophiques, pour diminuer l'HC. Récemment PICOT a été identifiée comme un inhibiteur endogène de l'interaction MLP/CaN (Jeong et al., 2008). MLP est une LIM protéine fortement exprimée dans le muscle strié, notamment dans le cœur, où elle est localisée au niveau du sarcolemme, des disques Z, du cytoplasme et dans le noyau (Gunkel et al., 2009). Les protéines LIM constituent une famille de molécules régulatrices possédant dans leur séquence protéique un ou plusieurs motifs en doigts de zinc – les domaines LIM – dont la fonction principale est de diriger les interactions protéine-protéine. La protéine PICOT inhibe l'augmentation de l'activité de la CaN, la translocation de NFAT et l'activation de la transcription induite par la PE. Son domaine C-terminal est

suffisant pour cette inhibition (Jeong et al., 2008). La surexpression de PICOT dans le cœur de souris transgénique inhibe l'HC et réduit l'activité de la CaN en la délocalisant des disques Z. PICOT est donc aussi un inhibiteur de la CaN, dans son complexe avec MLP.

6 - L'Atrogine-1

L'atrogine-1 est une protéine F-box spécifiquement exprimée dans les tissus musculaires cardiaques et squelettiques, qui joue un rôle important dans la régulation de l'atrophie musculaire en augmentant l'activité du protéasome (Gomes et al., 2001). Les protéines F-box fonctionnent comme des adaptateurs qui s'associent à Skp1, Cul1 et Roc1 du complexe SCF pour se lier et recruter les protéines à ubiquitinyler. L'atrogine 1 s'associe au complexe SCF pour son activité ubiquitine ligase. Les perturbations dans le système ubiquitine/protéasome sont soupçonnées d'être impliquées dans le développement de l'IC, car la maladie est associée à des niveaux plus élevés d'ubiquitine intracellulaires et une surrégulation des enzymes impliquées dans l'ubiquitination E1, E2, E3.

Au niveau des disques Z des cardiomyocytes, l'atrogine-1 interagit directement avec la CaN et l' α -actinine2. Elle diminue l'expression et l'activité de la CaN. Le complexe SCF contenant l'atrogine-1 a une activité ligase ubiquitine E3 et induit l'ubiquitination de la CaN *in vitro*. De plus l'atrogine inhibe la translocation NFATc4, la réexpression des gènes fœtaux et l'HC (Li et al., 2004b). A l'inverse, une diminution de l'atrogine augmente l'activité de la CaN et l'HC (Li et al., 2004b).

La surexpression de l'atrogine 1 dans les cœurs de souris diminue l'activité de la CaN et l'HC, après sténose de l'aorte. De plus, la réexpression des gènes fœtaux est beaucoup plus faible dans le cœur de souris transgéniques. L'atrogine-1 inhibe l'HC *in vivo* en diminuant l'expression de la CaN et en diminuant son activité (Li et al., 2004b).

Chez l'homme, l'ARNm et l'expression d'atrogine 1 dans des cœurs insuffisants est augmentée par l'augmentation de Foxo3 (Galasso et al., 2010). En effet, l'expression d'atrogine-1 dans le muscle squelettique est régulée par Foxo3a, un facteur de transcription qui régule négativement la taille des cardiomyocytes de rats. La forte expression de l'atrogine-1 doit augmenter l'ubiquitination des protéines et leur dégradation dans l'HC (Galasso et al., 2010). L'augmentation de l'expression des protéines Foxo3 et de l'atrogine-1 est corrélée avec le développement de l'HC ventriculaire gauche. L'atrogine-1 est donc une protéine inhibitrice de la CaN chez la souris et chez l'homme.

7 - MCIP1 (Modulatory calcineurin-interacting proteins)

MCIP1 est aussi appelé calcipressin/ Dscr1/ Rcn1 (Rothermel et al., 2003). Cette petite protéine se lie et inhibe la CaN. A l'origine MCIP1 avait le nom de myocytes enrichit en protéines interagissant avec le CaN (« Myocyte-enriched Calcineurin Interacting Proteins ») (Rothermel et al., 2000). Mais ce nom a été remplacé par celui de « protéines régulatrices de la liaison de la CaN » (« modulatory calcineurin interacting proteins ») car son expression n'est pas limitée aux muscles. Il existe 3 gènes codants pour la protéine MCIP1 chez l'humain et la souris : *MCIP1*, 2, et 3 qui peuvent avoir des transcrits différents. Le gène *MCIP1* est situé sur le chromosome humain 21. Les gènes *MCIP1* et *MCIP2* ainsi que leur protéines sont fortement exprimés dans le cœur adulte des souris et des hommes mais *MCIP3* n'est pas présent dans le cœur de souris (Fuentes et al., 1997 ; Sanna et al., 2006).

Dans des cultures de cardiomyocytes de rats nouveaux nés, les contraintes mécaniques ainsi que le traitement par des facteurs hormonaux (PE, ET-1, AngII, TNF α et LIF) induisent l'expression de MCIP1 (Wang et al., 2002). De plus, une stimulation à l'isoprotérénol augmente l'ARNm, l'expression de la protéine et l'activité du promoteur MCIP1 (Chen et al., 2011). Le transcrit de l'isoforme MCIP1.4 est induit par l'activation de la CaN ainsi que par le stress oxydatif et la réponse à l'accumulation de protéine dénaturées dans le réticulum endoplasmique (Yang et al., 2000 ; Crawford et al., 1997 ; Leahy et al., 1999). La boucle régulatrice CaN et MCIP1 est donc activée par différentes conditions conduisant à l'HC.

La spécificité de MCIP1 est que sa transcription et sa dégradation sont régulées par la CaN, établissant une boucle de rétrocontrôle négative, suggérant MCIP1 comme un régulateur endogène de la transduction du signal de la CaN. La CaN active la transcription de MCIP1 et la stabilise. MCIP1 prévient l'excès de CaN activé qui peut être délétère pour la cellule.

L'inhibition de la calcineurine par MCIP1

Ainsi, les protéines MCIP1 sont de puissants inhibiteurs de la CaN *in vitro* et *in vivo* (Rothermel et al., 2000 ; Fuentes et al., 2000 ; Gorlach et al., 2000). Les protéines MCIP1 se lient directement à la sous-unité A de la CaN sans se lier à la sous-unité B ou la CaM. De plus, MCIP1 doit se lier préférentiellement à la forme active de la CaN car elle ne rivalise pas avec le domaine d'auto-inhibition. Les deux inhibiteurs FK506 et CsA perturbent l'interaction

de MCIP1 avec la CaN suggérant que ces agents immunosuppresseurs sont en compétition avec les sites de liaison de la CaN de MCIP1.

La structure principale de MCIP1, conservée de la levure aux mammifères, est une région de 31 acides aminés qui inclue les acides phosphoaminé substrats de la CaN. C'est une région similaire aux serine-proline (SP) répétées des protéines NFAT. La déphosphorylation des phosphosérines de NFAT induit sa translocation du cytoplasme vers le noyau. Les phosphosérines de la région SP répétée de MCIP1 agissent aussi comme substrat de la CaN et peuvent être phosphorylé *in vitro* et *in vivo* (Vega et al., 2002). Après phosphorylation de la serine 112 de MCIP1, la serine 108 est phosphorylée par GSK3. La phosphosérine 108 de MCIP1 est un substrat de la CaN (Vega et al., 2002). Etrangement la région fortement conservée contenant la région répétée de SP n'est ni nécessaire, ni suffisante pour la liaison et l'inhibition de la CaN (Vega et al., 2002). La région SP doit influencer la stabilité de la protéine mais les régions N- et C-terminales sont requise pour l'inhibition forte (Rothermel et al., 2003).

Le double rôle de MCIP1

Les souris doublement transgéniques pour la CaN et la forme humaine de MCIP1 dans le myocarde (*αMHC-CnA* et *αMHC-hMCIP1*) sont protégés de l'hypertrophie, démontrant qu'une forte expression de MCIP1 peut protéger le myocarde d'une forte activité de la CaN (Rothermel et al., 2001). Le transgène *αMHC-hMCIP1* peut aussi atténuer l'hypertrophie en réponse à une surcharge de pression, à une stimulation des récepteurs β-ARs et à l'exercice (Rothermel et al., 2001). Ainsi, une augmentation de l'expression cardiaque de MCIP1 a des effets cardio-protecteurs contre divers stimuli pro-hypertrophiques.

Cependant l'étude de la souris knock-out *Mcip1* a révélé un double rôle de la protéine. Initialement la souris invalidée *Mcip1* était attendue pour avoir une réponse exagérée à l'hypertrophie puisque MCIP1 est une protéine inhibitrice de la CaN. Alors que les souris MCIP1 *-/-* présentent une réponse hypertrophique exagérée en réponse à la CaN activée, l'hypertrophie induite par une constriction de l'aorte abdominale ou une injection d'isoprotérénol est réduite par la perte de MCIP1. L'hypothèse pouvant expliquer ce double rôle de MCIP1 réside dans l'intensité, la nature et la force des stimuli hypertrophiques.

Des souris délétées pour les gènes *MCIP1* et *MCIP2* présentent une diminution de l'hypertrophie cardiaque induite par une surcharge de pression, une stimulation neuroendocrinienne ou l'exercice, similaire aux souris déficientes de la CaNA β (Sanna et al., 2006). Des fibroblastes d'embryons de ces souris délétées des gènes *MCIP1* et *MCIP2* montrent une activité de NFAT réduite, suggérant que MCIP1 est requis pour un couplage CaN-NFAT efficace. MCIP1 est donc à la fois un inhibiteur et un activateur de l'activité de la CaN dans différentes conditions (Vega et al., 2003).

V - Problématique

Dans les paragraphes précédents, j'ai essayé de montrer l'importance des voies de signalisation associées à CaN et Ras dans l'hypertrophie de type pathologique. Le but de ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre général de la détermination des voies de signalisation associées au remodelage cardiaque. Mon travail de thèse visait à caractériser les effets fonctionnels de Carabine dans l'hypertrophie du cardiomyocyte induite par une stimulation α_1 - et β -adrénergique/Epac.

1 - Position de l'étude

Lors d'un stress hémodynamique, le cœur développe un mécanisme compensateur d'HC. Ce mécanisme permet au cœur d'augmenter sa force de contraction et ainsi de fournir une réponse adaptée au stress. Bien que l'hypertrophie cardiaque représente initialement une réponse adaptative dite physiologique, elle évolue fréquemment vers une dilatation des ventricules et une IC et devient alors pathologique (Hill et Olson, 2008). Des études épidémiologiques ont mis en évidence que l'IC représente un risque majeur de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés (Levy et al., 2002). Au niveau moléculaire et cellulaire, l'HC pathologique est caractérisée par une augmentation disproportionnée des cardiomyocytes ainsi que par la réexpression de certains gènes fœtaux tels que l'ANF. L'IC est la principale cause d'hospitalisation pour les personnes âgées de plus de 60 ans et l'espérance de vie augmentant continuellement, il y aura un accroissement important du nombre de personnes souffrant de cette pathologie et en conséquence, un besoin accru de développer de nouvelles cibles thérapeutiques pour élaborer de nouveaux traitements.

L'activation chronique de certains récepteurs couplés aux protéines G favorise l'hypertrophie des cardiomyocytes via de nombreuses voies de signalisation intracellulaire. Ceci est bien illustré avec les récepteurs adrénérgiques. En réponse à une élévation des taux circulants de catécholamines (noradrénaline et adrénaline), les récepteurs α_1 -AR activent les protéines G hétérotrimériques de type Gq et G12/G13 et la PLC pour induire une croissance anormale du cardiomyocyte (Barry et al., 2008). Récemment, nous avons montré qu'en réponse à une sur-activation des récepteurs β -AR, la protéine sensible à l'AMPc Epac provoque l'hypertrophie des cardiomyocytes indépendamment de la PKA (Métrich et al., 2008). En aval de α_1 -AR et β -AR, la phosphatase CaN a été établie comme un modulateur majeur de l'hypertrophie cardiaque (Heineke et Ritter, 2012). La petite protéine G Ras ainsi

que la CaMKII sont également impliqués dans les effets hypertrophiques des récepteurs adrénergiques (Lezoualc'h et al., 2008 ; Anderson et al., 2011).

Ainsi, la découverte de la protéine Carabine dans les cellules du système immunitaire a attiré notre attention. En effet, cette protéine de 446 acides aminés possède deux domaines : un domaine Ras/Rab GAP (séquence 89-294) et un domaine de liaison à la CaN dans sa partie C-terminale (séquence 406-446) (Figure 20) (Pan et al., 2007). Dans les cellules T et B, Carabine inhibe par le biais d'interaction moléculaire l'activité phosphatase de la CaN et la signalisation associée à la petite protéine G, Ras (Pan et al., 2007) . Les effets cardiaques de Carabine n'ont, à ce jour, pas encore été étudiés. De façon intéressante, nous avons constaté qu'en présence de stimuli pro-hypertrophiques (stimulation prolongée des α_1 -AR ou β -AR), l'expression de Carabine est augmentée dans des cultures primaires de cardiomyocytes de rat nouveaux nés et adultes. Cette protéine portant un domaine Ras/Rab GAP et un site d'interaction avec la CaN semble donc être une protéine clef dans la régulation de l'hypertrophie des cardiomyocytes et un inhibiteur de choix des voies de signalisation pro-hypertrophiques impliquant Ras et la CaN. Notre hypothèse de travail est que l'augmentation de l'expression de Carabine induit par un stimulus hypertrophique de type adrénergique agit comme rétrocontrôle négatif pour freiner le processus d'hypertrophie pathologique.

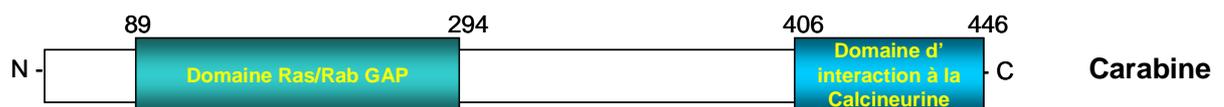


Figure 20 Représentation schématique des domaines de Carabine. Le domaine RasGAP se situe entre les acides aminés 89 et 294, et le domaine d'interaction à la calcineurine se situe du côté C-terminal entre les acides aminés 406 et 446.

2 - Objectifs

Ayant démontré l'existence de Carabine dans le cardiomyocyte, nous avons caractérisé, *in vitro* et *in vivo*, ses effets fonctionnels sur les marqueurs de l'hypertrophie des cardiomyocytes (taille, activité transcriptionnelle de l'ANF, réorganisation des sarcomères). Notre approche est fondée sur la présence de domaines Ras/Rab GAP et de liaison à la CaN au sein de Carabine. Nous avons donc analysé les effets de la modulation de l'expression de Carabine sur l'activité de CaN et ses effecteurs comme le facteur de transcription NFAT dans des cultures primaires de cardiomyocytes de rats nouveau-nés en réponse à une stimulation α_1 -AR ou β -AR/Epac. Dans ce même système cellulaire, nous avons également recherché les interactions potentielles de Carabine avec la voie Ras et MAPK. Enfin, notre effort a porté sur l'identification des mécanismes moléculaires par lesquels Carabine inhibe le facteur de transcription pro-hypertrophique, MEF2.

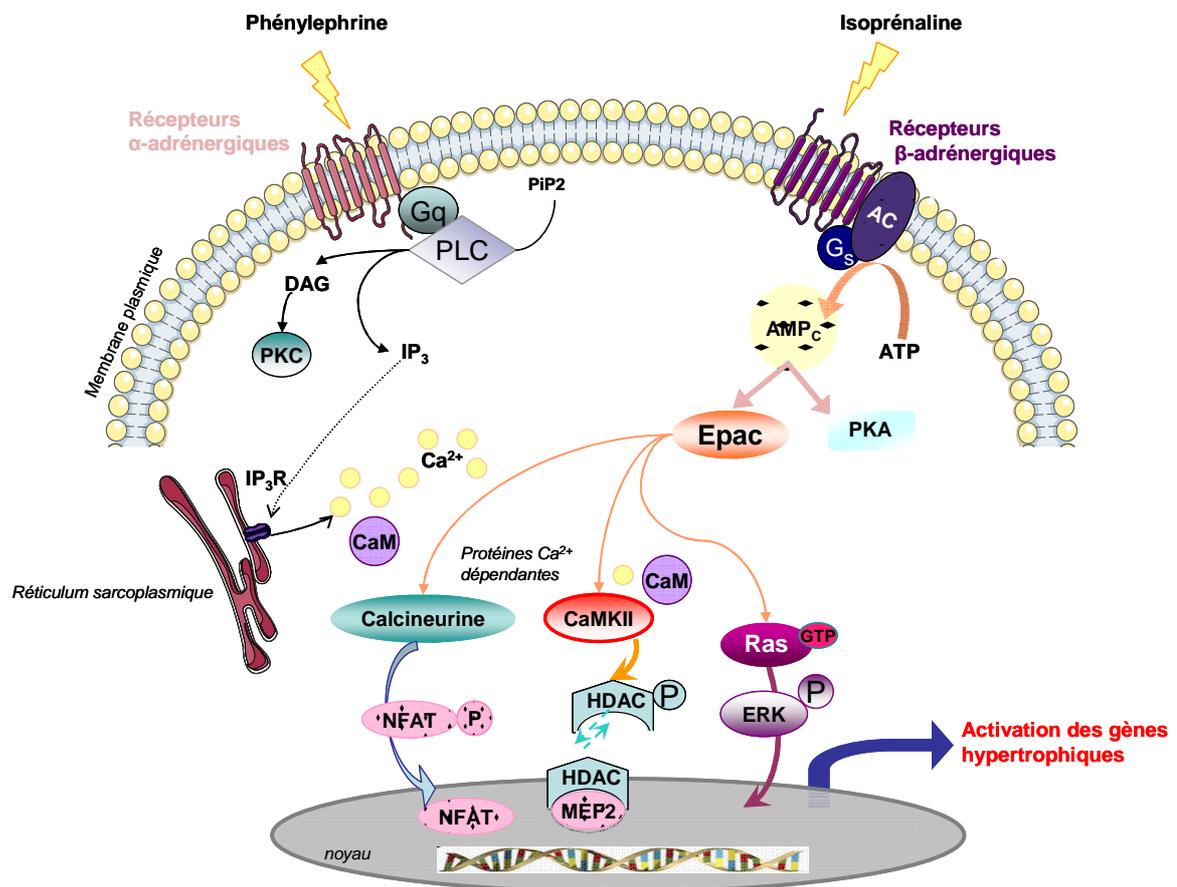


Figure 21 Etude du rôle de Carabine dans l'hypertrophie cardiaque

En réponse à une stimulation adrénergique, les voies de signalisation de CaN, CaMKII et Ras sont activées pour induire un programme pro-hypertrophique. Le but de notre étude est d'analyser les interactions de Carabine avec ces voies de signalisation et d'en analyser leurs effets fonctionnels.

MATERIEL ET METHODES

Matériel et méthodes

I - MATERIEL

1- Substances chimiques et réactifs

L'agoniste β_1/β_2 -adrénergique, isoprénaline (ISO), l'agoniste α_1 -adrénergique, phényléphrine (PE), et l'inhibiteur de la CaN, la cyclosporine A (CsA) proviennent de Sigma-Aldrich chimie. La [^3H]-Leucine provient de Perkin-Elmer. Le 8-CPT (8-(4-chlorophenylthio)-2'-O-methyladenosine-3',5'-cyclic monophosphate), un activateur spécifique d'Epac, provient de Biolog Life Science Institute.

2- Anticorps

2-1 Anticorps primaires

PROTEINE CIBLE	DILUTION	TYPES ET ESPECES	FOURNISSEUR
CARABINE	1/1000 DANS TTBS 0,05% + LAIT 5%	IGG POLYCLONALES DE LAPIN	ABD SEROTEC
C-MYC	1/1000 DANS TTBS 0,05% + LAIT 5%	IGG ₁ MONOCLONALES DE SOURIS	SANTACRUZ BIOTECHNOLOGIES
B-ACTININE- HRP	1/5000 DANS TTBS 0,05% + LAIT 5%	IGG ₁ MONOCLONALES DE SOURIS	SANTACRUZ BIOTECHNOLOGIES
CAMKII	1/1000 DANS TTBS 0,05% + LAIT 5%	IGG POLYCLONALES DE LAPIN (CLONE M-176)	SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGIES
P-CAMKII (THR286)	1/1000 DANS TTBS 0,05% + LAIT 5%	IGG POLYCLONALES DE LAPIN	SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGIES
H-RAS	1/2000 DANS TTBS 0,05%	IGG ₁ MONOCLONALES DE SOURIS (CLONE RAS10)	MILLIPORE
GAPDH-HRP	1/1000 DANS TTBS 0,05%	IGG POLYCLONALES DE CHEVRE	SANTACRUZ BIOTECHNOLOGIES
α-ACTINE	1/5000 DANS TTBS 0,05%	IGG ₁ MONOCLONALES DE SOURIS	SANTACRUZ BIOTECHNOLOGIES
HDAC4	1/500 DANS TTBS 0,05% + LAIT 5%	IGG ₁ MONOCLONALES DE SOURIS	SANTACRUZ BIOTECHNOLOGIES
PHOSPHO ERK1/2	1/1000 DANS TTBS 0,05% + BSA 5%	IGG POLYCLONALES DE LAPIN	CELL SIGNALING
ERK1/2 Tot	1/1000 DANS TTBS 0,05% + BSA 5%	IGG POLYCLONALES DE LAPIN	CELL SIGNALING

2-2 Anticorps secondaires

Anticorps	Dilution	Fournisseur
Anti-lapin couplé à la peroxydase	1/5 000 dans TTBS 0,05%	Santacruz Biotechnologies
Anticorps anti-souris couplé à la peroxydase	1/10 000 dans TTBS 0,05%	GE Healthcare

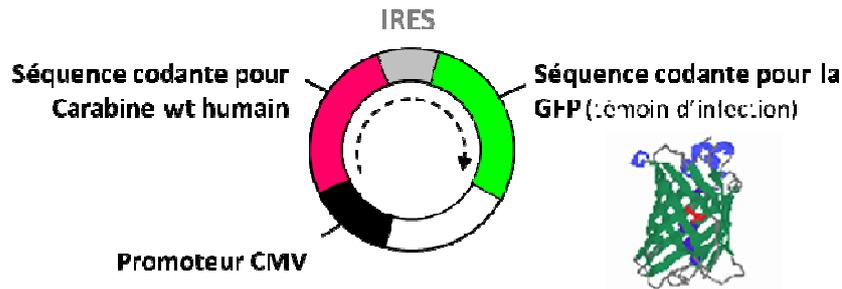
3- Adénovirus

Les constructions adénovirales (Ad.) ont été utilisées pour surexprimer les protéines citées ci-dessous dans les cardiomyocytes de rat nouveaux nés. Ces adénovirus ont été invalidés pour les protéines d'enveloppe E1/E3 afin d'inhiber leur capacité de réplication. La proportion de virus administrés par rapport au nombre de cellules, ou MOI (multiplicity of infection), est indiquée pour chaque construction adénovirale.

Ad. Carabine (MOI 10) : adénovirus Carabine humain sous le contrôle du promoteur fort du cytomégalovirus (CMV). Il contient la séquence codante de la GFP placée en position bicistronique par rapport à celle de Carabine sous le contrôle de la séquence IRES (internal ribosomal entry site), qui est reconnue par les ribosomes et qui permet de traduire la protéine GFP simultanément et indépendamment de la protéine d'intérêt. Le niveau de fluorescence de la GFP permet ainsi de vérifier l'efficacité de l'infection. La séquence plasmidique d'origine a été généreusement donnée par le Dr. J.O.Liu (Université de médecine, Baltimore).

Ad.GFP (MOI 50) : protéine fluorescente verte extraite de l'espèce *Aequoria Victoria*. Il a été amplifié par l'hôpital universitaire de Nantes(France) sur la plateforme de production de vecteurs viraux (Christophe Darmon). L'adénovirus codant pour la GFP seule (Ad.GFP) sert de contrôle.

Adénovirus bicistronique



Traduction de l'ARN messager

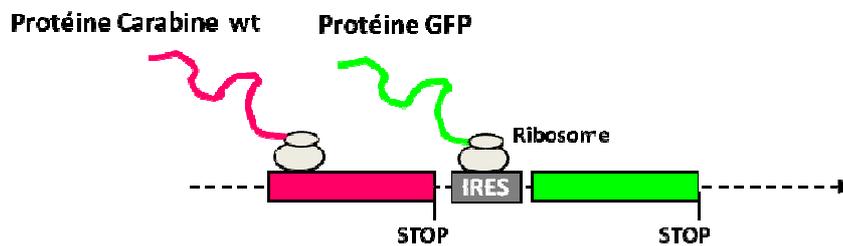


Figure 22 Adénovirus codant pour la forme sauvage de Carabine humaine (Ad.Carabine). L'adénovirus de type cytomégalovirus (CMV), contient la séquence codante pour la forme sauvage de Carabine placée sous un promoteur CMV, ainsi que celle de la GFP placée en aval d'une séquence IRES (Internal Ribosomal Entry Site). Cette séquence est reconnue par les ribosomes et permet de traduire la protéine GFP simultanément et indépendamment de la protéine Carabine.

4- Plasmides

Le plasmide **Carabine** a été généreusement donné par le Dr. J.O Liu (Université de médecine, Baltimore)

Les mutants Carabine : **Carabine**^{R141A} et **Carabine**^{AAVG} ont été générés par mutagenèse dirigée avec le kit : quikchange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) (Figure 23). Le mutant Carabine^{R141A} a été créé en changeant une arginine par une alanine en position 141, dans le domaine Ras Gap. Le mutant Carabine^{AAVG} a été créé en changeant les acides aminés PPIEG par AAVGA, 416 à 420, situé sur le domaine de liaison à la CaN.

L'expression de Carabine dans les cardiomyocytes de rats néonataux a été réprimée à l'aide de plasmide codant pour les ARN Si dirigé contre la séquence (5'-GAGAUGAAAUGGGUAGAAATT-3') des ARNm de Carabine de Rat. La séquence contrôle, Si contrôle (5'-GUGGACCCUGUAGAUGGCGTT-3') et le Si Carabine ont été achetés chez Ambion.

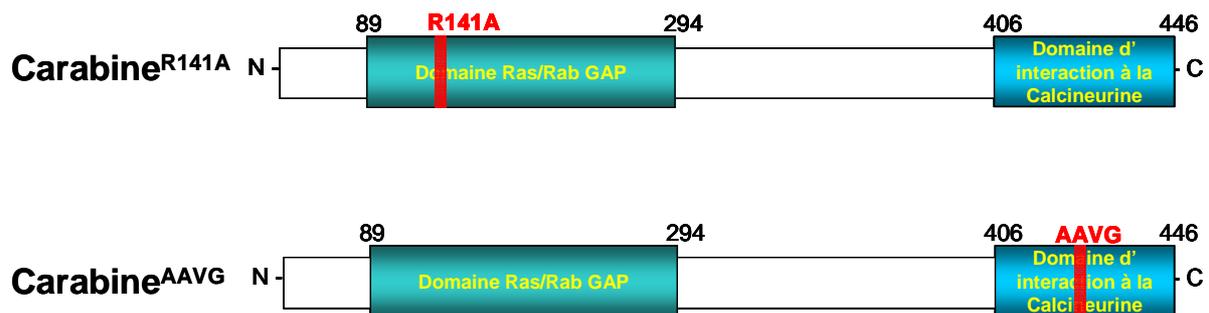


Figure 23 Représentation schématique des mutants de Carabine. Carabine^{R141A} est muté dans son domaine Ras/Rab GAP et Carabine^{AAVG} est muté dans son domaine de liaison à la calcineurine.

Les plasmides rapporteurs contenant l'un le gène de la luciférase placé sous le contrôle de 4 sites de liaisons consensus NFAT (**NFAT-Luc**) a été acheté chez Stratagene et l'autre placé sous le contrôle de 3 sites de liaisons MEF2 (**MEF2-Luc**) a été construit et donnés par le DR. K.C.Wollert (Université médical de Hanovre, Allemagne)

Le plasmide **NFAT-RFP**, (Red Fluorescent Protein), a été donné par le Dr. J. Molkenin (Université de Cincinnati, USA)

L'activité transcriptionnelle de l'ANF dans les cardiomyocytes de rats néonataux a été mesurée à l'aide d'un plasmide contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur de l'ANF (**ANF-Luc**). Ce plasmide a été fourni par le Dr K. Knowlton (Université de Californie, USA).

Le plasmide **CaMKII** et le plasmide **HDAC4-GFP** ont été construits par le Dr.J.Backes (Université d'Heidelberg, Allemagne), et le plasmide **Epac** par le Dr. J.L Bos (Université d'Utrecht, Pays Bas)

Toutes les constructions plasmidiques ont été vérifiées par séquençage d'ADN.

II - INDUCTION DE L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE PAR CONSTRICTION DE L'AORTE ASCENDANTE (TAC) ET INJECTION DES ADENOVIRUS IN VIVO

La constriction aortique de l'aorte a été réalisée sur des rats mâle wistar de 200gr, qui ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale de xylazine (5.5 mg/Kg) et de kétamine (85 mg/Kg). L'aorte ascendante a été partiellement occluse avec un fil de suture (Figure 24). Les animaux contrôles (Sham) ont subi la même procédure opératoire sans pose de fil de suture. Puis, 300 μ L de solution de sérum physiologique contenant les particules virales (3×10^{10}) ont été injectées en deux injections le long de l'artère coronaire antérieure gauche rentrant dans la paroi ventriculaire gauche. Sept jours plus tard, les animaux sont euthanasiés et les cellules isolées. Des cellules exprimant les adénovirus GFP ou non ont été obtenues sur la zone d'injection. Après sept jours de constriction aortique thoracique, le poids du cœur a augmenté d'environ 28 % chez les animaux TAC versus contrôles.

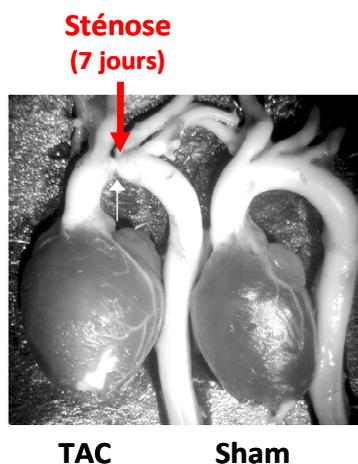


Figure 24. Modèle d'hypertrophie cardiaque induite chez le rat. L'hypertrophie est induite par constriction de l'aorte transverse (TAC), comme indiqué ci-dessus, pendant 7 jours. Des cœurs ayant subi la même opération sans pose du fil de suture (Sham) sont utilisés comme contrôles.

III - CULTURE PRIMAIRES DE CARDIOMYOCYTES

1- Cultures primaires des cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes

1-1 Isolement et culture cellulaire

Les cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes de 200-250g (CVRAs), ont été isolés à partir de cœurs de rats Wistar mâles adultes. Les rats ont été anesthésiés par une injection intra péritonéale de pentobarbital (100 mg/kg). Après la disparition de toute activité réflexe, la cage thoracique des animaux a été ouverte et le cœur rapidement prélevé. Après élimination des morceaux de poumons et de thymus, le cœur a été perfusé pendant 4 min par une solution de lavage (117 mM NaCl, 5.7 mM KCl, 4.4 mM NaHCO₃, 1.5 mM KH₂PO₄, 1.7 mM MgCl₂, (6H₂O), 21 mM Hépès, 11.7 mM glucose, 10 mM créatine, 20 mM taurine, pH 7,1). Le tissu cardiaque a ensuite été digéré pendant 50 minutes par perfusion rétrograde de collagénase A (0.255 U/ml, Boehringer-Mannheim) solubilisée dans la solution de lavage, de l'EGTA à 310 μM et du CaCl₂ à environ 300μM. A la fin de la digestion les oreillettes ont été éliminées, et les ventricules émincés puis filtrés. Les myocytes ventriculaires ainsi récupérés ont été progressivement remis en suspension dans une solution de lavage contenant 1 mM de Ca²⁺.

Les CVRAs ont ensuite été mis en culture dans des boîtes de pétri de 60 mm de diamètre (Nunc) pour les expériences de biologie moléculaire (100 000-300 000 cellules par boîte). Pour une meilleure adhésion des cellules, les boîtes de culture ont été prétraitées par de la laminine à 1 %. Les cardiomyocytes ont d'abord été incubés dans du milieu Eagle's Minimal Essential Medium (MEM-Eagle, Gibco GRL) supplémenté par 5 % de sérum de veau fœtal (SVF), du tampon Hépès à 20 mM (pH 7,6 à 37 °C), et des antibiotiques (pénicilline, streptomycine à 1%). 1h après la mise en culture des cellules, le milieu a été remplacé par un milieu identique ne contenant pas de sérum.

Les cultures cellulaires ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂.

1-2 Stimulation cellulaire

Le lendemain de l'isolation des cellules, les milieux des cardiomyocytes étaient remplacés par du milieu en présence des différents réactifs pour les stimulations chroniques (48h). Les cultures cellulaires ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂.

2- Cultures primaires des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveaux nés

2-2 Isolement cellulaire

Les cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveaux nés (CVRNs) ont été isolés à partir de cœurs de rats Wistar âgés de un jour. Après prélèvement des cœurs et élimination des oreillettes, les tissus ventriculaires ont été digérés par une solution enzymatique contenant de la collagénase A (Boehringer, env. 0,255 U/mg) et de la pancréatine (0,5 mg/ml, Sigma Aldrich) diluées dans un tampon ADS (1.16 M NaCl, 200 mM Hépès, 10 mM NaH₂PO₄, 55.5 mM glucose, 3.4 mM KCl, 8.3 mM MgSO₄, pH 7.35). Afin d'optimiser l'extraction, les tissus ont été finement découpés puis ont été incubés avec la solution enzymatique pendant 20 min à 37°C. La suspension cellulaire a ensuite été centrifugée 6 min à 1500 rpm. Après élimination du surnageant, les culots ont été remis en suspension dans du sérum de veau nouveau-né. L'ensemble de ces opérations a été renouvelé 4-5 fois. Les cardiomyocytes contenus dans les différentes fractions ainsi obtenues, ont été isolés à l'aide d'un gradient de Percoll (Sigma Aldrich) après 30 min de centrifugation à 3000 rpm. Les cardiomyocytes ont ensuite été mis en culture dans des boîtes de pétri de 60 mm de diamètre pour les Western blot (1,5 à 2 millions de cellules par boîte), des boîtes 24 puits pour les tests luciférase (300 000 cellules par puits), ou des Labtech pour l'immunofluorescence (300 000 cellules par puits), préalablement tapissées par de la gélatine (Sigma) diluée à 0,1% dans du PBS. Les cellules ont été maintenues dans du milieu Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco GRL) et du milieu 199 supplémentés par 10 % de sérum de cheval, 5 % de sérum de veau nouveau né, 1 % de glutamine et des antibiotiques (pénicilline, streptomycine à 1%). Les cultures cellulaires sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂. Le lendemain, les cellules ont été cultivées dans le même milieu en l'absence de sérum.

2-3 Transfection transitoire et stimulation cellulaire

Une transfection optimum est obtenue lorsque les cellules sont à 50-70% de confluence. Ainsi, 12h après l'isolement, les cardiomyocytes ont été transfectés avec 4µg (boîtes de 6cm de diamètre) ou 1 µg (boîtes 24 puits et Labtech) de plasmide. Les transfections ont été réalisées à l'aide d'un polymère cationique, la Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Ce polymère est caractérisé par une tête polaire chargée positivement et d'une queue hydrophobe. Une fois en solution, ces polymères forment des liposomes dont la surface formée par les têtes polaires et chargée positivement s'associe à l'ADN plasmidique. Les complexes ADN-liposomes sont internalisés par les cellules. L'acidification des vésicules d'endosomes libère l'ADN plasmidique dans le cytosol.

Les plasmides et la Lipofectamine (2 µl de Lipofectamine pour 1 µg d'ADN) ont été dilués séparément dans du milieu Optimem (Gibco GRL). Après 5 min, le milieu contenant la Lipofectamine a été ajouté à celui contenant les plasmides, puis a été incubé à température ambiante pendant 20 min. Les cardiomyocytes ont ensuite été incubés pendant 4h à 37°C avec le milieu de transfection ainsi obtenu. Ce milieu a ensuite été remplacé par du milieu de culture sans serum et les cellules ont été incubées pendant 48h pour permettre une expression optimale des protéines. Le lendemain, les cellules ont été incubées à 37°C en présence des différentes substances chimiques stimulantes pendant le temps désiré dans du milieu dépourvu de sérum.

IV - METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET DE BIOCHIMIE

1- Lyse cellulaire

Les cellules ont été lysées mécaniquement dans 150 µl de tampon (20mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 0.5% Nonidet P40, 0.5mM EDTA, 1 mM phénylméthylsulphonyl fluoride (PMSF), 10 µg/ml leupeptine, 10 µg/ml aprotinine) pour les westerns blot Carabine. Pour les westerns blot ERK, les cellules ont été lysées mécaniquement dans 100 µL de tampon de lyse (50mM Hépès, 0.5% Nonidet P40, 250mM NaCl, 10% glycérol, 2mM EDTA, un cocktail d'inhibiteur de protéase et phosphatase (Phosphostop et complete mini-EDTA, Roche®)). Pour les pull down, les cellules ont été lysées mécaniquement dans 250 µl de tampon (10 mM Tris-HCL pH 8.0, 60mM N-octyl glucoside, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 5 mM EDTA, un cocktail d'inhibiteur de protéase et phosphatase (Phosphostop et complete mini-EDTA, Roche®)). Afin d'optimiser la lyse cellulaire, les échantillons ont été incubés 10 min à 4°C. Enfin, les lysats cellulaires ont été centrifugés à 15 000 g pendant 20 min à 4°C et les surnageants ont été conservés à -80°C.

2- Dosage protéique

La concentration en protéine des surnageants a été déterminée par la technique colorimétrique utilisant de l'acide bicinchoninique à 98% et du sulfate de cuivre II à 2% (Sigma Aldrich). Les ions cuivriques Cu^{2+} sont réduits en ions cuivreux Cu^+ par les protéines et forment avec l'acide bicinchoninique un complexe pourpre dont l'absorbance à 560 nm est proportionnelle à la quantité de protéine. Leur concentration est déterminée par rapport à une gamme de BSA (sérum albumine bovine).

3- Précipitation par affinité de Ras-GTP

Cette technique permet de mettre en évidence l'activation de la petite protéine Ras. La technique repose sur la capacité de la forme active de Ras (Ras-GTP) à lier le domaine RBD de son effecteur Raf1 (Raf1(RBD)). La méthode consiste à précipiter Ras-GTP à l'aide de billes de sépharose/glutathion sur lesquelles sont greffées des protéines de fusion contenant le domaine Raf1(RBD) et la glutathion S transférase (GST) (Figure 25).

3-1 Préparation des protéines de fusion Raf1(RBD)-GST

Des bactéries HB101 transformées par le plasmide PGEX2T (Amersham Pharmacia Biotech) Raf1(RBD)-GST, ont été cultivées à 37°C dans du milieu L Broth (10g/L tryptone, 5g/L Yeast extract, 5g/L NaCl) en présence de 100µg/ml d'ampicilline jusqu'à ce que la densité optique de la culture bactérienne à 600 nm atteigne une valeur de 0,6. La synthèse protéique a été induite pendant 4h par ajout d'iso-propyl-thio-galactopyrannoside (IPTG, 1mM). Après centrifugation à 3500 g pendant 15 min à 4°C, le culot bactérien a été lysé par sonication dans un tampon de lyse (20 % sucrose, 10 % glycérol, 50 mM tris pH 7.5, 2 mM MgCl₂, 0.2 M Na₂S₂O₅, 2mM dithiothreitol (DTT), 1mM PMSF, 10 µg/ml aprotinine et leupeptine). Après centrifugation à 15000 g pendant 20 min à 4°C les surnageants contenant la protéine de fusion ont été congelés à -80°C. La pureté de la préparation a été évaluée par électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide après coloration du gel au bleu de Coomassie.

3-2 Couplage de la protéine de fusion à des billes de glutathion

Les lysats bactériens contenant les protéines Raf1(RBD)-GST ont été incubés pendant 1h à 4°C avec des billes de sépharose couplées au glutathion réduit. L'enzyme GST reconnaît le glutathion avec un haut degré d'affinité, permettant ainsi la fixation de la protéine de fusion aux billes de sépharose. Après centrifugation à 5000 g pendant 1 min, les culots sont lavés dans un tampon contenant (10 mM Tris-HCL pH 8.0, 60mM N-octyl glucoside, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 5 mM EDTA, 1 mM sodium ortovanadate, 1 mM phénylméthylsulphonyl fluoride(PMSF), 10 µg/ml leupeptine, 10 µg/ml aprotinine)

3-3 Précipitation par affinité de Ras-GTP

30 µl de billes/Raf1(RBD)-GST ont ensuite été incubés 1h à 4°C avec 250 µg de protéines obtenues après traitement et lyse des cardiomyocytes. Après lavage et centrifugation, le complexe Ras-GTP/Raf1(RBD)-GST/billes ont été repris dans 35 µl de tampon de charge puis ont été dissociés par 10 min de chauffage à 100°C. Parallèlement, 20 µg de lysats cellulaires bruts n'ayant pas subi de précipitation par affinité (lysats totaux) ont été dilués 2 fois dans du tampon de charge. Ceux-ci contiennent les petites protéines G sous leur forme active (liée au GTP) et inactive (liée au GDP). Ils permettent de comparer le niveau d'activation de Ras de chaque puits en s'assurant que leur niveau d'expression est identique dans chaque échantillon cellulaire. Les protéines sont ensuite révélées par la technique de Western blot.

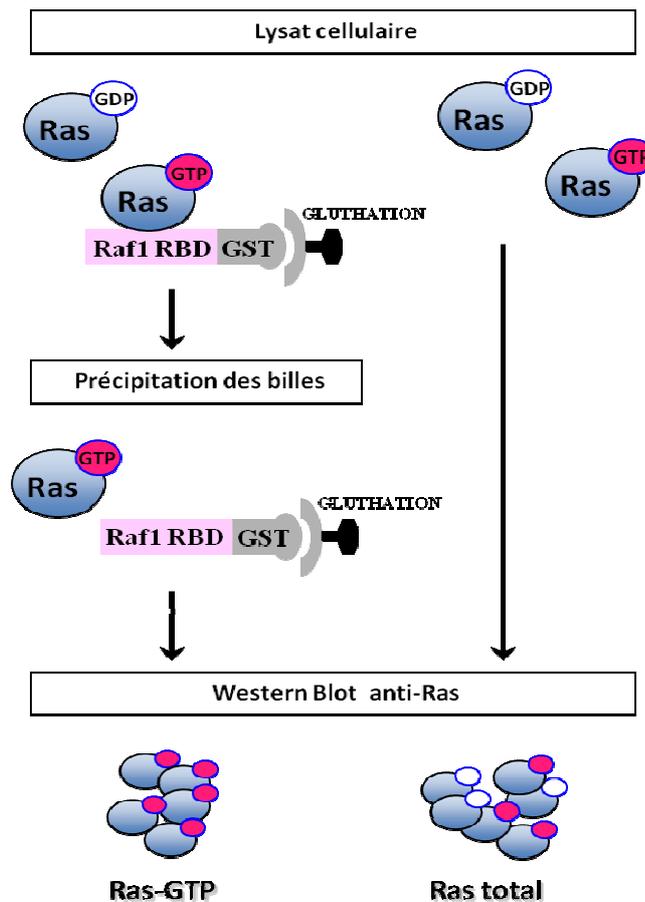


Figure 25 Schéma représentant la technique de précipitation par affinité des petites protéines G, exemple de Ras. Cette technique permet de mettre en évidence l'activation des petites protéines G. Dans le cas de Ras, la technique repose sur la capacité de la forme active de Ras (Ras-GTP) à lier le domaine RBD de son effecteur Raf1 RBD (Raf1(RBD)). Le lysat cellulaire est incubé avec des billes de sépharose/glutathion sur lesquelles sont greffées des protéines contenant le domaine Raf1(RBD) fusionné à la glutathion S transférase (GST). Les billes, sur lesquelles est fixé Ras-GTP, sont ensuite précipitées par centrifugation. Ras-GTP est ensuite révélé par Western Blot. Un second immunoblot est réalisé à partir du lysat cellulaire non précipité (incluant les formes actives et inactives de Ras).

4- Translocation HDAC

La séparation de la fraction cytosolique et nucléaire permet de quantifier la translocation de HDAC. Les cellules ont été prélevées dans du PBS froid. Après une centrifugation de 5000 rpm pendant 2 minutes, les cellules sont lysées sur la glace, dans un tampon hypotonique (Hépès 20mM, pH 7,5 ; NaCl 10mM, et un cocktail d'inhibiteurs de protéases et phosphatases de chez Roche®), additionné de 10% de Nonidet P40. Après une centrifugation (2500 rpm, 2 min à 4°C), le supernageant, contenant la fraction cytosolique, est récupéré. Le culot est resuspendu dans un tampon hypertonique (Hépès, 20mM, pH7.5 ; NaCl 400mM, et un cocktail d'inhibiteurs de protéases et phosphatases de chez Roche®) et laissé 15min sur la glace. Après une dernière centrifugation (10 000rpm, 10 min à 4°C), le supernageant, contenant la fraction nucléaire, est récupéré. La concentration des protéines des deux fractions est déterminée par le kit iNtRON Biotechnology assay Reagent kit. 15 µg des protéines totales sont chauffées à 95°C pendant 10 min, sont mis dans du tampon de charge de Laemmli et fait migré sur gel SDS-PAGE, comme décrit ci-dessous.

5- Western blot

Cette technique permet de mettre en évidence une protéine spécifique au sein d'un lysat cellulaire. Elle inclut une étape d'électrophorèse permettant de séparer les protéines selon leur poids moléculaire, une étape de transfert afin de rendre les protéines accessible à la détection par des anticorps spécifiques, et enfin une étape de révélation.

Les protéines ont d'abord été séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide. Les échantillons ont été dilués au demi dans du tampon de charge de Laemmli (125 mM Tris, 10 % glycérol, 0,001 % bleu de bromophénol, 2 % SDS, 5 % β-mercaptoéthanol, un agent réducteur des ponts disulfure qui facilite la dénaturation), puis ont été incubés 5 min à 100°C. Les protéines ont ainsi été dénaturées et chargées négativement par le sodium dodécyl sulfate (SDS). Dans le cas des pull down Ras ou du western blot phospho-ERK, les échantillons sont chauffés 5min à 95°C. Pour les westerns blot Carabine, ils ne sont pas chauffés.

5-1 Electrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

Les échantillons ont ensuite été déposés dans un gel d'électrophorèse contenant un premier gel de tassement à 5 % d'acrylamide (5% polyacrylamide (acrylamide/bis acrylamide 30/0,8), 0.125 mM Tris pH 6.8, 0.1 % SDS, 0.1 % ammonium persulfate, 0.001 % Temed), et un second gel de séparation à 10% (pour le western blot Carabine) ou 15 % (pour le pull down Ras) d'acrylamide (10% -15% polyacrylamide, 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.05% persulfate d'ammonium et 0.001% de Temed)). L'ensemble a été immergé dans un tampon de migration (25 mM Tris, 200 mM Glycine, 0,1 % SDS). Les échantillons ont été concentrés dans le premier gel de concentration sous l'action d'un champ électrique de 80 volts pendant 30 min, puis ont été séparés dans le second gel sous l'action d'un champ électrique de 110 V pendant 1h30.

5-2 Transfert des protéines sur membrane.

En fin d'électrophorèse, les protéines ont été transférées du gel de polyacrylamide vers une membrane de PVDF (polyvinylidène difluoride, Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotechnologies) pendant 2H à 4°C sous l'action d'un champ électrique de 120 volts. La membrane a été préalablement activée par du méthanol et équilibrée par du tampon de transfert (40mM Glycine, 25mM Tris, 20% Méthanol). Cette étape permet de charger la membrane positivement afin qu'elle retienne les protéines (chargées négativement). Le gel d'électrophorèse et les membranes PVDF ont été placés dans une cassette de transfert comme indiqué sur le schéma ci-dessous (Figure 26)

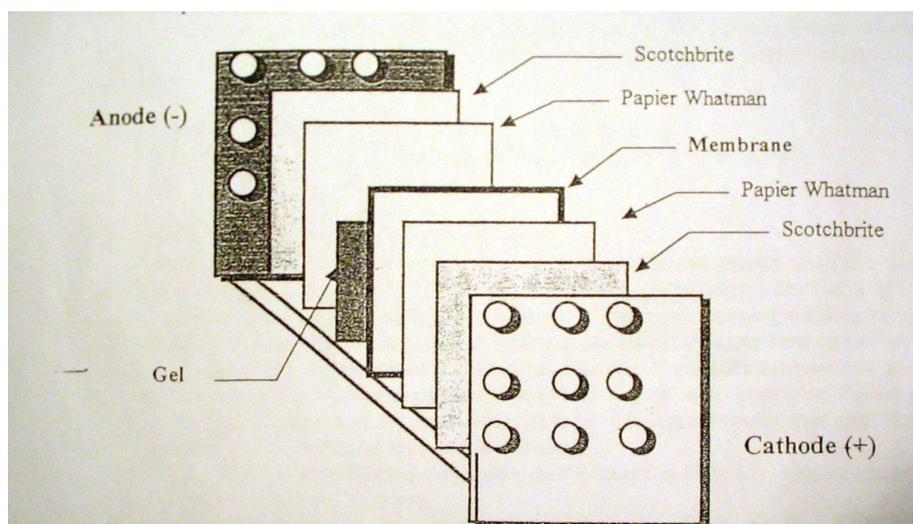


Figure 26 Schéma de montage de la cassette de transfert pour le Western Blot.

5-3 Immunomarquage

Les sites de liaisons non spécifiques des anticorps ont été saturés par incubation des membranes pendant 1h dans du tampon 0,5% TTBS (25 mM Tris, 140 mM NaCl, 3 mM KCL, 0.5 % de Tween-20) contenant 5% de lait. Les membranes ont ensuite été incubées 1h à température ambiante avec l'anticorps primaire dirigé spécifiquement contre la protéine d'intérêt puis 1h avec un anticorps secondaire couplé à une enzyme, la Horse Radish Peroxydase (HRP). Entre chaque étape, les membranes ont été lavées avec du 0,5% TTBS pendant 15 min, puis 3 fois pendant 5 min.

5-4 Révélation

Les protéines d'intérêt ont été mises en évidence grâce aux anticorps par chimioluminescence. La réaction est accompagnée d'une émission de lumière à 528nm. Les membranes ont été incubées pendant 5 min avec le substrat de la peroxydase (kit SuperSignal West Dura ou Femto extended duration substrate, Thermo Scientific). Le substrat est oxydé par l'enzyme et émet un signal lumineux qui est visible par caméra CCD (ChemiDoc XRS+, Bio-rad). Après révélation, le signal a été quantifié par densitométrie à l'aide du logiciel Quantity One (Biorad). Ce signal est (semi-)proportionnel à la quantité de protéine.

6- Incorporation de [³H]-leucine

La synthèse protéique, qui est un marqueur de l'HC, a été évaluée en incubant les CVRN (cardiomyocyte ventriculaire de rats nouveaux nés) avec de la leucine marquée au tritium (³H]-Leucine). La synthèse protéique est ainsi déterminée en mesurant la quantité de [³H]-Leucine incorporée dans les protéines néosynthétisées. Les CVRNs ont été incubés pendant 24h dans le milieu de culture contenant de la [³H]-Leucine (1 µCi/ml) en présence d'adénovirus Carabine ou GFP et/ou sous stimulation PE (10µM) dans du milieu sans sérum. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS froid afin d'éliminer la [³H]-Leucine libre, puis ont été incubées pendant 1 heure à 4°C avec de l'acide trichloroacétique 5% pour précipiter les protéines. Les précipités ont été lavés deux fois à l'eau froide, puis ont été resuspendus dans 0.1N NaOH, 0.1% triton pendant 1h. Après grattage, les lysats obtenus ont été mélangés avec 4 ml de liquide scintillant (Perkin Elmer). La radioactivité a été analysée à l'aide d'un compteur à scintillation (Beckman, France).

7- Tests d'activité enzymatique

7-1 Activité Calcineurine

L'activité phosphatase de la CaN dans les lysats cellulaires a été mesurée à l'aide du kit Calcineurin Cellular Activity Assay de Calbiochem (Ref. 207007). Les cellules ont été lysées dans un tampon contenant 50 mM Tris, 1 mM DTT, 100 μ M EDTA, 100 μ M EGTA, 0.2% NP-40, pH 7,5. Les lysats ont ensuite été ultracentrifugés à 100 000 g pendant 45 min à 4°C. Les surnageants ont été récupérés et filtrés à travers des colonnes contenant une résine P6 DG de dessalage afin d'éliminer les phosphates et les nucléotides libres. L'activité phosphatase de la CaN a été déterminée en mesurant les phosphates libérés par la déphosphorylation du substrat spécifique de la CaN, le RII-phosphopeptide (Asp-Leu-Asp-Val-Pro-Ile-Pro-Gly-Arg-Phe-Asp-Arg-Arg-Val-pSer-Val-Ala-Ala-Glu). Les extraits (10 μ g de protéines) ont été incubés pendant 2 min dans 50 μ l de tampon (100 mM NaCl, 50 mM Tris, 6 mM MgCl₂, 0,5 mM CaCl₂, 0,5 mM DTT, 0.025% NP-40, pH 7.5) contenant 750 μ M RII-phosphopeptide, 0,5 μ M acide okadaïque (inhibiteur PP1 et PP2A), et 250 μ M calmoduline ou 10 mM EGTA. Dans le contrôle (blanc), il n'y a pas de RII phosphopeptide. La quantité de phosphates libérés a été quantifiée par colorimétrie, en mesurant l'intensité du signal obtenu à 620nm à l'aide d'un lecteur de plaque (Benchmark plus, Bio-Rad). Le tampon EGTA représente l'activité totale phosphatase moins celle de la CaN (donc l'activité totale moins PP-1, PP-2A et PP-2B). L'acide okadaïque (OA) inhibe l'activité phosphatase de PP-1 et PP-2A sans inhiber celle de la CaN (donc l'activité totale moins PP-1 et PP-2A). L'activité réelle de la CaN dans les extraits cellulaires correspond à l'acide okadaïque moins l'acide okadaïque plus l'EGTA (CaN = OA - (OA+EGTA)).

	H2O	Tampon + CaM	Tampon + EGTA	OA	Tampon + RII phosphopeptide	Extrait cellulaire
Blanc	20 µl	25 µl	0 µl	0 µl	0 µl	5 µl
OA	5 µl	25 µl	0 µl	5 µl	10 µl	5 µl
OA+EGTA	5 µl	0 µl	25 µl	5 µl	10 µl	5 µl
Contrôle positif	10 µl	25 µl	0 µl	0 µl	10 µl	5 µl d'enzyme CaN

Tableau 4 Test d'activité de la calcineurine.

Tableau représentant les différents milieux de réaction permettant de mesurer l'activité calcineurine dans les extraits cellulaires. L'activité de cette phosphatase est mesurée *in vitro* en déterminant la quantité de phosphates libérés par la déphosphorylation du substrat RII-phosphopeptide par la calcineurine en présence (activité totale) ou en l'absence (activité EGTA) de Ca^{2+} et de calmoduline. L'activité de la CaN = OA-(OA+EGTA)

7-2 Activité CaMKII

L'activité de la CaMKII a été évaluée en mesurant l'autophosphorylation de la thréonine 286 de la CaMKII par Western blot, après immunoprécipitation de la CaMKII. Les lysats cellulaires ont été prélevés avec 20 µl de billes d'agarose nues afin d'éliminer les protéines pouvant se lier de manière non spécifique aux billes d'agarose. Après élimination des billes par une centrifugation de 2 min à 5000g, les lysats ont été incubés pendant 1h30 à 4°C avec l'anticorps anti-CaMKII (2 µg/µl). Un contrôle a été réalisé en incubant les anticorps avec du tampon de lyse afin de déterminer les bandes non spécifiques correspondant aux IgG. Les complexes protéiques formés par la CaMKII et les anticorps ont été récupérés en incubant les lysats pendant 2h à 4°C avec des billes d'agarose couplées à des protéines G qui reconnaissent la partie Fc des anticorps anti-CaMKII. Le complexe protéine – anticorps – bille a été récupéré par centrifugation, et a été lavé 3 fois avec le tampon de lyse. Les billes ont ensuite été reprises dans 25µl de tampon Laemmli, puis ont été chauffées 5min à 95°C. Le surnageant a été récupéré et l'activité de la CaMKII a été déterminée en réalisant un Western blot anti-phospho-CaMKII (Thr 286) selon le protocole décrit précédemment. Un second immunoblot anti-CaMKII a été réalisé afin d'évaluer la quantité de CaMKII totale dans les échantillons.

7-3 Activité Luciférase

L'activité transcriptionnelle de l'ANF dans les cardiomyocytes néonataux, qui est un marqueur d'HC, et les activités transcriptionnelles de NFAT, cible de la calcineurine et MEF-2, cible de la CaMKII ont été déterminées à l'aide du gène rapporteur de la luciférase (Cf. chapitre du matériel, paragraphe plasmides). La luciférase est une enzyme bioluminescente, qui en s'oxydant émet des photons. L'activité de la luciférase a été déterminée à l'aide du kit Promega (Luciferase assay system). Les cellules préalablement transfectées avec le gène rapporteur de la luciférase, ont été lysées avec un tampon contenant 20mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 0.5% Nonidet P40, 0.5mM EDTA, 1 mM phénylméthylsulphonyl fluoride (PMSF), 10 µg/ml leupeptine, 10 µg/ml aprotinine, et des inhibiteurs de protéases. La fraction insoluble de chaque extrait a été éliminée par centrifugation à 12 000g pendant 2 min. 25 µl de surnageant ont été prélevés, puis ont été incubés pendant 10 sec avec le substrat de la luciférase, la luciférine, en présence d'ATP, de Mg²⁺ et d'O₂. La quantité de photons libérés suite à l'oxydation de la luciférine par la luciférase présente dans les extraits cellulaires, a été analysée par luminométrie sur un TECAN infinite F500® avec un délai d'acquisition du signal de deux secondes et un temps d'acquisition du signal de dix secondes.

V - METHODES DE MICROSCOPIE

1- Immunomarquage

Les cellules ont été fixées par 4 % de paraformaldéhyde (PFA), qui stabilise les membranes, pendant 5 min à température ambiante puis ont été rincées dans du PBS (Phosphate-buffered saline) (Gibco).

L'organisation des structures sarcomériques a été visualisée après marquage de l' α -actinine des disques Z. Les cellules ont été perméabilisées par du Triton-X100 à 0,1 % pendant 5 minutes, suivi de deux rinçages au PBS. Les sites de liaisons non spécifiques des anticorps ont été bloqués pendant 1h à température ambiante par du PBS contenant 3 % de BSA. Les cellules ont ensuite été incubées avec l'anticorps anti- α -actine (monoclonal, clone EA-53, 1 :300, Sigma Aldrich), ou l'anti-myc (monoclonal, 1 :200 Santa Cruz) pendant 1heure à température ambiante. Après lavage au PBS, les cellules ont été incubées avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor®488 ou l'Alexa Fluor®633 (1 :200) pendant 1 heure.

Après traitement les cellules ont été rincées puis montées sur lamelles avec le milieu de montage VECTASHIELD® (Vector Laboratories). L'organisation des structures sarcomériques a été visualisée après marquage de l' α -actinine des disques Z.

Les expériences de translocation ont été réalisées pour NFAT dans des cardiomyocytes et pour HDAC dans des cellules de lignées COS-7 (CV-1 in Origin and carrying SV-40), dérivent de cellules de reins de singe africain. Après 24 heures de culture, les cellules ont été préalablement transfectées avec les plasmides NFAT ou HDAC4-GFP et avec le plasmide contrôle ou cMyc-Carabine. Deux jours après leur transfection elles ont été stimulées à la PE (10 μ M). Le protocole d'immunomarquage est le même que celui décrit précédemment. La présence de la localisation de ces plasmides est mise en évidence par leurs tags (HA ou myc). L'anticorps secondaire utilisé est couplé à l'Alexa Fluor®633.

2- Acquisition d'images

Les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope confocal (Carl Zeiss LSM 510) après excitation de la GFP à 488 nm, et de l'Alexa fluor à 543 nm. Les images obtenues ont été analysées avec le logiciel LSM browser. Pour chaque condition, la taille des CVRNs a été analysée sur environ 300 cellules issues de 5-6 expériences différentes et a été déterminé par planimétrie sur le logiciel LSM Image Browser de Zeiss.

VI - ANALYSES STATISTIQUES

Les données ont été comparées deux à deux à l'aide d'un test t de Student bilatéral, variance inégale à deux exemples. Pour les tests luciférases, les données ont été comparées à l'aide d'un test anova, oneway, avec l'intervalle de Bonferroni. Les étoiles représentent les différences significatives avec $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) ou $p < 0,001$ (***) d'une condition stimulée avec sa condition correspondante non stimulée. # correspond à la comparaison avec le contrôle non stimulé.

RESULTATS

La protéine Carabine inhibe les voies pro hypertrophiques de la CaN, Ras et la CaMKII dans des cardiomyocytes de rats

I - position du problème

Les voies des récepteurs α et β -ARs régulent la contraction cardiaque, mais une stimulation à long terme de ces récepteurs est délétère et conduit à une HC, une dysfonction ventriculaire gauche, pouvant aboutir à l'IC, un risque majeur de morbidité et mortalité dans les pays industrialisés. En effet, l'activation des récepteurs β -ARs module la concentration de l'AMPc qui régule des protéines pro-hypertrophiques comme la PKA ou Epac. Le GEF Epac conduit notamment à l'activation des protéines Ras, CaMKII et CaN (Métrich et al., 2008 ; Métrich et al., 2010). Ras activée induit l'HC *in vitro* et *in vivo* (Thorburn et al., 1993 ; Zheng et al., 2004) Les protéines dépendantes du calcium : la CaN et la CaMKII sont aussi fortement impliquées dans ces processus de remodelage cardiaque. Ainsi les souris transgéniques exprimant la forme constitutivement active de la CaN ou celles surexprimant la CaMKII δ_C développent une hypertrophie cardiaque (Molkentin et al., 1998 ; Zhang et al., 2003). Classiquement la phosphatase CaN déphosphoryle le facteur de transcription NFAT tandis que la CaMKII active le facteur de transcription MEF2, tous deux capable d'activer les gènes pro-hypertrophiques. Comme nous l'avons vu précédemment dans l'introduction, il existe plusieurs protéines régulatrices de ces voies de signalisation. Nous avons donc cherché à mieux comprendre les effets de Carabine sur ces voies de signalisation.

A ce jour, la protéine Carabine, découverte récemment dans le système immunitaire a été peu étudiée et aucune recherche n'a encore été réalisé dans les cellules cardiaques. Pourtant, cette protéine possède des interactions avec des protéines d'intérêts dans l'HC puisqu'elle présente un domaine d'interaction avec la CaN et un domaine Ras GAP, suggérant des effets inhibiteurs sur le remodelage et les voies de signalisations cardiaques. Le but de cette étude est donc d'étudier les effets fonctionnels de Carabine sur les marqueurs de l'hypertrophie des cardiomyocytes et sa modulation des voies de signalisations induit par des stimulations α et β -ARs.

Dans un premier temps, nous avons déterminé par western blot la présence de la protéine Carabine dans les cardiomyocytes de rats. Nous nous sommes ensuite intéressés aux effets fonctionnels de cette protéine sur l'hypertrophie et le remodelage cardiaque (taille des cardiomyocytes, réorganisation des sarcomères, réexpression des gènes fœtaux), en injectant de l'adénovirus Carabine dans des cœurs de rats sténosés et en surexprimant cette protéine dans de cardiomyocytes de rats nouveaux nés en culture. Puis, nous avons caractérisé les voies de signalisation associées à Carabine dans l'HC. Nous avons donc étudié son activité sur la CaN, ainsi que son action en aval sur le facteur de transcription NFAT en évaluant sa translocation et son activité transcriptionnelle sous stimulation des récepteurs α -ARs. Puis nous avons analysé son interaction avec la protéine Ras par immunoprecipitation (IP), ainsi que son action sur l'activité de Ras par pull down. Par western blot, nous avons approfondi ses effets sur un des effecteurs de Ras : ERK1/2. Enfin, nous avons analysé les effets de Carabine sur l'activité de la CaMKII, la translocation de HDAC et l'activité transcriptionnelle de MEF2. Pour finir, nous avons étudié les effets de Carabine lors de l'hypertrophie des cardiomyocytes induite par Epac.

II – Résultats

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article suivant :

Carabin inhibits cardiac myocyte hypertrophy through a calcineurin, Ras and CaMKII dependent signaling pathway ; Berthouze*, Breckler*, Laurent, Varin, Lucas, Bissierier, Deloménie, Lacampagne, Cazorla, Crozatier, Morel, Lezoualc'h.

* co-premier auteur

Soumis à Circulation

III - Conclusion

III-1 Présence de la protéine Carabine dans les cardiomyocytes et son effet sur la croissance cellulaire

Cette étude montre pour la première fois que Carabine est bien présente dans les cardiomyocytes de rats nouveaux nés et adultes. De plus, sous stimulations des récepteurs α et β -ARs, qui induisent la croissance cellulaire, il est intéressant de noter que l'expression de Carabine augmente, suggérant que lors de la mise en place de l'hypertrophie cardiaque, l'augmentation de l'expression de Carabine modulerait la croissance cardiaque. En effet, sur des cardiomyocytes isolées activées à la PE, la surface cellulaire mesurée par planimétrie, augmente chez les contrôles mais pas sur les cardiomyocytes surexprimant Carabine. La protéine Carabine inhibe donc la croissance des cardiomyocytes sous stimulation des récepteurs α -ARs, *in vitro*. Pour tester son rôle fonctionnel *in vivo*, nous avons injecté l'adénovirus Carabine dans des cœurs de rats sténosés, pour surexprimer la protéine dans un modèle d'étude d'HC. Après 7 jours de sténose, les cardiomyocytes sont isolées. La taille des cardiomyocytes de rats sténosés qui surexpriment Carabine est plus réduite par rapport aux cardiomyocytes contrôles infectés à la GFP. La protéine Carabine est donc capable d'inhiber la croissance cellulaire *in vitro* et *in vivo*.

III-2 Les effets anti-hypertrophiques de la protéine Carabine sur le remodelage cardiaque

Carabine étant à la fois exprimée dans les cardiomyocytes et en plus capable d'inhiber la croissance cellulaire lors de stimuli hypertrophique, nous nous sommes intéressés à son rôle fonctionnel sur le remodelage cardiaque, en évaluant la réorganisation des protéines contractiles et la réexpression des gènes fœtaux, deux marqueurs de l'HC. Ainsi, dans les cardiomyocytes, l'activation des récepteurs α -ARs induit une réorganisation de nouveaux sarcomères qui n'apparaît pas dans ceux surexprimant Carabine. Carabine inhibe donc le remodelage des protéines contractiles. De plus, l'activité transcriptionnelle de l'ANF augmente dans les cardiomyocytes dont les récepteurs α -ARs sont activés, alors que dans ceux surexprimant Carabine, l'activité transcriptionnelle de l'ANF diminue. A l'inverse, une

inhibition de la protéine Carabine par transfection d'un siARN Carabine, augmente l'activité transcriptionnelle sous activation des récepteurs α -ARs comparés aux cellules transfectées par le siARN contrôle. Carabine a donc également un effet sur la réexpression des gènes fœtaux. *In vitro*, Carabine inhibe le remodelage cardiaque et a donc un rôle anti-hypertrophique.

III-3 La protéine Carabine inhibe les voies Ras, CaN et CaMKII

Nous avons ensuite analysé les voies de signalisations dans lesquelles Carabine est impliquée. En s'intéressant tout d'abord au domaine de liaison à la CaN que Carabine possède, nous avons déterminé l'inhibition de l'activité de cette phosphatase, par test enzymatique. Puis, nous avons confirmé ce résultat grâce au facteur de transcription NFAT, qui dephosphorylé par la CaN, transloque au noyau. La surexpression de la protéine Carabine dans les cardiomyocytes de rats nouveaux nés inhibe la translocation et l'activité transcriptionnelle de NFAT lors de stimulation des récepteurs α -ARs. Carabine possédant également un domaine RasGAP, nous avons examiné l'activité de Ras par pull down, sur des cardiomyocytes surexprimant Carabine. L'activité de Ras est bien diminuée par Carabine. De plus, nous avons observé par IP, que Carabine se lie directement à Ras. Enfin, nous avons déterminé que Carabine réduit la phosphorylation d'un des effecteurs de Ras, ERK1/2 grâce à son domaine RasGAP. Pour finir nous avons analysé l'effet de Carabine sur une autre protéine sensible au calcium : la CaMKII, qui permet la libération de MEF2 par la translocation des HDACs. La surexpression de Carabine dans des cardiomyocytes inhibe l'activité de la CaMKII, ainsi que la translocation HDAC et l'activité transcriptionnelle de MEF2. La surexpression de mutants de Carabine dans le domaine Ras-GAP ou dans le domaine de liaison à la CaN, ont les mêmes effets que Carabine, prouvant que l'inhibition de la CaMKII se fait par un autre domaine, qui n'est pas encore connu.

Enfin, comme la protéine Epac, active la petite protéine G Ras, qui stimule à son tour les protéines Ca^{2+} dépendantes CaN et CaMKII nous avons examiné si la protéine Carabine pouvait inhiber la voie pro-hypertrophique Epac. Les cardiomyocytes qui sont activés par le 8CPT et qui surexpriment Carabine inhibent l'activité de Ras et de la CaMKII, l'activité transcriptionnelle de NFAT ainsi que la translocation HDAC. L'inhibition de l'HC induite par Carabine passerait donc en partie par la voie Epac. En conclusion, nous montrons que la protéine Carabine, est bien présente dans les cardiomyocytes, et inhibe le remodelage cardiaque en ayant un effet anti-hypertrophique sur les voies de signalisation impliquant Ras, la CaN et la CaMKII.

DISCUSSION et PERSPECTIVES

Discussion et perspectives

En 2007, Pan et ses collaborateurs découvrent une nouvelle protéine inhibitrice de la CaN dans le système immunitaire. Dans les lymphocytes T, Carabine a été montrée comme inhibant les protéines CaN et Ras, protéines impliquées dans l'activation des cellules T (Pan et al., 2007). Etant donné que, suite à une activation chronique des récepteurs α et β -ARs, la phosphatase calcineurine et la petite protéine G Ras sont des protéines impliquées dans la signalisation de l'hypertrophie cardiaque, la découverte de Carabine pose la question du rôle de cette protéine dans la pathologie cardiaque. A ce jour, la fonction de Carabine dans le cardiomyocyte n'a toujours pas été caractérisée.

Au cours de ma thèse, nous avons montré *in vivo* et *in vitro*, que la protéine Carabine est exprimée dans les cardiomyocytes de rats et qu'elle inhibe le remodelage des cardiomyocytes induit lors d'un stress, en bloquant : la croissance cellulaire, la synthèse protéique, la réorganisation des sarcomères et la réexpression des gènes fœtaux. Nous avons également mis en évidence que Carabine exerce ses effets via l'inhibition des protéines CaN, Ras et CaMKII.

I – Expression de Carabine dans les cardiomyocytes de rats et analyse de son rôle dans le remodelage des cardiomyocytes

Nous montrons pour la première fois que la protéine Carabine est exprimée dans les cardiomyocytes de rats nouveau-nés et adultes. Ces résultats sont en accord avec les résultats précédents de Pan et de ses collaborateurs (2007) qui ont montré par Northern blot la présence de Carabine dans le myocarde. De plus, lors de stimulations des récepteurs α et β -ARs (PE et Iso), l'expression de la protéine augmente. Suite à cette modulation de l'expression de la protéine, nous avons étudié la protéine dans les voies hypertrophiques induite par l'activation des récepteurs α et β -ARs. La PE est un agoniste spécifique des récepteurs α_1 -ARs (Ruffolo et al., 1991) tandis que l'Iso agit sur les récepteurs β -ARs.

L'expression de l'ARNm de Carabine

Nous avons mesuré la quantité d'ARNm sur des cœurs de rats sténosés, modèle d'étude de l'HC par surcharge de pression. Des rats soumis à deux intensités de sténoses (clip 60 et 80, la sténose 60 induit une hypertrophie plus forte que la sténose 80 en réduisant davantage la lumière aortique), sur deux durées (2 et 5 semaines), ont été comparés avec des rats contrôles opérés (SHAM) (Figure 27). La mesure de la quantité d'ARNm de l'ANF nous sert de contrôle car elle permet de vérifier l'induction de l'HC par ligature aortique. L'ARNm de l'ANF augmente bien lors de la surcharge de pression. Etrangement, l'expression du gène codant pour Carabine dans le ventricule cardiaque gauche est diminuée chez le rat sténosé par rapport au contrôle SHAM. Il est probable que l'augmentation de l'ARNm de Carabine ait lieu au stade précoce de l'HC, mais une fois l'HC mis en place l'expression de l'ARNm diminue. Au départ, l'HC est adaptative et se produit par exemple lors de l'exercice. Puis, sous condition chronique de stress, elle devient délétère et peut induire l'IC. Ainsi, pour comparer Carabine avec d'autres inhibiteurs de la CaN, la quantité d'ARNm de Cabin 1/Cain est augmentée lors de l'exercice (Iemitsu et al., 2005). Cabin 1/ Cain, semble réguler l'HC adaptative. Pour vérifier le type d'HC inhibé par Carabine, il serait intéressant de quantifier la quantité d'ARNm de Carabine dans un modèle d'étude d'hypertrophie physiologique. Carabine inhibe peut être l'HC au stade adaptatif ou plus au début du stade pathologique.

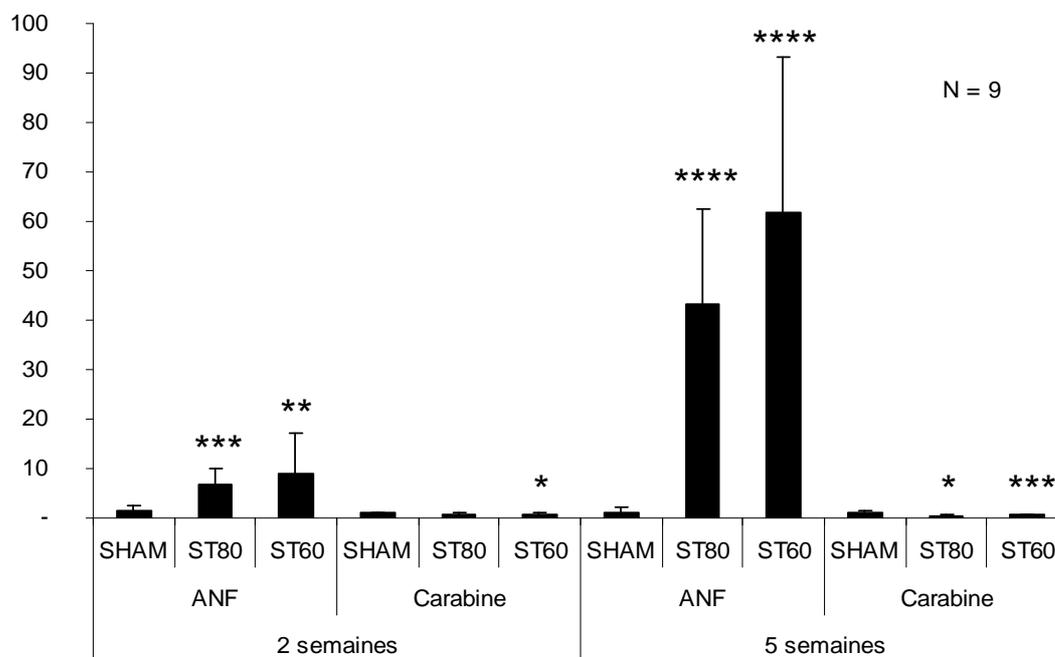


Figure 27 Mesure de l'ARNm de l'ANF et de Carabine dans le ventricule gauche de rats sténosés de 2 et 5 semaines (Résultats obtenus par QPCR). Les rats SHAM sont opérés mais sans la pose de clip. ST : sténose

Expression de la protéine Carabine

La CaN semble requise pour induire l'expression de Carabine (Pan et al., 2007). La stimulation des récepteurs α -ARs augmente l'activité de la CaN. MCIP1 est un inhibiteur et un indicateur de l'activité de la CaN (Vega et al., 2002 ; Benoit et al., 2004). Or, l'expression de MCIP1 augmente lors de la surexpression du récepteur α -AR chez des souris transgéniques âgées de trois mois avec un cœur de taille normale (Benoit et al., 2004). Comme pour MCIP1, il serait donc intéressant de quantifier l'expression de Carabine sur ces souris transgéniques pour déterminer si son expression augmente, d'autant plus qu'*in vitro*, après une activation des récepteurs α -ARs l'expression de Carabine augmente.

Il existe également des inhibiteurs de la CaN qui ont leur expression augmentée lors de l'HC. Les souris transgéniques pour la surexpression du récepteur α -AR, âgées cette fois-ci de neuf mois avec un cœur développant une cardiomyopathie dilatée, ont également une augmentation de l'expression de MCIP1. Donc si l'activité de la CaN est augmentée chez ces souris, l'expression de Carabine est probablement plus forte. Il serait intéressant de quantifier l'expression de Carabine sur ces souris transgéniques pour voir si son expression augmente aussi à neuf mois et pour comparer son expression avec celle d'un autre inhibiteur de la CaN. Par ailleurs, des rats entraînés (exercice volontaire) ont une activité de la CaN qui augmente dans le cœur (Eto et al., 2000). De plus, des rats entraînés ayant développés une hypertrophie cardiaque suite à l'exercice, ont une expression du gène et de la protéine Cabin1/Cain qui augmente et supprime les effets pro-hypertrophiques de la CaN (Iemitsu et al., 2005). Il en est de même pour l'expression de l'inhibiteur GSK3 β qui est impliqué dans le mécanisme moléculaire de l'hypertrophie cardiaque physiologique. Par contre dans le cœur humain insuffisant, le clivage de Cabin 1/Cain est augmenté, ce qui entraîne une augmentation de l'activité de la calcineurine (Yang et al., 2010b). La régulation de Cabin1/Cain, tout comme celle de MCIP1 (Rothermel et al., 2003), peut être un mécanisme moléculaire servant d'adaptation à l'hypertrophie physiologique cardiaque résultant de l'exercice. Il faudrait comparer l'expression de Carabine aux autres inhibiteurs de la CaN dans les myocytes, pour savoir si Carabine est plus fortement exprimée que MCIP1 et si son activité est plus importante. Notre hypothèse étant que la régulation par Carabine a lieu au stade précoce de l'HC, il serait également intéressant d'étudier son effet lors d'une hypertrophie dite adaptative, en regardant si son expression augmente sur des souris surentraînées. Suite à l'étude de la mesure de l'expression de l'ARNm après des sténoses induisant une HC à un stade tardif (Figure 27), il est en effet probable que Carabine inhibe la CaN à un stade précoce d'HC.

Nous ne savons pas si la protéine Carabine possède plusieurs transcrits. C'est par exemple le cas de MCIP1 qui possède quatre transcrits avec des fonctions différentes (Rothermel et al., 2003). Seul l'expression du transcrit MCIP1.4 est augmenté par l'activation de la CaN, sans altérer l'expression des autres transcrits (Rothermel et al., 2003). On peut imaginer que des transcrits différents de Carabine pourraient donner des protéines avec des fonctions différentes dans l'HC.

Carabine et le remodelage cardiaque

Nous avons étudié le rôle de Carabine sur le remodelage cardiaque *in vivo* et *in vitro*. Pour déterminer le rôle de Carabine *in vivo*, nous avons mesuré la croissance cellulaire de cardiomyocytes issus de cœurs de rats ayant été infectés par un adénovirus Carabine et ayant subi une TAC (modèle d'HC par surcharge de pression). Nous avons montré que la surexpression de Carabine inhibe la croissance cellulaire *in vivo*. Sur des cardiomyocytes de rats nouveaux nés, la surexpression de Carabine inhibe également la croissance cellulaire *in vitro*. Le logiciel permettant la mesure de la surface cellulaire étant limité à une mesure en « deux dimensions », nous avons examiné d'autres marqueurs de l'HC *in vitro*, pour s'assurer des effets anti-hypertrophiques de Carabine. En surexprimant Carabine *in vitro*, nous avons mesuré son effet sur la synthèse protéique. Par incorporation de [³H]Leucine, nous avons déterminé que Carabine inhibe bien la synthèse protéique suite à une activation des récepteurs α -ARs (Figure 28).

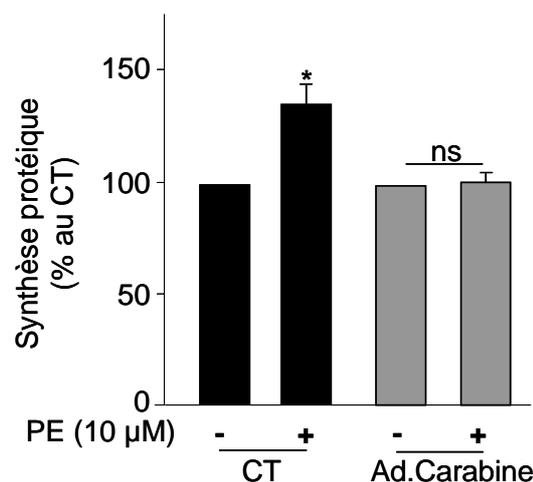


Figure 28 Mesure de la synthèse protéique par incorporation de leucine tritiée. Les cellules sont infectées avec la GFP ou l'adénovirus Carabine MOI 10 pendant 24 heures, la [³H]Leucine est incorporée à 1μCi/mL et les cellules sont stimulées ou non par la PE à 10 μM pendant 48 heures. La radioactivité est mesurée par un compteur à scintillation (LS 6000 CS Beckman).

De plus, une surexpression de Carabine inhibe la réexpression des gènes fœtaux et la réorganisation des sarcomères. A l'inverse, l'extinction de l'expression de Carabine par l'utilisation d'un siARN potentialise la réexpression de l'ANF. Tous ces résultats prouvent bien l'effet de Carabine sur le remodelage des cardiomyocytes. Il est intéressant de noter que le mutant du domaine RasGAP Carabine^{R141A} et le mutant du domaine de liaison à la CaN Carabine^{AAVG} inhibent également la synthèse protéique de l'ANF (Figure 29). Ni le domaine de liaison à la CaN du mutant Carabine^{AAVG}, ni le domaine RasGAP du mutant Carabine^{R141A} ne sont donc indispensables dans l'inhibition de la réexpression des gènes fœtaux. Pour vérifier que cette inhibition n'est pas due à un domaine encore non identifié, ou pour savoir si un seul de ces deux domaines suffit à l'inhibition, il faudrait refaire cette expérience avec le double mutant de Carabine : Carabine^{AAVG et R141A}.

Une augmentation de l'expression de Carabine sous stimuli hypertrophique a donc un effet inhibiteur sur le remodelage cardiaque. Nous avons ensuite décortiqué les voies de signalisation régulées par Carabine.

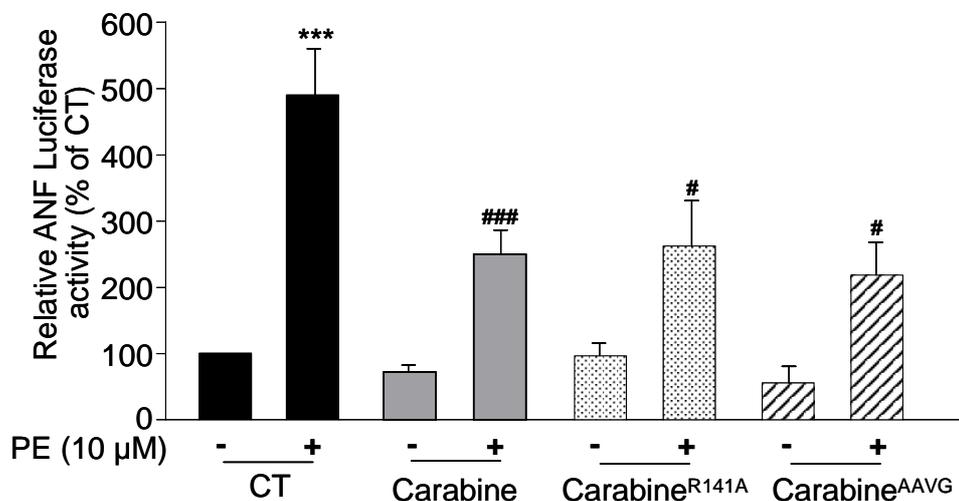


Figure 29 Activité transcriptionnelle de l'ANF après activation des récepteurs α -ARs sur des cellules de rats néonataux qui surexpriment Carabine ou ses formes mutées.

L'expérience a été réalisée dans les mêmes conditions que la figure 2B du papier Berthouze et al., en soumission. ***<0.001 par rapport à la condition non stimulée correspondante ; ###<0.001, #<0.05 par rapport au contrôle stimulé.

II – Carabine inhibiteur de Ras

Dans les cellules de l'épithélium rénales, une diminution de l'expression de Carabine active Ras *in vitro* (Datta et al., 2009). Ainsi, Datta et ses collaborateurs (2009) suggèrent qu'une baisse de l'expression de Carabine peut induire une activation de Ras entraînant une prolifération des cellules cancéreuses dans le rein. Dans les cardiomyocytes, par une surexpression de Carabine, nous avons prouvé que Carabine inhibe Ras. On peut noter que l'anticorps utilisé pour le pull down Ras est H-Ras. L'expression de Carabine régulerait donc l'activité de H-Ras. Par analogie, il existe un inhibiteur de Ras présent dans le cœur humain, dont l'expression varie lors de l'IC. C'est RASSF1A, de la famille Rassf des protéines suppresseur de tumeurs, qui existe sous sept isoformes : RASSF1A à RASSF1G. RASSF1A régule de multiples processus cellulaires dont l'apoptose, le contrôle du cycle cellulaire, la mobilité cellulaire, et permet le maintien de la stabilité du génome (Oceandy et al., 2009b). RASSF1A se lie aussi à H-Ras (Vos et al., 2000). Dans les cœurs hypertrophiés de souris, ainsi que dans les cœurs insuffisants humains, on observe une diminution significative de l'expression de RASSF1A (Oceandy et al., 2009b ; Del Re et al., 2010). La délétion du gène RASSF1A dans des cœurs de souris potentialise les effets hypertrophiques induits par une constriction aortique. De plus, comme pour Carabine, la surexpression de RASSF1A dans des cardiomyocytes de rats nouveaux nés réduit la réponse hypertrophique induite par une activation des récepteurs α -ARs (Oceandy et al., 2009b).

Cependant, nous avons remarqué que l'activité de Ras dans des cardiomyocytes non stimulées et surexprimant Carabine est augmentée. Ceci suggère qu'à l'état basal, Carabine et Ras sont peut être liée à d'autres protéines partenaires de Ras. En effet, en plus d'un complexe avec RASSF1A, il existe aussi un complexe avec la protéine p204 (Ding et Lengyel, 2008 ; Oceandy et al., 2009b). P204 est une protéine de la famille p200, inductible par les interférons murin (Choubey et al., 1992 ; Luan et al., 2008), impliquée dans la régulation de la transcription, la dégradation des protéines, la prolifération cellulaire, et la différenciation de nombreux tissus (Ding et Lengyel, 2008). Chez l'homme, l'équivalent de cette famille est constitué de quatre gènes (*MNDA*, *IFI16*, *AIM2* et *IFIX*). L'expression de p204 est élevée dans les cardiomyocytes (Liu et al., 2000) et son expression augmente lors de la différenciation musculaire (Ding et Lengyel, 2008). La protéine p204 peut être nucléaire et/ou cytoplasmique, selon le type et l'état de différenciations des cellules, et dans les cardiomyocytes, elle est cytoplasmique (Ding et Lengyel, 2008). Il a été montré des

interactions Ras/p204 chez la levure, qui ont été confirmées dans les extraits de cœurs de souris, qui se produisent quand elles sont localisées dans le même compartiment cellulaire (Ding et Lengyel, 2008). La protéine p204 se lie à Ras GTP et inhibe la liaison à Ras GDP par son RasGAP (Ding et Lengyel, 2008). Ainsi, si p204 est liée au complexe Ras/Carabine à l'état basal, p204 peut augmenter la liaison de Ras au GTP et inhiber l'activité de Carabine sur Ras. Ainsi, l'activité de Ras à l'état basal serait augmentée.

Par ailleurs, Carabine inhibe l'effecteur de Ras, ERK, lors d'une activation des récepteurs α -ARs. Par analogie avec RASSF1 (Oceandy et al., 2009a), on peut imaginer que Carabine pourrait inhiber la liaison de Ras-GTP avec Raf1. En effet, RASSF1A interagit avec d'autres protéines et a été découverte récemment comme une protéine d'ancrage pouvant modifier la fonction des complexes dans lesquelles elle est incluse (Donninger et al., 2007). Cette molécule est caractérisée par la présence d'un domaine d'association à Ras (RA), ainsi que d'un domaine responsable des interactions protéines-protéines à son extrémité C-terminale (Avruch et al., 2009). Nos résultats montrent l'interaction Ras/carabine par IP. En comparaison, RASSF1A se lie à Ras activé (RasGTP) par hétérodimérisation avec Nore1/RASSF5 (Ortiz-Vega et al., 2002). Les effets inhibiteurs de RASSF1A sont attribués au domaine de liaison Nore 1 de son domaine N-terminal. Dans la cellule, RASSF1A est colocalisée avec la pompe à calcium du sarcolemme : l'ATPase calcique de la membrane plasmique calmoduline dépendante. Sa co-expression avec cette pompe inhibe ERK1/2, en réponse au facteur de croissance de l'épiderme, suggérant un rôle possible de RASSF1A dans la régulation de la croissance cellulaire et de l'hypertrophie (Armesilla et al., 2004).

Nous mettons en évidence que Carabine inhibe ERK par son domaine RasGAP, puisque lors d'une activation des récepteurs α -ARs, avec une surexpression du mutant Carabine^{R141A} le niveau de phosphorylation de ERK est proche de celui de l'état basal, contrairement à l'inhibition obtenu suite à une surexpression de Carabine sauvage. Carabine, lors de stimuli hypertrophiques, pourrait aussi interagir avec d'autres protéines qui induiraient un changement de conformation, capable, par exemple de libérer le domaine RasGAP.

Les interactions possibles de Carabine avec p204, inhiberaient aussi ERK. En effet, p204 prévient également la liaison de RasGTP à Raf-1, la PI3K, et Ral-GDS et l'induction par la voie Ras de la phosphorylation et de l'activation de cibles en aval de Ras (Ding et Lengyel, 2008). Elle inhibe par exemple, la phosphorylation de MEK par Raf1, la phosphorylation d'Akt par PI3K, la phosphorylation de la p38 MAPK. Ainsi, une diminution du niveau endogène de p204 résulte en une augmentation de la phosphorylation de MEK et Akt (Ding et

Lengyel, 2008). Il serait intéressant d'examiner si Carabine peut aussi inhiber d'autres effecteurs de Ras impliqués dans l'HC, comme par exemple Ral GDS.

Cependant, sous activation des récepteurs adrénergiques, l'inhibition du remodelage cardiaque lors d'une surexpression de Carabine n'est sans doute pas la conséquence de la seule diminution de la voie Ras/ERK. En effet, *in vitro*, les données concernant ERK dans le myocarde sont controversées. Malgré son rôle essentiel dans l'HC, l'activation de ERK par l'ANF a des effets anti-hypertrophiques (Yue et al., 2000 ; Silberbach et al., 1999 ; Molkenin et Robbins, 2009). De plus, il a été prouvé que l'inhibition de la voie ERK *in vivo* n'est pas suffisante pour induire l'hypertrophie (Purcell et al., 2007). L'originalité de Carabine est qu'elle est capable d'inhiber différentes voies de signalisation comme la voie CaN et la CaMKII.

III – Carabine inhibiteur de la CaMKII

La CaMKII phosphoryle les protéines HDAC4 et HDAC5 pour libérer l'activité du facteur de transcription MEF2 qui participe à l'hypertrophie cardiaque. Nous avons démontré que la protéine Carabine inhibe la phosphorylation de la CaMKII, la translocation de HDAC et l'activité transcriptionnelle de MEF2. De plus, la répression de Carabine par un siARN potentialise la réponse à MEF2, confirmant bien l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de MEF2 par Carabine. Elle est donc capable d'inhiber cette voie d'HC.

Le rôle de la CaMKII dans la régulation cardiaque est déterminé en partie par sa localisation cellulaire (Zang et Brown, 2004). Il existe différentes isoformes de la CaMKII : la CaMKII δ_B nucléaire induit l'expression des gènes, la réponse transcriptionnelle et contribue à la croissance hypertrophique et la CaMKII δ_C cytoplasmique induit l'apoptose, les transitoires calciques et contribue au développement de l'insuffisance cardiaque (Zhang et Brown, 2004). Il serait intéressant d'étudier si Carabine est capable d'inhiber les deux isoformes de la CaMKII. Carabine inhibe l'activité transcriptionnelle de MEF2 suggérant une régulation de l'isoforme de CaMKII nucléaire qui permet la réponse transcriptionnelle. De plus, la localisation endogène de Carabine a été étudiée par immunofluorescence (Figure 30). La protéine Carabine est présente dans le cytoplasme, mais il semblerait qu'elle soit majoritaire dans le noyau. Il est donc fortement probable que Carabine interagisse préférentiellement avec

l'isoforme CaMKII δ_B , mais ceci reste à vérifier, et n'exclue pas une interaction avec l'isoforme CaMKII δ_C . De plus, la CaMKII δ_B , mais pas l'isoforme CaMKII δ_C , a été reportée comme impliquée dans la réponse hypertrophique et l'augmentation d'ANF (Ramirez et al., 1997). Or Carabine, ainsi que ces deux mutants, inhibent l'activité transcriptionnelle de l'ANF sous activation des récepteurs α -ARs (Figure 29). Cette inhibition peut être suggérée par une inhibition de la CaMKII δ_B . Il existe donc peut être un autre domaine de Carabine, encore non connu, capable d'inhiber la CaMKII δ_B par une liaison directe avec celle-ci. De plus, selon MacDonnell et ses collaborateurs (2009), la CaMKII δ_C inhibe l'activité de la CaN et la translocation nucléaire de NFAT. Ce qui suggère qu'une inhibition de la CaMKII δ_C par Carabine induirait une augmentation de l'activité de la CaN et de l'activité transcriptionnelle de NFAT. Or ce n'est pas le cas.

Localisation de Carabin endogène dans les cellules de rats nouveaux nés

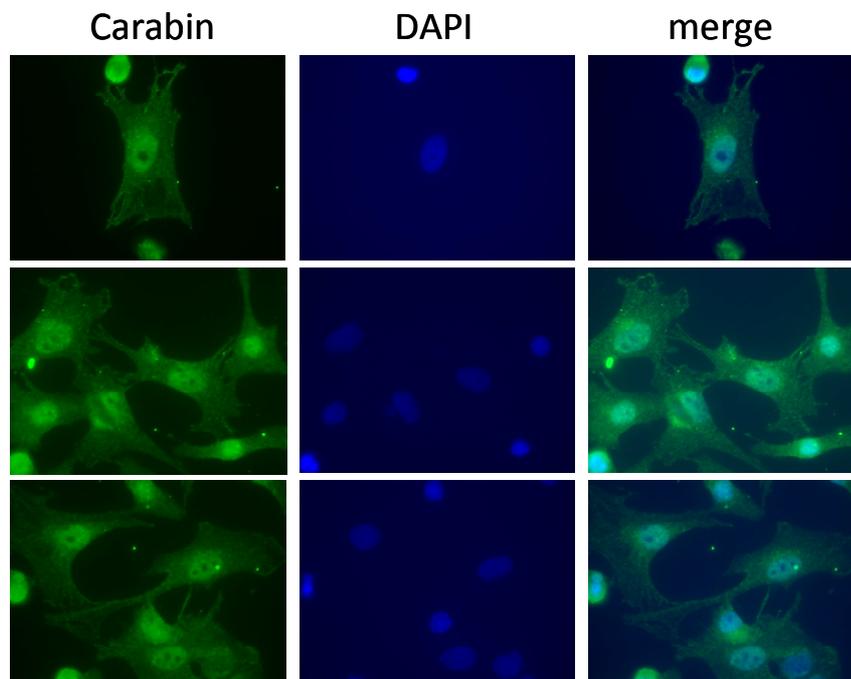


Figure 30 Localisation de Carabine endogène dans des cellules de rats nouveaux nés. Carabine endogène a été marquée en vert (Alexa 488). Le marquage au DAPI (bleu) permet la visualisation des noyaux.

Par ailleurs, Carabine et ses deux formes mutées inhibent l'activité transcriptionnelle de MEF2, suggérant pour Carabine l'existence d'un domaine inhibiteur de la CaMKII (Figure 31). Différentes mutations de Carabine permettraient de tester l'existence d'un tel domaine. Pour étudier si une liaison directe entre Carabine et CaMKII existe il faudrait faire une IP Carabine/CaMKII. L'inhibition de la CaMKII pourrait aussi se faire à l'aide d'interactions avec d'autres protéines. Rad est une protéine de la famille de Ras, découverte pour inhiber l'hypertrophie des cardiomyocytes via la voie CaMKII. La protéine Carabine pourrait aussi avoir des interactions avec d'autres protéines comme Rad pour inhiber MEF2 (Chang et al., 2007).

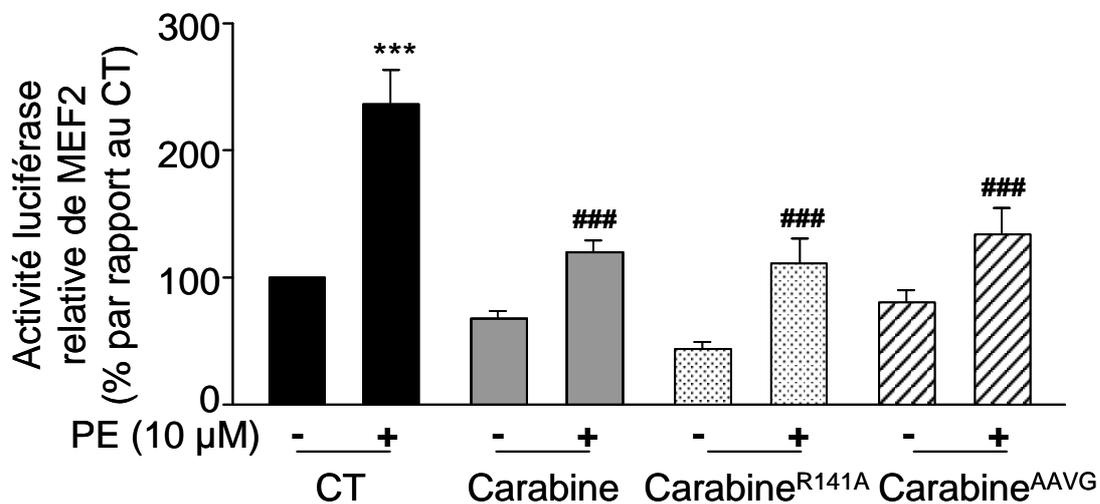


Figure 31 Mesure de l'activité transcriptionnelle de MEF2 après activation des récepteurs α -ARs sur des cellules de rats néonataux qui surexpriment Carabine ou ses mutants.

***<0.001 par rapport a la condition non stimulée correspondante ; ###<0.001, #<0.05 par rapport au contrôle stimulé.

Comme nous l'avons vu dans la discussion, les données de la littérature suggèrent également que la CaMKII et la CaN activent des voies parallèles et interagissent au niveau de l'activation des facteurs de transcription tels que NFAT et MEF2, GATA-4 ou encore AP-1 (Wu et al., 2000; Wilkins et Molkenin 2004; Zhang et Brown 2004). Il a notamment été montré que la CaN est capable de stimuler l'activité de MEF2 dans les cardiomyocytes (Wu et al., 2000 ; Gundersen 2011). L'inhibition de MEF2 par Carabine *in vitro* se fait probablement majoritairement par la CaMKII, car elle diminue sa phosphorylation et la translocation de

HDAC 4 et 5, mais il est probable que Carabine inhibe également MEF2 via la CaN. Il serait donc intéressant de regarder si l'inhibition de MEF2 se fait seulement par la voie CaMKII ou si elle passe aussi par la CaN. Dans les cardiomyocytes, la CaN active l'activité transcriptionnelle de MEF2 en formant le complexe NFAT, MEF2 et CBP/p300 (van Oort et al., 2006). Cependant, *in vivo*, les souris adultes transgéniques MEF2A ou MEF2C croisées avec des souris transgéniques CaN n'ont pas d'augmentation d'HC, suggérant que MEF2 induit l'HC indépendamment de l'HC induite par la CaN chez la souris adulte (Xu et al., 2006). Ces données sont modérées par celles de Van Oort et ses collaborateurs (2006), qui montrent que MEF2 est partiellement impliqué dans le remodelage cardiaque suite à une activation de la CaN.

Il est intéressant de noter que la CaMKII est préférentiellement activée par une forte transitoire calcique alors que la CaN est préférentiellement activée par une faible transitoire calcique (McKinsey et al., 2002). La CaMKII est donc active préférentiellement près des canaux calciques (RyR, LTCC, InsP3R). En effet l'affinité de la CaMKII pour le Ca^{2+} -CaM est plus faible ($K_d \approx 50nM$) que celle de la CaN pour le Ca^{2+} -CaM ($K_d \ll 1nM$) (Bers, 2011). En fonction de la quantité de Ca^{2+} libéré dans la cellule, et de la localisation subcellulaire, Carabine pourrait intervenir sur chacune des voies mises en jeu. Cependant Epac active la CaMKII de façon indépendante du Ca^{2+} (Oestreich et al., 2009). Or Carabine inhibe l'activité de la CaMKII après une activation de Epac, suggérant qu'elle n'est peut être pas localisée dans un domaine spécifique unique.

Dans les cellules T, Cabin1/Cain est également un inhibiteur de la CaN et de l'activité transcriptionnelle de MEF2, au niveau de son domaine C-terminal (Youn et al., 1999). Tous les isoformes de MEF2 peuvent se lier avec Cabin1/Cain, car l'interaction se fait sur le domaine de liaison à l'ADN MADS, qui est conservé pour tous les isoformes (Youn et al., 1999). A priori, il semblerait que pour Carabine le domaine inhibant la CaMKII soit différent de celui inhibant la CaN. En effet, une surexpression du mutant dans le domaine de liaison à la CaN, Carabine^{AAVG}, inhibe toujours l'activité transcriptionnelle de MEF2 (Figure 31). Donc l'inhibition de la CaMKII par Carabine doit se faire par un autre domaine. Le mécanisme précis de répression de MEF2 par Cabin1/Cain n'est pas connu mais, Cabin1/Cain inhibe l'activité transcriptionnelle de MEF2 sans inhiber sa liaison à l'ADN. MEF2 est régulé par Cabin1/Cain, indépendamment de l'effet de Cabin1/Cain sur l'activité CaN (Youn et al., 1999). De plus, dans les cellules T, Cabin 1/ Cain est phosphorylé par la CaMKIV, ce qui

permet la liaison de Cabin 1/ Cain avec 14-3-3 et son export nucléaire, dissociant Cabin 1/ Cain de MEF2 (Pan et al., 2005 ; Liu 2009). On ne sait pas si Carabine interagit avec la CaMKIV dans les cellules T, mais cette isoforme n'est pas présente dans le cœur. Carabine comme, Cabin/Cain est un également un inhibiteur double de la calcineurine et du facteur de transcription MEF2, mais Carabine est présente dans le myocarde alors que Cabin1/Cain n'est pas exprimée dans le muscle.

IV – Carabine inhibiteur de la CaN

L'activation de la CaN et de NFAT suffisent pour induire l'HC, c'est pourquoi de nombreux inhibiteurs de la CaN sont étudiés (Molkentin et Dorn, 2001 ; Wilkins et Molkentin, 2004). Nous avons démontré la présence de Carabine dans les cardiomyocytes et ses effets inhibiteurs sur la CaN et sur NFAT. D'autres inhibiteurs de la CaN comme AKAP 79 ou Cabin1/ Cain ne sont pas exprimées a des niveaux significatifs dans le cœur (Fiedler et Wollert, 2005), contrairement à MCIP1, plus fortement exprimé dans le cœur et les muscles squelettiques et qui représente donc un régulateur physiologique potentiel de la CaN dans le myocarde (Rothermel et al., 2003).

Localisation de la calcineurine et de ses inhibiteurs

Au niveau de sa localisation intracellulaire, la CaN est cytoplasmique, mais elle a aussi été découverte comme allant dans le noyau (Shibasaki et al., 1996 ; Heineke et Ritter, 2012). Les inhibiteurs de la CaN ont des distributions cellulaires différentes. Ainsi, les immunophilines FKBP12 et FKBP6 ciblent la CaN au récepteur de la ryanodine et de l'IP3 (Cameron et al., 1995 ; Xiao et al., 1997). Dans le muscle strié, la calsarcine se lie à la CaN au niveau des disques Z des sarcomères (Frey et al., 2000). Cabin 1/Cain, comme la CaN, est localisée dans le cytoplasme mais est aussi présente dans le noyau, puisqu'elle est responsable de la régulation de la fonction de la CaN après sa translocation nucléaire (Sun et al., 1998). Concernant Carabine, comme nous l'avons dit précédemment, sa localisation endogène suggère une interaction avec la CaN nucléaire, même si il est aussi probable qu'elle interagisse aussi avec la forme cytoplasmique de la CaN. Dans le noyau, Cabin 1/Cain sert peut être de protéine d'ancrage de la CaN. La PKC entraîne l'hyperphosphorylation de Cabin 1/Cain, augmentant son affinité pour la CaN (Szijgyarto et al., 2007). Par analogie, Carabine pourrait aussi servir de protéine d'ancrage de la CaN dans le noyau des cardiomyocytes.

La connaissance détaillée du transport de la CaN à travers la membrane nucléaire a permis le développement d'un petit peptide imitant la région du signal de localisation nucléaire de la CaN (Heineke et Ritter, 2012). Ce peptide sature l'importine $\beta 1$ pour la CaN et prévient la translocation nucléaire de la CaN, l'activité transcriptionnelle de NFAT et l'HC après une stimulation par l'AngII dans les cardiomyocytes isolés. Il inhibe ainsi les effets délétères d'une trop grande activité transcriptionnelle de NFAT (Chahine et Pierce, 2009) mais pas l'activité phosphatase CaN (Hallhuber et al., 2006). En comparaison à ce peptide, Carabine prévient l'activité transcriptionnelle de NFAT mais a aussi la particularité d'inhiber directement l'activité de la phosphatase.

Analogie entre la régulation de l'expression des protéines MCIP1 et Carabine

La protéine MCIP1 est régulée par un rétrocontrôle négatif de la CaN (Rothermel et al., 2003), Pan et ses collaborateurs (2007) supposent une régulation identique pour Carabine. Sous activation de la CaN, NFAT est dephosphorylé puis entre dans le noyau pour activer des gènes cible dont MCIP1.4. L'expression de MCIP1 augmente et la protéine est stabilisée, puis se lie à la CaN, inhibant ainsi son activité (Rothermel et al., 2003). Ainsi, le rétrocontrôle négatif par MCIP1 prévient l'activité excessive de la CaN qui peut avoir des effets délétères sur la cellule (Chahine et Pierce, 2009). L'analyse de l'expression de la protéine Carabine dans les souris transgéniques surexprimant la CaN sous un promoteur fort α -MHC indiquerait une possible régulation identique à celle de MCIP1. Le rétrocontrôle de la CaN sur Carabine doit être important dans la régulation de l'HC.

Inhibition de NFAT et domaine de liaison à la CaN

Carabine possède un domaine de liaison à la CaN au niveau de son domaine C-terminal mais nous n'avons pas d'indication si Carabine interagit avec la sous-unité A ou B de la CaN. Il serait intéressant d'étudier les effets de Carabine sur l'activité phosphatase de la CaN mutée sur l'un ou l'autre de ces sous-unités afin de déterminer plus précisément comment Carabine inhibe la CaN. Par comparaison, les protéines MCIP1, se lient directement à la sous-unité catalytique A de la CaN, sans se lier à la sous-unité B ou à la calmoduline et préférentiellement à la forme active de la CaN (Vega et al., 2002). Le FK506 et la CsA empêchent tout les deux l'interaction MCIP1/CaN suggérant que ces complexes immunophilines sont en compétition avec les sites de liaison de MCIP1 pour la CaN (Gorlach et al., 2000 ; Kingsbury et al., 2000). Il serait intéressant de tester si Carabine est aussi en compétition avec la CsA ou FK506 pour savoir si elle inhibe la CaN avec des sites de liaison

différents ou identiques à ceux des immunophilines et si son mode d'action est semblable à celui de MCIP1. Il serait également intéressant de déterminer si son activation est dépendante de la CaM ou du Ca²⁺ et d'identifier la séquence exacte de Carabine impliqué dans l'inhibition. En effet, MCIP1 contient la séquence FLISPPASP du domaine répété de SP, qui a été montré *in vitro* pour inhiber l'activité de la CaN ; tandis que les inhibiteurs AKAP79, Cabin 1/Cain, FKBP12 et A238L (un inhibiteur de la CaN non présent dans le cœur), ont un motif commun de liaison à la CaN (PxIxIT) (Gorlach et al., 2000 ; Li et al., 2004a) qui n'est pas présent chez Carabine (Liu, 2009). Carabine doit donc avoir sa propre séquence inhibitrice.

V - Carabine et Epac

La protéine Epac, comme la protéine Carabine régule l'activité de Ras, de la CaN et de la CaMKII (Morel et al., 2005 ; Metrich et al., 2008 ; Metrich et al., 2010). Epac est une GEF capable d'activer les voies de signalisation hypertrophiques. Lors d'une activation au 8CPT, un analogue de l'AMPC activant spécifiquement Epac, ou lors d'une surexpression de la protéine Epac, la surexpression de Carabine inhibent l'activité de Ras. Cette dernière étant au contraire augmentée en présence du mutant Carabine^{R141A} (Figure 32). Donc Carabine est capable d'inhiber par son domaine RasGAP la petite protéine G Ras activée par Epac, en réponse à une stimulation β -adrénergique.

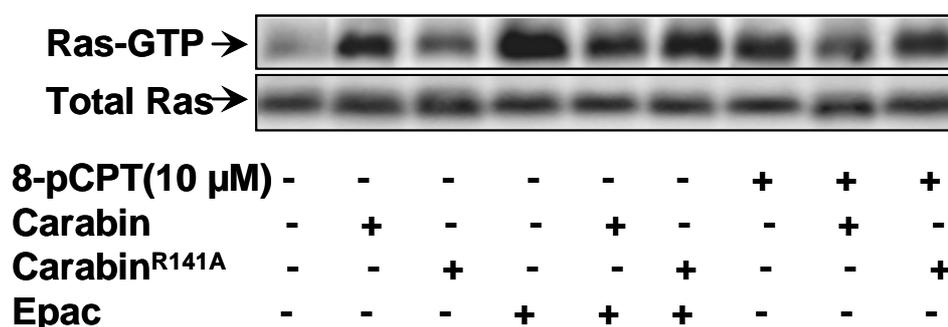


Figure 32 Mesure de l'activité de Ras sur des cardiomyocytes de rats nouveaux nés. Les cardiomyocytes ont été transfectés soit avec un vecteur contrôle (pSV2), soit Carabine, Carabine^{R141A} ou Epac. 24h après, les cardiomyocytes sont stimulées ou non avec du 8CPT (10μM).

Epac est activé par les récepteurs β -ARs (Métrich et al., 2008). La surexpression de la protéine Carabine inhibe l'activité transcriptionnelle de NFAT induite par l'activation des récepteurs α -ARs mais également des récepteurs β -ARs. Il serait intéressant d'étudier si une surexpression de Carabine inhibe également NFAT après une stimulation au 8CPT ou une surexpression de EPAC.

Ras, via la voie Raf/ERK/MAPK, active le facteur de transcription NFATc4, de manière CaN dépendante dans les cardiomyocytes néonataux (Ichida et al., 2001). De plus l'activation de ERK augmente l'activité transcriptionnelle de NFAT (Sanna et al., 2005). Par ailleurs, notre équipe a montré que Ras, suite à une activation par Epac, régule la CaN et la CaMKII (Métrich et al., 2010). Dans notre étude, le fait que le mutant Carabine^{R141A} (mutation du domaine RasGAP) régule l'activité transcriptionnelle de NFAT de manière similaire à celle de Carabine sauvage, suggère que Carabine inhibe l'activité transcriptionnelle de NFAT de manière Ras indépendante. Mais comme le prouve l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de NFAT avec le mutant Carabine^{AAVG} (mutation du domaine de liaison à la CaN) après activation des récepteurs α -ARs, l'inhibition est dépendante du domaine de liaison à la calcineurine. Carabine inhibe aussi peut être la CaMKII de manière Ras indépendante.

L'activation de Epac induit une augmentation de la phosphorylation du RyR et du phospholamban par la CaMKII (Pereira et al., 2007 ; Cazorla et al., 2009). Carabine inhibe l'activité de la voie CaMKII induite par Epac, comme l'indique l'inhibition de la phosphorylation de la CaMKII et l'inhibition de la translocation HDAC sur des cardiomyocytes surexprimant Carabine et soumis à une activation au 8CPT. Carabine aurait donc un rôle anti-hypertrophique en agissant sur la voie pro-hypertrophique induite par Epac.

L'augmentation de l'activité transcriptionnelle de MEF2 induite par Epac dans les cardiomyocytes néonataux n'est pas altérée par l'inhibition de la CaN par la CsA (Métrich et al., 2010). En réponse à Epac, la CaN est donc spécifiquement impliquée dans la régulation de NFAT. Néanmoins, il est intéressant de noter que les effets hypertrophiques de Epac dans les cardiomyocytes adultes sont totalement bloqués par un inhibiteur de la CaN seul (CsA) ou de la CaMKII seul (KN-93) (Métrich et al., 2008). De même, dans les cardiomyocytes de rats néonataux, l'inhibiteur de la CaN, VIVIT, ou l'inhibiteur de CaMKII, KN93, inhibent totalement l'augmentation de la taille cellulaire induite par Epac (Latif et al., 2001 ; Métrich et al., 2010, SD figure S3). Ces données montrent que l'inhibition de l'une ou l'autre est nécessaire et suffisante pour bloquer les effets hypertrophiques de Epac. L'intérêt de Carabine

est d'inhiber à la fois la CaN et la CaMKII, elle représente donc un puissant inhibiteur des effets hypertrophiques induits par Epac.

VII - Suite de l'étude

Il serait intéressant de créer des souris transgéniques surexprimant Carabine ou au contraire délétées de cette protéine dans le myocarde et de déterminer l'effet de Carabine sur une hypertrophie induite chez ces souris par une TAC ou des mini-pompes Iso. De plus, croiser des souris transgéniques surexprimant Carabine avec des souris transgéniques CaN constitutivement actives permettrait d'étudier si la surexpression de Carabine est suffisante pour inhiber l'activité de la CaN constitutivement active. Avec des souris transgéniques nous pourrions étudier *in vivo* les effets cardio-protecteurs supposés de Carabine et si ces effets sont conservés dans d'autres modèles d'études qui induisent l'HC (en les croisant à d'autres modèles de souris induisant l'HC par exemple). Le but serait ainsi de déterminer sous quels modèles physiopathologiques Carabine inhibe Ras, la CaN et la CaMKII *in vivo*.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

La conclusion générale de ce travail est que la protéine Carabine inhibe le remodelage cardiaque induit par les récepteurs α - et β -adrénergiques en régulant plusieurs voies hypertrophiques *in vitro* chez les cardiomyocytes de rats nouveaux nés.

Nous avons en effet montré que la protéine Carabine est bien présente dans les cardiomyocytes de rats nouveaux nés et adultes. De plus, sous activation des voies α - et β -adrénergiques, l'expression de Carabine augmente.

Par ailleurs, Carabine prévient le remodelage qui caractérise l'hypertrophie des cardiomyocytes. Ainsi, elle inhibe la réexpression du gène fœtal ANF, la réorganisation des sarcomères, la synthèse protéique et l'augmentation de la taille cellulaire des cardiomyocytes de rats nouveaux nés. Nous avons également étudié l'effet de Carabine sur la surface cellulaire dans un modèle d'hypertrophie cardiaque par surcharge de pression. La surexpression de Carabine dans des cœurs de rats sténosés, par injection intramyocardique d'un adénovirus codant pour carabine, diminue l'hypertrophie des cardiomyocytes.

Nous avons également étudié la signalisation cellulaire dans laquelle Carabine joue un rôle. Carabine est un inhibiteur de la petite protéine G Ras, ainsi que de son effecteur ERK1/2, par son domaine RasGAP. De plus, nous avons montré une interaction directe entre Carabine et Ras, même si d'autres complexes sont peut être mises en jeu. La particularité de cette protéine est qu'elle régule plusieurs voies de signalisation. Ainsi, Carabine inhibe également la phosphatase CaN, ainsi que son facteur de transcription NFAT, en prévenant sa translocation nucléaire et son activité transcriptionnelle. De même, Carabine inhibe la CaMKII et la translocation de HDAC 4 et 5, ainsi que l'activité transcriptionnelle de MEF2. Enfin, Carabine prévient l'hypertrophie des cardiomyocytes induite par Epac en inhibant les voies de signalisation Ras et CaMKII.

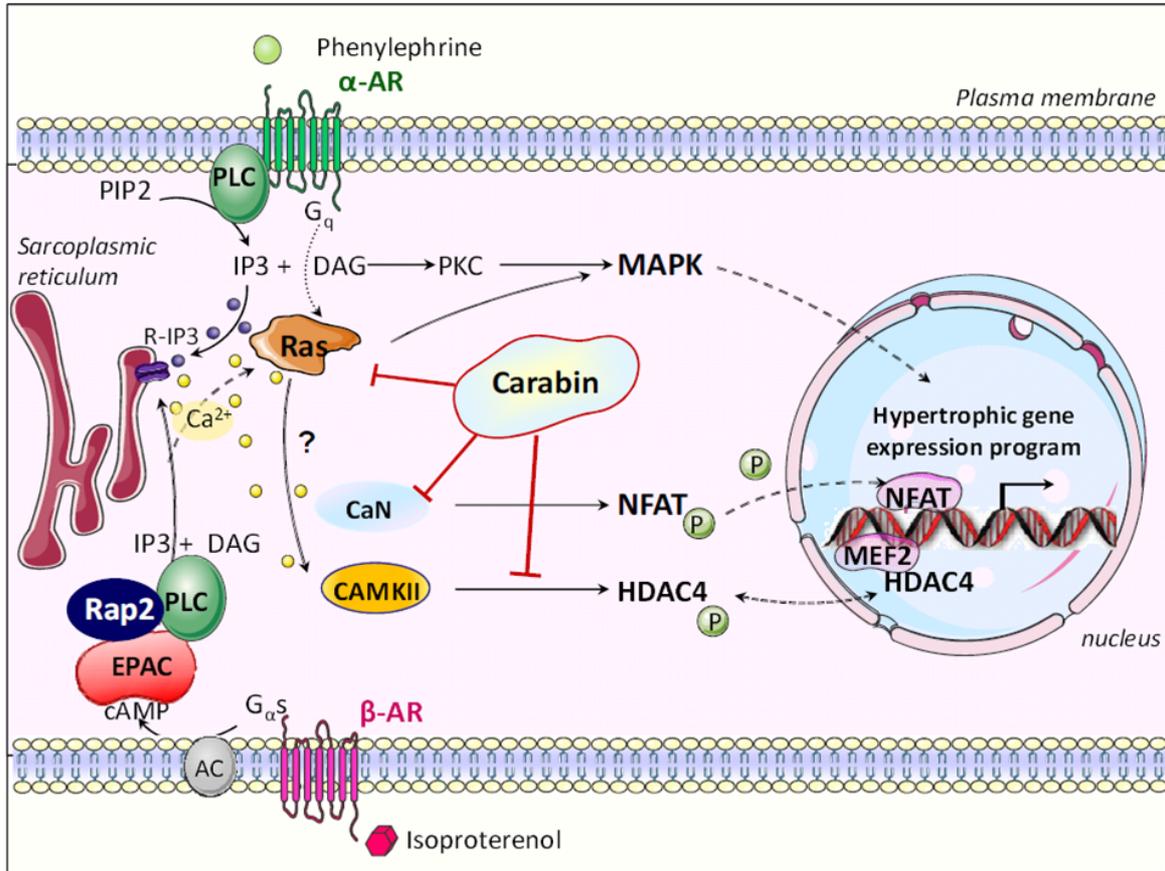


Figure 33 Représentation schématique des effets anti-hypertrophiques de Carabine.

Après stimulation des récepteurs α -adrénergiques, la PLC est activée, permettant la libération de Ca^{2+} , et l'activation de Ras. Après activation des récepteurs β -adrénergiques, l'AMPc active Epac, qui a son tour active Ras. Carabine inhibe la voie Ras et son effecteur ERK. Les protéines Ca^{2+} dépendantes, CaN et CaMKII, aussi activées par Ras active respectivement les facteurs de transcriptions NFAT et HDAC4, qui induisent l'hypertrophie cardiaque. Carabine inhibe aussi la voie CaN et CaMKII.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1999a) The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet*. 353; 9-13.

1999b) Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet*. 353; 2001-7.

A

Akhter SA, Milano CA, Shotwell KF, Cho MC, Rockman HA, Lefkowitz RJ, Koch WJ. (1997) Transgenic mice with cardiac overexpression of alpha1B-adrenergic receptors. In vivo alpha1-adrenergic receptor-mediated regulation of beta-adrenergic signaling. *J Biol Chem*. 272; 21253-9.

Anderson ME, Brown JH, Bers DM. (2011) CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 51; 468-73.

Aramburu J, Yaffe MB, Lopez-Rodriguez C, Cantley LC, Hogan PG, Rao A. (1999) Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science*. 285; 2129-33.

Armesilla AL, Williams JC, Buch MH, Pickard A, Emerson M, Cartwright EJ, Oceandy D, Vos MD, Gillies S, Clark GJ, Neyses L. (2004) Novel functional interaction between the plasma membrane Ca²⁺ pump 4b and the proapoptotic tumor suppressor Ras-associated factor 1 (RASSF1). *J Biol Chem*. 279; 31318-28.

Asano K, Bohlmeier TJ, Westcott JY, Zisman L, Kinugawa K, Good M, Minobe WA, Roden R, Wolfel EE, Lindenfeld J, David Port J, Perryman MB, Cleveland J, Lowes BD, Bristow MR. (2002) Altered expression of endothelin receptors in failing human left ventricles. *J Mol Cell Cardiol*. 34; 833-46.

Autelitano DJ., Woodcock EA. (1998) Selective activation of alpha1A-adrenergic receptors in neonatal cardiac myocytes is sufficient to cause hypertrophy and differential regulation of alpha1-adrenergic receptor subtype mRNAs. *J Mol Cell Cardiol*. 30; 1515-23.

Avruch J, Xavier R, Bardeesy N, Zhang XF, Praskova M, Zhou D, Xia F. (2009) Rassf family of tumor suppressor polypeptides. *J Biol Chem*. 284; 11001-5.

B

Backs J, Song K, Bezprozvannaya S, Chang S, Olson EN. (2006) CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest*. 116; 1853-64.

Banyasz T, Szentandrassy N, Toth A, Nanasi PP, Magyar J, Chen-Izu Y. (2011) Cardiac calmodulin kinase: a potential target for drug design. *Curr Med Chem*. 18; 3707-13 .

- Bare DJ, Kettlun CS, Liang M, Bers DM, Mignery GA.** (2005) Cardiac type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: interaction and modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem.* 280; 15912-20.
- Barry SP, Davidson SM, Townsend PA.** (2008) Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int J Biochem Cell Biol.* 40; 2023-39.
- Barry SP., Townsend PA.** (2010) What causes a broken heart--molecular insights into heart failure. *Int Rev Cell Mol Biol.* 284 ; 113-79.
- Bartel S, Krause EG, Wallukat G, Karczewski P.** (2003) New insights into beta2-adrenoceptor signaling in the adult rat heart. *Cardiovasc Res.* 57; 694-703.
- Beltrami CA, Finato N, Rocco M, Feruglio GA, Puricelli C, Cigola E, Quaini F, Sonnenblick EH, Olivetti G, Anversa P.** (1994) Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans. *Circulation.* 89; 151-63.
- Benoit MJ, Rindt H, Allen BG.** (2004) Cardiac-specific transgenic overexpression of alpha1B-adrenergic receptors induce chronic activation of ERK MAPK signalling. *Biochem Cell Biol.* 82; 719-27.
- Bernstein D, Fajardo G, Zhao M.** (2011) THE ROLE OF beta-ADRENERGIC RECEPTORS IN HEART FAILURE: DIFFERENTIAL REGULATION OF CARDIOTOXICITY AND CARDIOPROTECTION. *Prog Pediatr Cardiol.* 31; 35-38.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL.** (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4 ; 517-29.
- Bers DM.** (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 415; 198-205.
- Bers DM.** (2008) Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol.* 70; 23-49.
- Bers DM.** (2011) Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II regulation of cardiac excitation-transcription coupling. *Heart Rhythm.* 8; 1101-4.
- Berthouze M, Laurent AC, Breckler M, Lezoualc'h F.** (2011) New perspectives in cAMP-signaling modulation. *Curr Heart Fail Rep.* 8; 159-67.
- Biel M, Schneider A, Wahl C.** (2002) Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc Med.* 12; 206-12.
- Bisognano JD, Weinberger HD, Bohlmeier TJ, Pende A, Raynolds MV, Sastravaha A, Roden R, Asano K, Blaxall BC, Wu SC, Communal C, Singh K, Colucci W, Bristow MR, Port DJ.** (2000) Myocardial-directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol.* 32; 817-30.
- Blaeser F, Ho N, Prywes R, Chatila TA.** (2000) Ca²⁺-dependent gene expression mediated by MEF2 transcription factors. *J Biol Chem.* 275; 197-209.

- Boivin B, Lavoie C, Vaniotis G, Baragli A, Villeneuve LR, Ethier N, Trieu P, Allen BG, Hebert TE.** (2006) Functional beta-adrenergic receptor signalling on nuclear membranes in adult rat and mouse ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 71; 69-78.
- Boluyt MO, Long X, Eschenhagen T, Mende U, Schmitz W, Crow MT, Lakatta EG.** (1995) Isoproterenol infusion induces alterations in expression of hypertrophy-associated genes in rat heart. *Am J Physiol.* 269; H638-47.
- Bram RJ, Hung DT, Martin PK, Schreiber SL, Crabtree GR.** (1993) Identification of the immunophilins capable of mediating inhibition of signal transduction by cyclosporin A and FK506: roles of calcineurin binding and cellular location. *Mol Cell Biol.* 13; 4760-9.
- Brancaccio M, Hirsch E, Notte A, Selvetella G, Lembo G, Tarone G.** (2006) Integrin signalling: the tug-of-war in heart hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 70; 422-33.
- Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, Kimball TF, Lorenz JN, Nairn AC, Liggett SB, Bodi I, Wang S, Schwartz A, Lakatta EG, DePaoli-Roach AA, Robbins J, Hewett TE, Bibb JA, Westfall MV, Kranias EG, Molkentin JD.** (2004) PKC- α regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med.* 10; 248-54.
- Breckler M, Berthouze M, Laurent AC, Crozatier B, Morel E, Lezoualc'h F.** (2011) Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: compartmentation, functioning and disease implications. *Cell Signal.* 23; 1257-66.
- Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB.** (1982) Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med.* 307; 205-11 .
- Bristow MR, Minobe W, Rasmussen R, Hershberger RE, Hoffman BB.** (1988) Alpha-1 adrenergic receptors in the nonfailing and failing human heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 247; 1039-45.
- Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP, Janicki JS.** (2006) The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *Eur J Cardiothorac Surg.* 30; 604-10.
- Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, Kitsis RN, Molkentin JD.** (2000) The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J.* 19; 6341-50.
- Bueno OF, Wilkins BJ, Tymitz KM, Glascock BJ, Kimball TF, Lorenz JN, Molkentin JD.** (2002) Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin A β -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99; 4586-91.
- Bunney TD., Katan M.** (2011) PLC regulation: emerging pictures for molecular mechanisms. *Trends Biochem Sci.* 36; 88-96.
- Burger A, Benicke M, Deten A, Zimmer HG.** (2001) Catecholamines stimulate interleukin-6 synthesis in rat cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281; H14-21 .

Burkard N, Becher J, Heindl C, Neyses L, Schuh K, Ritter O. (2005) Targeted proteolysis sustains calcineurin activation. *Circulation*. 111; 1045-53.

Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR Jr, Trendelenburg U. (1994) International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev*. 46; 121-36.

C

Cameron AM, Steiner JP, Roskams AJ, Ali SM, Ronnett GV, Snyder SH. (1995) Calcineurin associated with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca²⁺ flux. *Cell*. 83; 463-72.

Campbell DJ, Aggarwal A, Esler M, Kaye D. (2001) beta-blockers, angiotensin II, and ACE inhibitors in patients with heart failure. *Lancet*. 358; 1609-10.

Cazorla O, Lucas A, Poirier F, Lacampagne A, Lezoualc'h F. (2009) The cAMP binding protein Epac regulates cardiac myofilament function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106; 14144-9.

Chahine MN., Pierce GN. (2009) Therapeutic targeting of nuclear protein import in pathological cell conditions. *Pharmacol Rev*. 61; 358-72.

Chang L, Zhang J, Tseng YH, Xie CQ, Ilany J, Bruning JC, Sun Z, Zhu X, Cui T, Youker KA, Yang Q, Day SM, Kahn CR, Chen YE. (2007) Rad GTPase deficiency leads to cardiac hypertrophy. *Circulation*. 116; 2976-83.

Chen L, Hahn H, Wu G, Chen CH, Liron T, Schechtman D, Cavallaro G, Banci L, Guo Y, Bolli R, Dorn GW 2nd, Mochly-Rosen D. (2001) Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98; 11114-9.

Chen S, Law CS, Grigsby CL, Olsen K, Hong TT, Zhang Y, Yeghiazarians Y, Gardner DG. (2011) Cardiomyocyte-specific deletion of the vitamin D receptor gene results in cardiac hypertrophy. *Circulation*. 124; 1838-47.

Cheng HJ, Zhang ZS, Onishi K, Ukai T, Sane DC, Cheng CP. (2001) Upregulation of functional beta(3)-adrenergic receptor in the failing canine myocardium. *Circ Res*. 89; 599-606.

Chiloeches A, Paterson HF, Marais R, Clerk A, Marshall CJ, Sugden PH. (1999) Regulation of Ras.GTP loading and Ras-Raf association in neonatal rat ventricular myocytes by G protein-coupled receptor agonists and phorbol ester. Activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade by phorbol ester is mediated by Ras. *J Biol Chem*. 274; 19762-70.

Chong H, Vikis HG, Guan KL. (2003) Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal*. 15; 463-9.

Choubey D., Lengyel P. (1992) Interferon action: nucleolar and nucleoplasmic localization of the interferon-inducible 72-kD protein that is encoded by the Ifi 204 gene from the gene 200 cluster. *J Cell Biol*. 116; 1333-41.

Chow CW, Rincon M, Cavanagh J, Dickens M, Davis RJ. (1997) Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science*. 278; 1638-41.

Chruscinski AJ, Rohrer DK, Schauble E, Desai KH, Bernstein D, Kobilka BK. (1999) Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene. *J Biol Chem*. 274; 16694-700.

Clerk A, Cullingford TE, Fuller SJ, Giraldo A, Markou T, Pikkarainen S, Sugden PH. (2007) Signaling pathways mediating cardiac myocyte gene expression in physiological and stress responses. *J Cell Physiol*. 212; 311-22.

Clerk A, Michael A, Sugden PH. (1998) Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists, endothelin-1 and phenylephrine: a role in cardiac myocyte hypertrophy? *J Cell Biol*. 142; 523-35.

Coghlan VM, Perrino BA, Howard M, Langeberg LK, Hicks JB, Gallatin WM, Scott JD. (1995) Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science*. 267; 108-11.

Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. (2000) Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 35; 569-82.

Colomer JM, Mao L, Rockman HA, Means AR. (2003) Pressure overload selectively up-regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in vivo. *Mol Endocrinol*. 17; 183-92.

Communal C, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS. (1999) Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis: role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation*. 100; 2210-2.

Cotecchia S. (2010) The alpha1-adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation. *J Recept Signal Transduct Res*. 30; 410-9.

Couchonnal LF., Anderson ME. (2008) The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease. *Physiology (Bethesda)*. 23; 151-9.

Crawford DR, Leahy KP, Abramova N, Lan L, Wang Y, Davies KJ. (1997) Hamster adapt78 mRNA is a Down syndrome critical region homologue that is inducible by oxidative stress. *Arch Biochem Biophys*. 342; 6-12.

D

Datta D, Contreras AG, Basu A, Dormond O, Flynn E, Briscoe DM, Pal S. (2009) Calcineurin inhibitors activate the proto-oncogene Ras and promote protumorigenic signals in renal cancer cells. *Cancer Res*. 69; 8902-9.

de la Pompa JL, Timmerman LA, Takimoto H, Yoshida H, Elia AJ, Samper E, Potter J, Wakeham A, Marengere L, Langille BL, Crabtree GR, Mak TW. (1998) Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature*. 392; 182-6.

de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL. (1998) Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*. 396; 474-7.

De Windt LJ, Lim HW, Bueno OF, Liang Q, Delling U, Braz JC, Glascock BJ, Kimball TF, del Monte F, Hajjar RJ, Molckentin JD. (2001) Targeted inhibition of calcineurin attenuates cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98; 3322-7.

De Windt LJ, Lim HW, Taigen T, Wencker D, Condorelli G, Dorn GW 2nd, Kitsis RN, Molckentin JD. (2000) Calcineurin-mediated hypertrophy protects cardiomyocytes from apoptosis in vitro and in vivo: An apoptosis-independent model of dilated heart failure. *Circ Res*. 86; 255-63.

Del Re DP, Matsuda T, Zhai P, Gao S, Clark GJ, Van Der Weyden L, Sadoshima J. (2010) Proapoptotic RASSF1A/Mst1 signaling in cardiac fibroblasts is protective against pressure overload in mice. *J Clin Invest*. 120; 3555-67.

Devic E, Xiang Y, Gould D, Kobilka B. (2001) Beta-adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from beta(1) and beta(2) adrenoceptor knockout mice. *Mol Pharmacol*. 60; 577-83.

Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Stromberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K. (2008) ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail*. 10; 933-89.

Ding B., Lengyel P. (2008) p204 protein is a novel modulator of ras activity. *J Biol Chem*. 283; 5831-48.

Ding B, Price RL, Borg TK, Weinberg EO, Halloran PF, Lorell BH. (1999) Pressure overload induces severe hypertrophy in mice treated with cyclosporine, an inhibitor of calcineurin. *Circ Res*. 84; 729-34.

Donninger H, Vos MD, Clark GJ. (2007) The RASSF1A tumor suppressor. *J Cell Sci*. 120; 3163-72.

Du XJ, Autelitano DJ, Dilley RJ, Wang B, Dart AM, Woodcock EA. (2000) beta(2)-adrenergic receptor overexpression exacerbates development of heart failure after aortic stenosis. *Circulation*. 101; 71-7.

duBell WH, Gaa ST, Lederer WJ, Rogers TB. (1998) Independent inhibition of calcineurin and K⁺ currents by the immunosuppressant FK-506 in rat ventricle. *Am J Physiol*. 275; H2041-52.

Duquesnes N, Lezoualc'h F, Crozatier B. (2011) PKC-delta and PKC-epsilon: foes of the same family or strangers? *J Mol Cell Cardiol*. 51; 665-73.

E

- El-Armouche A., Eschenhagen T.** (2009) Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev.* 14; 225-41.
- El-Armouche A, Pohlmann L, Schlossarek S, Starbatty J, Yeh YH, Nattel S, Dobrev D, Eschenhagen T, Carrier L.** (2007) Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-binding protein-C in human and experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 43; 223-9.
- Ely SW., Berne RM.** (1992) Protective effects of adenosine in myocardial ischemia. *Circulation.* 85; 893-904.
- Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ.** (1999) Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96; 7059-64.
- Enserink JM, Christensen AE, de Rooij J, van Triest M, Schwede F, Genieser HG, Doskeland SO, Blank JL, Bos JL.** (2002) A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat Cell Biol.* 4; 901-6.
- Erickson JR, He BJ, Grumbach IM, Anderson ME.** (2011) CaMKII in the cardiovascular system: sensing redox states. *Physiol Rev.* 91; 889-915.
- Erickson JR, Joiner ML, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham AJ, Weiss RM, Spitz DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ, Anderson ME.** (2008) A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell.* 133; 462-74 .
- Espinasse I, Iourgenko V, Defer N, Samson F, Hanoune J, Mercadier JJ.** (1995) Type V, but not type VI, adenylyl cyclase mRNA accumulates in the rat heart during ontogenic development. Correlation with increased global adenylyl cyclase activity. *J Mol Cell Cardiol.* 27; 1789-95.
- Eto Y, Yonekura K, Sonoda M, Arai N, Sata M, Sugiura S, Takenaka K, Gualberto A, Hixon ML, Wagner MW, Aoyagi T.** (2000) Calcineurin is activated in rat hearts with physiological left ventricular hypertrophy induced by voluntary exercise training. *Circulation.* 101; 2134-7.

F

- Fabiato A.** (1983) Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol.* 245; C1-14.
- Feig LA.** (1999) Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat Cell Biol.* 1; E25-7.
- Felker GM., O'Connor CM.** (2001) Inotropic therapy for heart failure: an evidence-based approach. *Am Heart J.* 142; 393-401.

- Ferris CD, Haganir RL, Bredt DS, Cameron AM, Snyder SH.** (1991) Inositol trisphosphate receptor: phosphorylation by protein kinase C and calcium calmodulin-dependent protein kinases in reconstituted lipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88; 2232-5.
- Ferro E., Trabalzini L.** (2010) RalGDS family members couple Ras to Ral signalling and that's not all. *Cell Signal.* 22; 1804-10.
- Fiedler B, Lohmann SM, Smolenski A, Linnemuller S, Pieske B, Schroder F, Molkentin JD, Drexler H, Wollert KC.** (2002) Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99; 11363-8.
- Fiedler B., Wollert KC.** (2005) Targeting calcineurin and associated pathways in cardiac hypertrophy and failure. *Expert Opin Ther Targets.* 9; 963-73.
- Flather MD, Shibata MC, Coats AJ, Van Veldhuisen DJ, Parkhomenko A, Borbola J, Cohen-Solal A, Dumitrascu D, Ferrari R, Lechat P, Soler-Soler J, Tavazzi L, Spinarova L, Toman J, Bohm M, Anker SD, Thompson SG, Poole-Wilson PA.** (2005) Randomized trial to determine the effect of nebivolol on mortality and cardiovascular hospital admission in elderly patients with heart failure (SENIORS). *Eur Heart J.* 26; 215-25.
- Flavahan NA., McGrath JC.** (1981) alpha 1-adrenoceptors can mediate chronotropic responses in the rat heart. *Br J Pharmacol.* 73; 586-8.
- Frank D, Kuhn C, van Eickels M, Gehring D, Hanselmann C, Lippl S, Will R, Katus HA, Frey N.** (2007) Calsarcin-1 protects against angiotensin-II induced cardiac hypertrophy. *Circulation.* 116; 2587-96.
- Freeman K, Lerman I, Kranias EG, Bohlmeier T, Bristow MR, Lefkowitz RJ, Iaccarino G, Koch WJ, Leinwand LA.** (2001) Alterations in cardiac adrenergic signaling and calcium cycling differentially affect the progression of cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 107; 967-74.
- Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA.** (2004) Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation.* 109; 1580-9.
- Frey N, Richardson JA, Olson EN.** (2000) Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97; 14632-7.
- Fuentes JJ, Genesca L, Kingsbury TJ, Cunningham KW, Perez-Riba M, Estivill X, de la Luna S.** (2000) DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. *Hum Mol Genet.* 9; 1681-90.
- Fuentes JJ, Pritchard MA, Estivill X.** (1997) Genomic organization, alternative splicing, and expression patterns of the DSCR1 (Down syndrome candidate region 1) gene. *Genomics.* 44; 358-61.
- Fuller SJ, Gillespie-Brown J, Sugden PH.** (1998) Oncogenic src, raf, and ras stimulate a hypertrophic pattern of gene expression and increase cell size in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem.* 273; 18146-52.

G

Galasso G, De Rosa R, Piscione F, Iaccarino G, Vosa C, Sorriento D, Piccolo R, Rapacciuolo A, Walsh K, Chiariello M. (2010) Myocardial expression of FOXO3a-Atrogin-1 pathway in human heart failure. *Eur J Heart Fail.* 12; 1290-6.

Gardin JM., Lauer MS. (2004) Left ventricular hypertrophy: the next treatable, silent killer? *JAMA.* 292; 2396-8.

Gauthier C, Leblais V, Kobzik L, Trochu JN, Khandoudi N, Bril A, Balligand JL, Le Marec H. (1998) The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest.* 102; 1377-84.

Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. (2001) Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98; 14440-5.

Gorlach J, Fox DS, Cutler NS, Cox GM, Perfect JR, Heitman J. (2000) Identification and characterization of a highly conserved calcineurin binding protein, CBP1/calciressin, in *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J.* 19; 3618-29.

Gregorio CC., Antin PB. (2000) To the heart of myofibril assembly. *Trends Cell Biol.* 10; 355-62.

Grimm M., Brown JH. (2010) Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII. *J Mol Cell Cardiol.* 48; 322-30.

Grupp IL, Lorenz JN, Walsh RA, Boivin GP, Rindt H. (1998) Overexpression of alpha1B-adrenergic receptor induces left ventricular dysfunction in the absence of hypertrophy. *Am J Physiol.* 275; H1338-50.

Gundersen K. (2011) Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 86; 564-600.

Gunkel S, Heineke J, Hilfiker-Kleiner D, Knoll R. (2009) MLP: a stress sensor goes nuclear. *J Mol Cell Cardiol.* 47; 423-5.

H

Hagemann D, Bohlender J, Hoch B, Krause EG, Karczewski P. (2001) Expression of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II delta-subunit isoforms in rats with hypertensive cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biochem.* 220; 69-76.

Hahn HS, Marreez Y, Odley A, Sterbling A, Yussman MG, Hilty KC, Bodi I, Liggett SB, Schwartz A, Dorn GW 2nd. (2003) Protein kinase Calpha negatively regulates systolic and diastolic function in pathological hypertrophy. *Circ Res.* 93; 1111-9.

Hallhuber M, Burkard N, Wu R, Buch MH, Engelhardt S, Hein L, Neyses L, Schuh K, Ritter O. (2006) Inhibition of nuclear import of calcineurin prevents myocardial hypertrophy. *Circ Res.* 99; 626-35.

- Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW.** (1984) Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science*. 226; 544-7.
- Harris IS, Zhang S, Treskov I, Kovacs A, Weinheimer C, Muslin AJ.** (2004) Raf-1 kinase is required for cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival in response to pressure overload. *Circulation*. 110; 718-23.
- Hashimoto Y, Perrino BA, Soderling TR.** (1990) Identification of an autoinhibitory domain in calcineurin. *J Biol Chem*. 265; 1924-7.
- Haunstetter A., Izumo S.** (2000) Future perspectives and potential implications of cardiac myocyte apoptosis. *Cardiovasc Res*. 45; 795-801.
- He Q., LaPointe MC.** (2000) Interleukin-1beta regulates the human brain natriuretic peptide promoter via Ca(2+)-dependent protein kinase pathways. *Hypertension*. 35; 292-6.
- Hein L, Altman JD, Kobilka BK.** (1999) Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature*. 402; 181-4.
- Heineke J., Molkentin JD.** (2006) Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7; 589-600.
- Heineke J., Ritter O.** (2012) Cardiomyocyte calcineurin signaling in subcellular domains: From the sarcolemma to the nucleus and beyond. *J Mol Cell Cardiol*. 52; 62-73.
- Hempel P, Hoch B, Bartel S, Karczewski P.** (2002) Hypertrophic phenotype of cardiac calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is reversed by angiotensin converting enzyme inhibition. *Basic Res Cardiol*. 97 Suppl 1; I96-101.
- Herrmann C.** (2003) Ras-effector interactions: after one decade. *Curr Opin Struct Biol*. 13; 122-9.
- Heymes C, Silvestre JS, Llorens-Cortes C, Chevalier B, Marotte F, Levy BI, Swynghedauw B, Samuel JL.** (1998) Cardiac senescence is associated with enhanced expression of angiotensin II receptor subtypes. *Endocrinology*. 139; 2579-87.
- Hill JA.** (2003) Electrical remodeling in cardiac hypertrophy. *Trends Cardiovasc Med*. 13; 316-22.
- Hill JA., Olson EN.** (2008) Cardiac plasticity. *N Engl J Med*. 358; 1370-80.
- Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P.** (1999) Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*. 84; 713-21.
- Hothi SS, Gurung IS, Heathcote JC, Zhang Y, Booth SW, Skepper JN, Grace AA, Huang CL.** (2008) Epac activation, altered calcium homeostasis and ventricular arrhythmogenesis in the murine heart. *Pflugers Arch*. 457; 253-70.
- Howe CJ, Lahair MM, McCubrey JA, Franklin RA.** (2004) Redox regulation of the calcium/calmodulin-dependent protein kinases. *J Biol Chem*. 279; 44573-81.

Hubbard KB., Hepler JR. (2006) Cell signalling diversity of the Gqalpha family of heterotrimeric G proteins. *Cell Signal.* 18 ; 135-50.

Hunter JJ., Chien KR. (1999) Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med.* 341; 1276-83.

Hunter JJ, Tanaka N, Rockman HA, Ross J Jr, Chien KR. (1995) Ventricular expression of a MLC-2 ν -ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice. *J Biol Chem.* 270; 23173-8.

I

Iaccarino G, Keys JR, Rapacciuolo A, Shotwell KF, Lefkowitz RJ, Rockman HA, Koch WJ. (2001) Regulation of myocardial betaARK1 expression in catecholamine-induced cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing alpha1B-adrenergic receptors. *J Am Coll Cardiol.* 38; 534-40.

Ichida M., Finkel T. (2001) Ras regulates NFAT3 activity in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 276; 3524-30.

Iemitsu M, Maeda S, Miyauchi T, Matsuda M, Tanaka H. (2005) Gene expression profiling of exercise-induced cardiac hypertrophy in rats. *Acta Physiol Scand.* 185; 259-70.

Inagaki K, Chen L, Ikeno F, Lee FH, Imahashi K, Bouley DM, Rezaee M, Yock PG, Murphy E, Mochly-Rosen D. (2003) Inhibition of delta-protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo. *Circulation.* 108; 2304-7 .

Ishida A, Shigeri Y, Taniguchi T, Kameshita I. (2003) Protein phosphatases that regulate multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases: from biochemistry to pharmacology. *Pharmacol Ther.* 100; 291-305.

J

Jaski BE, Jessup ML, Mancini DM, Cappola TP, Pauly DF, Greenberg B, Borow K, Dittrich H, Zsebo KM, Hajjar RJ. (2009) Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID Trial), a first-in-human phase 1/2 clinical trial. *J Card Fail.* 15; 171-81.

Jensen BC, Swigart PM, De Marco T, Hoopes C, Simpson PC. (2009) {alpha}1-Adrenergic receptor subtypes in nonfailing and failing human myocardium. *Circ Heart Fail.* 2; 654-63.

Jeong D, Kim JM, Cha H, Oh JG, Park J, Yun SH, Ju ES, Jeon ES, Hajjar RJ, Park WJ. (2008) PICOT attenuates cardiac hypertrophy by disrupting calcineurin-NFAT signaling. *Circ Res.* 102; 711-9.

K

Kai H, Muraishi A, Sugiu Y, Nishi H, Seki Y, Kuwahara F, Kimura A, Kato H, Imaizumi T. (1998) Expression of proto-oncogenes and gene mutation of sarcomeric proteins in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res.* 83; 594-601.

- Kaibori M, Okumura T, Ito S, Oda M, Inoue T, Kamiyama Y.** (1999) Inhibition of iNOS induction by FK506, but not by cyclosporine, in rat hepatocytes. *Transplant Proc.* 31; 804-5.
- Kamenetsky M, Middelhaufe S, Bank EM, Levin LR, Buck J, Steegborn C.** (2006) Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. *J Mol Biol.* 362; 623-39.
- Kang PM., Izumo S.** (2000) Apoptosis and heart failure: A critical review of the literature. *Circ Res.* 86; 1107-13.
- Kashishian A, Howard M, Loh C, Gallatin WM, Hoekstra MF, Lai Y.** (1998) AKAP79 inhibits calcineurin through a site distinct from the immunophilin-binding region. *J Biol Chem.* 273; 27412-9.
- Kasler HG, Victoria J, Duramad O, Winoto A.** (2000) ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol.* 20; 8382-9.
- Kawai M, Kawashima S, Sakoda T, Toh R, Kikuchi A, Yamauchi-Takahara K, Kunisada K, Yokoyama M.** (2003) Ral GDP dissociation stimulator and Ral GTPase are involved in myocardial hypertrophy. *Hypertension.* 41; 956-62.
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM.** (1998) A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science.* 282; 2275-9.
- Khokhlatchev A, Rabizadeh S, Xavier R, Nedwidek M, Chen T, Zhang XF, Seed B, Avruch J.** (2002) Identification of a novel Ras-regulated proapoptotic pathway. *Curr Biol.* 12; 253-65.
- Kim MJ, Jo DG, Hong GS, Kim BJ, Lai M, Cho DH, Kim KW, Bandyopadhyay A, Hong YM, Kim DH, Cho C, Liu JO, Snyder SH, Jung YK.** (2002) Calcipain-dependent cleavage of cain/cabin1 activates calcineurin to mediate calcium-triggered cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99; 9870-5.
- Kim Y, Phan D, van Rooij E, Wang DZ, McAnally J, Qi X, Richardson JA, Hill JA, Bassel-Duby R, Olson EN.** (2008) The MEF2D transcription factor mediates stress-dependent cardiac remodeling in mice. *J Clin Invest.* 118; 124-32.
- Kingsbury TJ., Cunningham KW.** (2000) A conserved family of calcineurin regulators. *Genes Dev.* 14; 1595-604.
- Kirchhefer U, Schmitz W, Scholz H, Neumann J.** (1999) Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res.* 42; 254-61.
- Klee CB, Crouch TH, Krinks MH.** (1979) Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76; 6270-3.
- Knowlton KU, Michel MC, Itani M, Shubeita HE, Ishihara K, Brown JH, Chien KR.** (1993) The alpha 1A-adrenergic receptor subtype mediates biochemical, molecular, and morphologic features of cultured myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem.* 268; 15374-80.

Kohout TA, Takaoka H, McDonald PH, Perry SJ, Mao L, Lefkowitz RJ, Rockman HA. (2001) Augmentation of cardiac contractility mediated by the human beta(3)-adrenergic receptor overexpressed in the hearts of transgenic mice. *Circulation*. 104; 2485-91.

Kuriyama M, Matsushita M, Tateishi A, Moriwaki A, Tomizawa K, Ishino K, Sano S, Matsui H. (2006) A cell-permeable NFAT inhibitor peptide prevents pressure-overload cardiac hypertrophy. *Chem Biol Drug Des*. 67; 238-43.

Kuschel M, Zhou YY, Spurgeon HA, Bartel S, Karczewski P, Zhang SJ, Krause EG, Lakatta EG, Xiao RP. (1999) beta2-adrenergic cAMP signaling is uncoupled from phosphorylation of cytoplasmic proteins in canine heart. *Circulation*. 99; 2458-65.

L

Lai MM, Burnett PE, Wolosker H, Blackshaw S, Snyder SH. (1998) Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin. *J Biol Chem*. 273; 18325-31.

LaMorte VJ, Thorburn J, Absher D, Spiegel A, Brown JH, Chien KR, Feramisco JR, Knowlton KU. (1994) Gq- and ras-dependent pathways mediate hypertrophy of neonatal rat ventricular myocytes following alpha 1-adrenergic stimulation. *J Biol Chem*. 269; 13490-6.

Landzberg JS, Parker JD, Gauthier DF, Colucci WS. (1991) Effects of myocardial alpha 1-adrenergic receptor stimulation and blockade on contractility in humans. *Circulation*. 84; 1608-14.

Latif R, Graves P, Davies TF. (2001) Oligomerization of the human thyrotropin receptor: fluorescent protein-tagged hTSHR reveals post-translational complexes. *J Biol Chem*. 276; 45217-24.

Layland J, Solaro RJ, Shah AM. (2005) Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovasc Res*. 66; 12-21.

Le Guludec D, Cohen-Solal A, Delforge J, Delahaye N, Syrota A, Merlet P. (1997) Increased myocardial muscarinic receptor density in idiopathic dilated cardiomyopathy: an in vivo PET study. *Circulation*. 96 ; 3416-22.

Leahy KP, Davies KJ, Dull M, Kort JJ, Lawrence KW, Crawford DR. (1999) adapt78, a stress-inducible mRNA, is related to the glucose-regulated protein family of genes. *Arch Biochem Biophys*. 368; 67-74.

Leenders JJ, Pinto YM, Creemers EE. (2011) Tapping the brake on cardiac growth-endogenous repressors of hypertrophic signaling. *J Mol Cell Cardiol*. 51; 156-67.

Leimbach WN Jr, Wallin BG, Victor RG, Aylward PE, Sundlof G, Mark AL. (1986) Direct evidence from intraneural recordings for increased central sympathetic outflow in patients with heart failure. *Circulation*. 73; 913-9.

Lemire I, Ducharme A, Tardif JC, Poulin F, Jones LR, Allen BG, Hebert TE, Rindt H. (2001) Cardiac-directed overexpression of wild-type alpha1B-adrenergic receptor induces dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 281; H931-8.

- Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KK, Murabito JM, Vasan RS.** (2002) Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med.* 347; 1397-402.
- Lezoualc'h F, Metrich M, Hmitou I, Duquesnes N, Morel E.** (2008) Small GTP-binding proteins and their regulators in cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 44; 623-32.
- Li H, Rao A, Hogan PG.** (2004a) Structural delineation of the calcineurin-NFAT interaction and its parallels to PP1 targeting interactions. *J Mol Biol.* 342; 1659-74.
- Li HH, Kedar V, Zhang C, McDonough H, Arya R, Wang DZ, Patterson C.** (2004b) Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. *J Clin Invest.* 114; 1058-71.
- Liang Q., Molkentin JD.** (2003) Redefining the roles of p38 and JNK signaling in cardiac hypertrophy: dichotomy between cultured myocytes and animal models. *J Mol Cell Cardiol.* 35; 1385-94.
- Liggett SB, Freedman NJ, Schwinn DA, Lefkowitz RJ.** (1993) Structural basis for receptor subtype-specific regulation revealed by a chimeric beta 3/beta 2-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90; 3665-9.
- Liggett SB, Tepe NM, Lorenz JN, Canning AM, Jantz TD, Mitarai S, Yatani A, Dorn GW 2nd.** (2000) Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation.* 101; 1707-14.
- Limbird LE.** (1988) Receptors linked to inhibition of adenylate cyclase: additional signaling mechanisms. *FASEB J.* 2; 2686-95.
- Lin F, Owens WA, Chen S, Stevens ME, Kesteven S, Arthur JF, Woodcock EA, Feneley MP, Graham RM.** (2001) Targeted alpha(1A)-adrenergic receptor overexpression induces enhanced cardiac contractility but not hypertrophy. *Circ Res.* 89; 343-50.
- Link RE, Desai K, Hein L, Stevens ME, Chruscinski A, Bernstein D, Barsh GS, Kobilka BK.** (1996) Cardiovascular regulation in mice lacking alpha2-adrenergic receptor subtypes b and c. *Science.* 273; 803-5.
- Linke WA.** (2008) Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovasc Res.* 77; 637-48.
- Liu C, Wang H, Zhao Z, Yu S, Lu YB, Meyer J, Chatterjee G, Deschamps S, Roe BA, Lengyel P.** (2000) MyoD-dependent induction during myoblast differentiation of p204, a protein also inducible by interferon. *Mol Cell Biol.* 20; 7024-36.
- Liu JO.** (2009) Calmodulin-dependent phosphatase, kinases, and transcriptional corepressors involved in T-cell activation. *Immunol Rev.* 228; 184-98.
- Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH.** (2000) Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci.* 113 (Pt 20); 3563-71.
- Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T.** (2003) What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res.* 93; 896-906.

Lowes BD, Gilbert EM, Abraham WT, Minobe WA, Larrabee P, Ferguson D, Wolfel EE, Lindenfeld J, Tsvetkova T, Robertson AD, Quaife RA, Bristow MR. (2002) Myocardial gene expression in dilated cardiomyopathy treated with beta-blocking agents. *N Engl J Med.* 346; 1357-65.

Lu J, McKinsey TA, Nicol RL, Olson EN. (2000) Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97; 4070-5.

Luan Y, Lengyel P, Liu CJ. (2008) p204, a p200 family protein, as a multifunctional regulator of cell proliferation and differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19; 357-69.

M

MacDonald E, Kobilka BK, Scheinin M. (1997) Gene targeting--homing in on alpha 2-adrenoceptor-subtype function. *Trends Pharmacol Sci.* 18; 211-9.

MacDonnell SM, Kubo H, Harris DM, Chen X, Berretta R, Barbe MF, Kolwicz S, Reger PO, Eckhart A, Renna BF, Koch WJ, Houser SR, Libonati JR. (2007) Calcineurin inhibition normalizes beta-adrenergic responsiveness in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293; H3122-9.

MacDonnell SM, Weisser-Thomas J, Kubo H, Hanscome M, Liu Q, Jaleel N, Berretta R, Chen X, Brown JH, Sabri AK, Molkentin JD, Houser SR. (2009) CaMKII negatively regulates calcineurin-NFAT signaling in cardiac myocytes. *Circ Res.* 105; 316-25.

Madamanchi A. (2007) Beta-adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure. *Mcgill J Med.* 10; 99-104.

Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM. (2003) Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circ Res.* 92; 904-11.

Maillet M, Davis J, Auger-Messier M, York A, Osinska H, Piquereau J, Lorenz JN, Robbins J, Ventura-Clapier R, Molkentin JD. (2010) Heart-specific deletion of CnB1 reveals multiple mechanisms whereby calcineurin regulates cardiac growth and function. *J Biol Chem.* 285; 6716-24.

Mangoni ME., Nargeot J. (2008) Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev.* 88; 919-82.

Mattiazzi A. (1997) Positive inotropic effect of angiotensin II. Increases in intracellular Ca²⁺ or changes in myofilament Ca²⁺ responsiveness? *J Pharmacol Toxicol Methods.* 37; 205-14.

McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. (2002) MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem Sci.* 27; 40-7.

Mendez M., LaPointe MC. (2002) Trophic effects of the cyclooxygenase-2 product prostaglandin E(2) in cardiac myocytes. *Hypertension.* 39; 382-8.

- Mercadier JJ, Samuel JL, Michel JB, Zongazo MA, de la Bastie D, Lompre AM, Wisnewsky C, Rappaport L, Levy B, Schwartz K.** (1989) Atrial natriuretic factor gene expression in rat ventricle during experimental hypertension. *Am J Physiol.* 257; H979-87.
- Metrich M, Berthouze M, Morel E, Crozatier B, Gomez AM, Lezoualc'h F.** (2010) Role of the cAMP-binding protein Epac in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pflugers Arch.* 459; 535-46.
- Metrich M, Lucas A, Gastineau M, Samuel JL, Heymes C, Morel E, Lezoualc'h F.** (2008) Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res.* 102; 959-65.
- Meyer S, Kohler NG, Joly A.** (1997) Cyclosporine A is an uncompetitive inhibitor of proteasome activity and prevents NF-kappaB activation. *FEBS Lett.* 413; 354-8.
- Milano CA, Allen LF, Rockman HA, Dolber PC, McMinn TR, Chien KR, Johnson TD, Bond RA, Lefkowitz RJ.** (1994a) Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science.* 264; 582-6.
- Milano CA, Dolber PC, Rockman HA, Bond RA, Venable ME, Allen LF, Lefkowitz RJ.** (1994b) Myocardial expression of a constitutively active alpha 1B-adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91; 10109-13.
- Minneman KP.** (1988) Alpha 1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca²⁺. *Pharmacol Rev.* 40; 87-119.
- Miyata S, Minobe W, Bristow MR, Leinwand LA.** (2000) Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circ Res.* 86; 386-90.
- Mochly-Rosen D, Wu G, Hahn H, Osinska H, Liron T, Lorenz JN, Yatani A, Robbins J, Dorn GW 2nd.** (2000) Cardioprotective effects of protein kinase C epsilon: analysis by in vivo modulation of PKCepsilon translocation. *Circ Res.* 86; 1173-9.
- Moens AL, Yang R, Watts VL, Barouch LA.** (2010) Beta 3-adrenoreceptor regulation of nitric oxide in the cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol.* 48; 1088-95.
- Molenaar P, Sarsero D, Kaumann AJ.** (1997) Proposal for the interaction of non-conventional partial agonists and catecholamines with the 'putative beta 4-adrenoceptor' in mammalian heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 24; 647-56.
- Molkentin JD.** (2004) Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res.* 63; 467-75.
- Molkentin JD, Black BL, Martin JF, Olson EN.** (1996) Mutational analysis of the DNA binding, dimerization, and transcriptional activation domains of MEF2C. *Mol Cell Biol.* 16; 2627-36.
- Molkentin JD., Dorn GW 2nd.** (2001a) Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol.* 63; 391-426.

Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. 93; 215-28.

Molkentin JD., Robbins J. (2009) With great power comes great responsibility: using mouse genetics to study cardiac hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol*. 46; 130-6.

Moniotte S, Kobzik L, Feron O, Trochu JN, Gauthier C, Balligand JL. (2001) Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation*. 103; 1649-55.

Morel E, Marcantoni A, Gastineau M, Birkedal R, Rochais F, Garnier A, Lompre AM, Vandecasteele G, Lezoualc'h F. (2005) cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res*. 97; 1296-304.

Morgan BJ, Lyson T, Scherrer U, Victor RG. (1991) Cyclosporine causes sympathetically mediated elevations in arterial pressure in rats. *Hypertension*. 18; 458-66.

N

Namgaladze D, Hofer HW, Ullrich V. (2002) Redox control of calcineurin by targeting the binuclear Fe(2+)-Zn(2+) center at the enzyme active site. *J Biol Chem*. 277; 5962-9 .

Naruse K., King GL. (2000) Protein kinase C and myocardial biology and function. *Circ Res*. 86; 1104-6.

Neal JW., Clipstone NA. (2001) Glycogen synthase kinase-3 inhibits the DNA binding activity of NFATc. *J Biol Chem*. 276; 3666-73.

Neri Serneri GG, Boddi M, Modesti PA, Cecioni I, Coppo M, Padeletti L, Michelucci A, Colella A, Galanti G. (2001) Increased cardiac sympathetic activity and insulin-like growth factor-I formation are associated with physiological hypertrophy in athletes. *Circ Res*. 89; 977-82.

Nichols CB, Rossow CF, Navedo MF, Westenbroek RE, Catterall WA, Santana LF, McKnight GS. (2010) Sympathetic stimulation of adult cardiomyocytes requires association of AKAP5 with a subpopulation of L-type calcium channels. *Circ Res*. 107; 747-56 .

Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cave H, Verloes A, Okamoto N, Hennekam RC, Gillessen-Kaesbach G, Wiczorek D, Kavamura MI, Kurosawa K, Ohashi H, Wilson L, Heron D, Bonneau D, Corona G, Kaname T, Naritomi K, Baumann C, Matsumoto N, Kato K, Kure S, Matsubara Y. (2006) Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat Genet*. 38; 294-6.

Niwano K, Arai M, Koitabashi N, Watanabe A, Ikeda Y, Miyoshi H, Kurabayashi M. (2008) Lentiviral vector-mediated SERCA2 gene transfer protects against heart failure and left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Mol Ther*. 16; 1026-32.

Nurrish SJ., Treisman R. (1995) DNA binding specificity determinants in MADS-box transcription factors. *Mol Cell Biol*. 15; 4076-85.

O

O'Connell TD, Ishizaka S, Nakamura A, Swigart PM, Rodrigo MC, Simpson GL, Cotecchia S, Rokosh DG, Grossman W, Foster E, Simpson PC. (2003) The alpha(1A/C)- and alpha(1B)-adrenergic receptors are required for physiological cardiac hypertrophy in the double-knockout mouse. *J Clin Invest.* 111; 1783-91.

O'Connell TD, Swigart PM, Rodrigo MC, Ishizaka S, Joho S, Turnbull L, Tecott LH, Baker AJ, Foster E, Grossman W, Simpson PC. (2006) Alpha1-adrenergic receptors prevent a maladaptive cardiac response to pressure overload. *J Clin Invest.* 116; 1005-15.

Oceandy D, Cartwright EJ, Neyses L. (2009a) Ras-association domain family member 1A (RASSF1A)-where the heart and cancer meet. *Trends Cardiovasc Med.* 19; 262-7.

Oceandy D, Pickard A, Prehar S, Zi M, Mohamed TM, Stanley PJ, Baudoin-Stanley F, Nadif R, Tommasi S, Pfeifer GP, Armesilla AL, Cartwright EJ, Neyses L. (2009b) Tumor suppressor Ras-association domain family 1 isoform A is a novel regulator of cardiac hypertrophy. *Circulation.* 120; 607-16.

Oestreich EA, Malik S, Goonasekera SA, Blaxall BC, Kelley GG, Dirksen RT, Smrcka AV. (2009) Epac and phospholipase Cepsilon regulate Ca²⁺ release in the heart by activation of protein kinase Cepsilon and calcium-calmodulin kinase II. *J Biol Chem.* 284; 1514-22.

Oestreich EA, Wang H, Malik S, Kaproth-Joslin KA, Blaxall BC, Kelley GG, Dirksen RT, Smrcka AV. (2007) Epac-mediated activation of phospholipase C(epsilon) plays a critical role in beta-adrenergic receptor-dependent enhancement of Ca²⁺ mobilization in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 282; 5488-95.

Ortiz-Vega S, Khokhlatchev A, Nedwidek M, Zhang XF, Dammann R, Pfeifer GP, Avruch J. (2002) The putative tumor suppressor RASSF1A homodimerizes and heterodimerizes with the Ras-GTP binding protein Nore1. *Oncogene.* 21; 1381-90.

P

Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH. (1996) The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med.* 334; 1349-55.

Pan F, Means AR, Liu JO. (2005) Calmodulin-dependent protein kinase IV regulates nuclear export of Cabin1 during T-cell activation. *EMBO J.* 24; 2104-13.

Pan F, Sun L, Kardian DB, Whartenby KA, Pardoll DM, Liu JO. (2007a) Feedback inhibition of calcineurin and Ras by a dual inhibitory protein Carabin. *Nature.* 445; 433-6.

Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio LA, Carta C, Oishi K, Martinelli S, Pogna EA, Schackwitz W, Ustaszewska A, Landstrom A, Bos JM, Ommen SR, Esposito G, Lepri F, Faul C, Mundel P, Lopez Sigüero JP, Tenconi R, Selicorni A, Rossi C, Mazzanti L, Torrente I, Marino B, Digilio MC, Zampino G, Ackerman MJ, Dallapiccola B, Tartaglia M, Gelb BD. (2007) Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet.* 39; 1007-12.

Pannekoek WJ, Kooistra MR, Zwartkruis FJ, Bos JL. (2009) Cell-cell junction formation: the role of Rap1 and Rap1 guanine nucleotide exchange factors. *Biochim Biophys Acta.* 1788; 790-6.

Parker JD, Newton GE, Landzberg JS, Floras JS, Colucci WS. (1995) Functional significance of presynaptic alpha-adrenergic receptors in failing and nonfailing human left ventricle. *Circulation.* 92; 1793-800.

Passier R, Zeng H, Frey N, Naya FJ, Nicol RL, McKinsey TA, Overbeek P, Richardson JA, Grant SR, Olson EN. (2000) CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J Clin Invest.* 105; 1395-406.

Patterson AJ, Zhu W, Chow A, Agrawal R, Kosek J, Xiao RP, Kobilka B. (2004a) Protecting the myocardium: a role for the beta2 adrenergic receptor in the heart. *Crit Care Med.* 32; 1041-8.

Paulsson AK, Franklin S, Mitchell-Jordan SA, Ren S, Wang Y, Vondriska TM. (2010) Post-translational regulation of calstabin-1 during pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 48; 1206-14.

Penninga L, Moller CH, Gustafsson F, Steinbruchel DA, Glud C. (2010) Tacrolimus versus cyclosporine as primary immunosuppression after heart transplantation: systematic review with meta-analyses and trial sequential analyses of randomised trials. *Eur J Clin Pharmacol.* 66; 1177-87.

Pereira L, Metrich M, Fernandez-Velasco M, Lucas A, Leroy J, Perrier R, Morel E, Fischmeister R, Richard S, Benitah JP, Lezoualc'h F, Gomez AM. (2007) The cAMP binding protein Epac modulates Ca²⁺ sparks by a Ca²⁺/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes. *J Physiol.* 583; 685-94.

Perez DM., Doze VA. (2011) Cardiac and neuroprotection regulated by alpha(1)-adrenergic receptor subtypes. *J Recept Signal Transduct Res.* 31; 98-110.

Perrone MG., Scilimati A. (2011) beta(3)-Adrenoceptor ligand development history through patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 21; 505-36.

Petrich BG., Wang Y. (2004) Stress-activated MAP kinases in cardiac remodeling and heart failure; new insights from transgenic studies. *Trends Cardiovasc Med.* 14; 50-5.

Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M. (2003) Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 348; 1309-21.

Pluim BM, Zwinderman AH, van der Laarse A, van der Wall EE. (2000) The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation.* 101; 336-44 .

Politino M., King MM. (1987) Calcium- and calmodulin-sensitive interactions of calcineurin with phospholipids. *J Biol Chem.* 262; 10109-13.

Port JD., Bristow MR. (2001) Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 33; 887-905.

Porter Ke., Turner NA. (2009) Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacology & therapeutics.* 123; 255-278.

Potthoff MJ., Olson EN. (2007) MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development.* 134; 4131-40.

Proud CG. (2004) Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 63; 403-13.

Pu WT, Ma Q, Izumo S. (2003) NFAT transcription factors are critical survival factors that inhibit cardiomyocyte apoptosis during phenylephrine stimulation in vitro. *Circ Res.* 92; 725-31.

Purcell NH, Darwis D, Bueno OF, Muller JM, Schule R, Molkenin JD. (2004) Extracellular signal-regulated kinase 2 interacts with and is negatively regulated by the LIM-only protein FHL2 in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol.* 24; 1081-95.

Purcell NH, Wilkins BJ, York A, Saba-El-Leil MK, Meloche S, Robbins J, Molkenin JD. (2007) Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104; 14074-9.

R

Ramirez MT, Zhao XL, Schulman H, Brown JH. (1997) The nuclear deltaB isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates atrial natriuretic factor gene expression in ventricular myocytes. *J Biol Chem.* 272; 31203-8.

Ranger AM, Grusby MJ, Hodge MR, Gravallesse EM, de la Brousse FC, Hoey T, Mickanin C, Baldwin HS, Glimcher LH. (1998) The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature.* 392; 186-90.

Rapacciuolo A, Esposito G, Caron K, Mao L, Thomas SA, Rockman HA. (2001) Important role of endogenous norepinephrine and epinephrine in the development of in vivo pressure-overload cardiac hypertrophy. *J Am Coll Cardiol.* 38; 876-82.

Rhee SG. (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem.* 70; 281-312.

Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, Benaiche A, Isnard R, Dubourg O, Burban M, Gueffet JP, Millaire A, Desnos M, Schwartz K, Hainque B, Komajda M. (2003) Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation.* 107; 2227-32.

Rodriguez-Viciano P, Tetsu O, Tidyman WE, Estep AL, Conger BA, Cruz MS, McCormick F, Rauen KA. (2006) Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science.* 311; 1287-90.

Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J. (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature.* 370; 527-32.

Rohrer DK, Desai KH, Jasper JR, Stevens ME, Regula DP Jr, Barsh GS, Bernstein D, Kobilka BK. (1996) Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93; 7375-80.

Rorabaugh BR, Ross SA, Gaivin RJ, Papay RS, McCune DF, Simpson PC, Perez DM. (2005) alpha1A- but not alpha1B-adrenergic receptors precondition the ischemic heart by a staurosporine-sensitive, chelerythrine-insensitive mechanism. *Cardiovasc Res.* 65; 436-45.

Rothermel B, Vega RB, Yang J, Wu H, Bassel-Duby R, Williams RS. (2000) A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *J Biol Chem.* 275; 8719-25.

Rothermel BA, McKinsey TA, Vega RB, Nicol RL, Mammen P, Yang J, Antos CL, Shelton JM, Bassel-Duby R, Olson EN, Williams RS. (2001) Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98; 3328-33.

Rothermel BA, Vega RB, Williams RS. (2003) The role of modulatory calcineurin-interacting proteins in calcineurin signaling. *Trends Cardiovasc Med.* 13; 15-21.

Ruan H, Mitchell S, Vainoriene M, Lou Q, Xie LH, Ren S, Goldhaber JJ, Wang Y. (2007) Gi alpha 1-mediated cardiac electrophysiological remodeling and arrhythmia in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 116; 596-605.

Ruffolo RR Jr, Nichols AJ, Stadel JM, Hieble JP. (1991) Structure and function of alpha-adrenoceptors. *Pharmacol Rev.* 43; 475-505.

Rump LC, Riera-Knorrenschild G, Schwertfeger E, Bohmann C, Spillner G, Schollmeyer P. (1995) Dopaminergic and alpha-adrenergic control of neurotransmission in human right atrium. *J Cardiovasc Pharmacol.* 26; 462-70.

Rusnak F., Mertz P. (2000) Calcineurin: form and function. *Physiol Rev.* 80; 1483-521.

S

Salazar NC, Chen J, Rockman HA. (2007) Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochim Biophys Acta.* 1768 ; 1006-18.

Sanna B, Brandt EB, Kaiser RA, Pfluger P, Witt SA, Kimball TR, van Rooij E, De Windt LJ, Rothenberg ME, Tschop MH, Benoit SC, Molkentin JD. (2006) Modulatory calcineurin-interacting proteins 1 and 2 function as calcineurin facilitators in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103; 7327-32.

Sanna B, Bueno OF, Dai YS, Wilkins BJ, Molkentin JD. (2005) Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth. *Mol Cell Biol.* 25; 865-78.

Schmidt M, Evellin S, Weernink PA, von Dorp F, Rehmann H, Lomasney JW, Jakobs KH. (2001) A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase. *Nat Cell Biol.* 3; 1020-4.

- Schmidt M, Sand C, Jakobs KH, Michel MC, Weernink PA.** (2007) Epac and the cardiovascular system. *Curr Opin Pharmacol.* 7; 193-200.
- Schubbert S, Shannon K, Bollag G.** (2007) Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer.* 7; 295-308.
- Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH.** (1990) Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J Clin Invest.* 86; 1913-20.
- Schwartz K, de la Bastie D, Bouveret P, Oliviero P, Alonso S, Buckingham M.** (1986) Alpha-skeletal muscle actin mRNA's accumulate in hypertrophied adult rat hearts. *Circ Res.* 59; 551-5.
- Sernerri GG, Boddi M, Cecioni I, Vanni S, Coppo M, Papa ML, Bandinelli B, Bertolozzi I, Polidori G, Toscano T, Maccherini M, Modesti PA.** (2001) Cardiac angiotensin II formation in the clinical course of heart failure and its relationship with left ventricular function. *Circ Res.* 88; 961-8.
- Seyer P, Grandemange S, Pessemesse L, Casas F, Cabello G, Wrutniak-cabello C.** (2006) l'activité mitochondriale est un régulateur majeur de la différenciation des myoblastes et de l'expression des isoformes de myosines *INRA Prod. Anim.*, 19 (4) 279-286
- Shannon R., Chaudhry M.** (2006) Effect of alpha1-adrenergic receptors in cardiac pathophysiology. *Am Heart J.* 152; 842-50.
- Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME.** (1991) CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science.* 252; 1427-30.
- Shibasaki F, Price ER, Milan D, McKeon F.** (1996) Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature.* 382; 370-3.
- Shimoyama M, Hayashi D, Takimoto E, Zou Y, Oka T, Uozumi H, Kudoh S, Shibasaki F, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I.** (1999) Calcineurin plays a critical role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Circulation.* 100; 2449-54.
- Silberbach M, Gorenc T, Hershberger RE, Stork PJ, Steyger PS, Roberts CT Jr.** (1999) Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for the anti-hypertrophic effect of atrial natriuretic factor in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem.* 274; 24858-64.
- Simpson P, McGrath A, Savion S.** (1982) Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circ Res.* 51; 787-801 .
- Simpson PC, Kariya K, Karns LR, Long CS, Karliner JS.** (1991) Adrenergic hormones and control of cardiac myocyte growth. *Mol Cell Biochem.* 104; 35-43.
- Singer HA, Bencotter HA, Schworer CM.** (1997) Novel Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II gamma-subunit variants expressed in vascular smooth muscle, brain, and cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 272; 9393-400.

Skeberdis VA. (2004) Structure and function of beta3-adrenergic receptors. *Medicina (Kaunas)*. 40; 407-13.

Skeberdis VA, Gendviliene V, Zablockaite D, Treinys R, Macianskiene R, Bogdelis A, Jurevicius J, Fischmeister R. (2008) beta3-adrenergic receptor activation increases human atrial tissue contractility and stimulates the L-type Ca²⁺ current. *J Clin Invest*. 118; 3219-27.

Skelding KA, Rostas JA, Verrills NM. (2011) Controlling the cell cycle: the role of calcium/calmodulin-stimulated protein kinases I and II. *Cell Cycle*. 10; 631-9.

Somekawa S, Fukuhara S, Nakaoka Y, Fujita H, Saito Y, Mochizuki N. (2005) Enhanced functional gap junction neofunction by protein kinase A-dependent and Epac-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes. *Circ Res*. 97; 655-62.

Sossalla S, Fluschnik N, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T, Wittkopper K, Renner A, Schmitto JD, Gummert J, El-Armouche A, Hasenfuss G, Maier LS. (2010) Inhibition of elevated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circ Res*. 107; 1150-61.

Starksen NF, Simpson PC, Bishopric N, Coughlin SR, Lee WM, Escobedo JA, Williams LT. (1986) Cardiac myocyte hypertrophy is associated with c-myc protooncogene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83; 8348-50.

Sucharov CC, Mariner PD, Nunley KR, Long C, Leinwand L, Bristow MR. (2006) A beta1-adrenergic receptor CaM kinase II-dependent pathway mediates cardiac myocyte fetal gene induction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 291; H1299-308.

Sun L, Youn HD, Loh C, Stolow M, He W, Liu JO. (1998) Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity*. 8; 703-11.

Sussman MA, Lim HW, Gude N, Taigen T, Olson EN, Robbins J, Colbert MC, Gualberto A, Wiczorek DF, Molkentin JD. (1998) Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science*. 281; 1690-3.

Swynghedauw B. (1999) Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev*. 79; 215-62.

Swynghedauw B. (2006) Phenotypic plasticity of adult myocardium: molecular mechanisms. *J Exp Biol*. 209; 2320-7.

Szjgyarto Z, Szucs K, Kovacs I, Zakany R, Sipka S, Gergely P. (2007) The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of calcineurin activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Int J Mol Med*. 20; 359-64.

T

Taigen T, De Windt LJ, Lim HW, Molkentin JD. (2000) Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97; 1196-201.

Takeishi Y, Ping P, Bolli R, Kirkpatrick DL, Hoit BD, Walsh RA. (2000) Transgenic overexpression of constitutively active protein kinase C epsilon causes concentric cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 86; 1218-23.

Tanoue A, Koshimizu TA, Tsujimoto G. (2002) Transgenic studies of alpha(1)-adrenergic receptor subtype function. *Life Sci.* 71; 2207-15.

Tavernier G, Toumaniantz G, Erfanian M, Heymann MF, Laurent K, Langin D, Gauthier C. (2003) beta3-Adrenergic stimulation produces a decrease of cardiac contractility ex vivo in mice overexpressing the human beta3-adrenergic receptor. *Cardiovasc Res.* 59; 288-96.

Thorburn A, Thorburn J, Chen SY, Powers S, Shubeita HE, Feramisco JR, Chien KR. (1993) HRas-dependent pathways can activate morphological and genetic markers of cardiac muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem.* 268; 2244-9.

Tilley DG., Rockman HA. (2006) Role of beta-adrenergic receptor signaling and desensitization in heart failure: new concepts and prospects for treatment. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 4; 417-32.

Tortora GJ., Grabowski SR. (1994) Principes d'anatomie et de physiologie. *Broché*

Towbin JA., Bowles NE. (2002) The failing heart. *Nature.* 415; 227-33.

U

Ulucan C, Wang X, Baljinyam E, Bai Y, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Hirotani S, Ishikawa Y. (2007) Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293; H1662-72.

V

van Berlo JH, Elrod JW, Aronow BJ, Pu WT, Molkenin JD. (2011) Serine 105 phosphorylation of transcription factor GATA4 is necessary for stress-induced cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108; 12331-6.

van Oort RJ, van Rooij E, Bourajjaj M, Schimmel J, Jansen MA, van der Nagel R, Doevendans PA, Schneider MD, van Echteld CJ, De Windt LJ. (2006) MEF2 activates a genetic program promoting chamber dilation and contractile dysfunction in calcineurin-induced heart failure. *Circulation.* 114; 298-308.

van Wamel AJ, Ruwhof C, van der Valk-Kokshoom LE, Schrier PI, van der Laarse A. (2001) The role of angiotensin II, endothelin-1 and transforming growth factor-beta as autocrine/paracrine mediators of stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Mol Cell Biochem.* 218; 113-24.

Varghese P, Harrison RW, Lofthouse RA, Georgakopoulos D, Berkowitz DE, Hare JM. (2000) beta(3)-adrenoceptor deficiency blocks nitric oxide-dependent inhibition of myocardial contractility. *J Clin Invest.* 106; 697-703.

Vecchione C, Fratta L, Rizzoni D, Notte A, Poulet R, Porteri E, Frati G, Guelfi D, Trimarco V, Mulvany MJ, Agabiti-Rosei E, Trimarco B, Cotecchia S, Lembo G. (2002) Cardiovascular influences of alpha1b-adrenergic receptor defect in mice. *Circulation.* 105; 1700-7.

Vega RB, Rothermel BA, Weinheimer CJ, Kovacs A, Naseem RH, Bassel-Duby R, Williams RS, Olson EN. (2003) Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100; 669-74.

Vega RB, Yang J, Rothermel BA, Bassel-Duby R, Williams RS. (2002) Multiple domains of MCIP1 contribute to inhibition of calcineurin activity. *J Biol Chem.* 277; 30401-7.

Vos MD, Ellis CA, Bell A, Birrer MJ, Clark GJ. (2000) Ras uses the novel tumor suppressor RASSF1 as an effector to mediate apoptosis. *J Biol Chem.* 275; 35669-72.

W

Waagstein F, Hjalmarson A, Varnauskas E, Wallentin I. (1975) Effect of chronic beta-adrenergic receptor blockade in congestive cardiomyopathy. *Br Heart J.* 37; 1022-36.

Wakasaki H, Koya D, Schoen FJ, Jirousek MR, Ways DK, Hoit BD, Walsh RA, King GL. (1997) Targeted overexpression of protein kinase C beta2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94; 9320-5.

Wang BH, Du XJ, Autelitano DJ, Milano CA, Woodcock EA. (2000) Adverse effects of constitutively active alpha(1B)-adrenergic receptors after pressure overload in mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 279; H1079-86.

Wang L., Proud CG. (2002) Ras/Erk signaling is essential for activation of protein synthesis by Gq protein-coupled receptor agonists in adult cardiomyocytes. *Circ Res.* 91; 821-9.

Wang T., Brown MJ. (2004) Differential expression of adenylyl cyclase subtypes in human cardiovascular system. *Mol Cell Endocrinol.* 223; 55-62.

Wang W, Zhu W, Wang S, Yang D, Crow MT, Xiao RP, Cheng H. (2004) Sustained beta1-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca²⁺/calmodulin kinase signaling pathway. *Circ Res.* 95; 798-806.

Wang X, Culotta VC, Klee CB. (1996) Superoxide dismutase protects calcineurin from inactivation. *Nature.* 383; 434-7.

Wang Y, De Keulenaer GW, Weinberg EO, Muangman S, Gualberto A, Landschulz KT, Turi TG, Thompson JF, Lee RT. (2002) Direct biomechanical induction of endogenous calcineurin inhibitor Down Syndrome Critical Region-1 in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283; H533-9.

Waspe LE, Ordahl CP, Simpson PC. (1990) The cardiac beta-myosin heavy chain isogene is induced selectively in alpha 1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy of cultured rat heart myocytes. *J Clin Invest.* 85; 1206-14.

Wegner M, Cao Z, Rosenfeld MG. (1992) Calcium-regulated phosphorylation within the leucine zipper of C/EBP beta. *Science.* 256; 370-3.

Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, Plank DM, Jones F, Kimball TR, Molkenkin JD. (2004) Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 94; 110-8.

Wilkins BJ, De Windt LJ, Bueno OF, Braz JC, Glascock BJ, Kimball TF, Molkentin JD. (2002) Targeted disruption of NFATc3, but not NFATc4, reveals an intrinsic defect in calcineurin-mediated cardiac hypertrophic growth. *Mol Cell Biol.* 22; 7603-13 .

Wilkins BJ, Molkentin JD. (2004) Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 322; 1178-91.

Woodcock EA, Du XJ, Reichelt ME, Graham RM. (2008) Cardiac alpha 1-adrenergic drive in pathological remodeling. *Cardiovasc Res.* 77; 452-62.

Wu H, Naya FJ, McKinsey TA, Mercer B, Shelton JM, Chin ER, Simard AR, Michel RN, Bassel-Duby R, Olson EN, Williams RS. (2000) MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. *EMBO J.* 19; 1963-73.

Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, Olson EN, Chen J, Brown JH, Bers DM. (2006) Local InsP3-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *J Clin Invest.* 116; 675-82.

X

Xiao L, Pimental DR, Amin JK, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS. (2001a) MEK1/2-ERK1/2 mediates alpha1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 33; 779-87.

Xiao RP. (2000) Cell logic for dual coupling of a single class of receptors to G(s) and G(i) proteins. *Circ Res.* 87; 635-7.

Xiao RP, Valdivia HH, Bogdanov K, Valdivia C, Lakatta EG, Cheng H. (1997) The immunophilin FK506-binding protein modulates Ca²⁺ release channel closure in rat heart. *J Physiol.* 500 (Pt 2); 343-54.

Xu J, Gong NL, Bodi I, Aronow BJ, Backx PH, Molkentin JD. (2006) Myocyte enhancer factors 2A and 2C induce dilated cardiomyopathy in transgenic mice. *J Biol Chem.* 281; 9152-62.

Y

Yamaguchi O, Watanabe T, Nishida K, Kashiwase K, Higuchi Y, Takeda T, Hikoso S, Hirotani S, Asahi M, Taniike M, Nakai A, Tsujimoto I, Matsumura Y, Miyazaki J, Chien KR, Matsuzawa A, Sadamitsu C, Ichijo H, Baccarini M, Hori M, Otsu K. (2004) Cardiac-specific disruption of the c-raf-1 gene induces cardiac dysfunction and apoptosis. *J Clin Invest.* 114; 937-43.

Yang D, Ma S, Tan Y, Li D, Tang B, Chen J, Su X, Li G, Zhang X, Yang Y. (2010a) Adrenergic receptor blockade-induced regression of pressure-overload cardiac hypertrophy is associated with inhibition of the calcineurin/NFAT3/GATA4 pathway. *Mol Med Report.* 3; 497-501.

Yang D, Ma S, Tan Y, Li D, Tang B, Zhang X, Sun M, Yang Y. (2010b) Increased expression of calpain and elevated activity of calcineurin in the myocardium of patients with congestive heart failure. *Int J Mol Med.* 26; 159-64.

Yang J, Rothermel B, Vega RB, Frey N, McKinsey TA, Olson EN, Bassel-Duby R, Williams RS. (2000) Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ Res.* 87; E61-8.

Yang TT, Xiong Q, Enslen H, Davis RJ, Chow CW. (2002) Phosphorylation of NFATc4 by p38 mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol.* 22; 3892-904.

Yano M, Ikeda Y, Matsuzaki M. (2005) Altered intracellular Ca²⁺ handling in heart failure. *J Clin Invest.* 115; 556-64.

Yokoyama U, Patel HH, Lai NC, Aroonsakool N, Roth DM, Insel PA. (2008) The cyclic AMP effector Epac integrates pro- and anti-fibrotic signals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105; 6386-91.

Youn HD, Chatila TA, Liu JO. (2000) Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis. *EMBO J.* 19; 4323-31.

Youn HD, Sun L, Prywes R, Liu JO. (1999) Apoptosis of T cells mediated by Ca²⁺-induced release of the transcription factor MEF2. *Science.* 286; 790-3.

Yu H, van Berkel TJ, Biessen EA. (2007) Therapeutic potential of VIVIT, a selective peptide inhibitor of nuclear factor of activated T cells, in cardiovascular disorders. *Cardiovasc Drug Rev.* 25; 175-87.

Yue TL, Gu JL, Wang C, Reith AD, Lee JC, Mirabile RC, Kreutz R, Wang Y, Maleeff B, Parsons AA, Ohlstein EH. (2000) Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem.* 275; 37895-901.

Z

Zhang CL, McKinsey TA, Chang S, Antos CL, Hill JA, Olson EN. (2002) Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell.* 110; 479-88.

Zhang T., Brown JH. (2004) Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res.* 63; 476-86.

Zhang T, Johnson EN, Gu Y, Morissette MR, Sah VP, Gigena MS, Belke DD, Dillmann WH, Rogers TB, Schulman H, Ross J Jr, Brown JH. (2002) The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *J Biol Chem.* 277; 1261-7.

Zhang T, Kohlhaas M, Backs J, Mishra S, Phillips W, Dybkova N, Chang S, Ling H, Bers DM, Maier LS, Olson EN, Brown JH. (2007) CaMKII δ isoforms differentially affect calcium handling but similarly regulate HDAC/MEF2 transcriptional responses. *J Biol Chem.* 282; 35078-87.

Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J Jr, Bers DM, Brown JH. (2003) The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res.* 92; 912-9.

- Zhang W, Kowal RC, Rusnak F, Sikkink RA, Olson EN, Victor RG.** (1999) Failure of calcineurin inhibitors to prevent pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats. *Circ Res.* 84; 722-8.
- Zheng M, Dilly K, Dos Santos Cruz J, Li M, Gu Y, Ursitti JA, Chen J, Ross J Jr, Chien KR, Lederer JW, Wang Y.** (2004) Sarcoplasmic reticulum calcium defect in Ras-induced hypertrophic cardiomyopathy heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286; H424-33.
- Zheng M, Zhu W, Han Q, Xiao RP.** (2005) Emerging concepts and therapeutic implications of beta-adrenergic receptor subtype signaling. *Pharmacol Ther.* 108; 257-68 .
- Zhu DM, Tekle E, Chock PB, Huang CY.** (1996) Reversible phosphorylation as a controlling factor for sustaining calcium oscillations in HeLa cells: Involvement of calmodulin-dependent kinase II and a calyculin A-inhibitable phosphatase. *Biochemistry.* 35; 7214-23.
- Zhu J., McKeon F.** (1999) NF-AT activation requires suppression of Crm1-dependent export by calcineurin. *Nature.* 398; 256-60.
- Zhu W, Zou Y, Shiojima I, Kudoh S, Aikawa R, Hayashi D, Mizukami M, Toko H, Shibasaki F, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I.** (2000) Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem.* 275; 15239-45.
- Zhu WZ, Wang SQ, Chakir K, Yang D, Zhang T, Brown JH, Devic E, Kobilka BK, Cheng H, Xiao RP.** (2003) Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II. *J Clin Invest.* 111; 617-25.
- Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ, Lefkowitz RJ, Kobilka BK, Xiao RP.** (2001) Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98; 1607-12.
- Zuscik MJ, Chalothorn D, Hellard D, Deighan C, McGee A, Daly CJ, Waugh DJ, Ross SA, Gaivin RJ, Morehead AJ, Thomas JD, Plow EF, McGrath JC, Piascik MT, Perez DM.** (2001) Hypotension, autonomic failure, and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing the alpha 1B-adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 276; 13738-43.

ANNEXES

Annexe 1

Epac activation induces histone deacetylase nuclear export via a Ras-dependent signalling pathway.

Métrich M, Laurent AC, **Breckler M**, Duquesnes N, Hmitou I, Courillau D, Blondeau JP, Crozatier B, Lezoualc'h F, Morel E.

Cell Signal. 2010 Oct;22(10):1459-68. Epub 2010 May 27

Annexe 2

Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: compartmentation, functioning and disease implications.

Breckler M, Berthouze M, Laurent AC, Crozatier B, Morel E, Lezoualc'h F.

Cell Signal. 2011 Aug;23(8):1257-66. Epub 2011 Mar 22. Review.

Annexe 3

New perspectives in cAMP-signaling modulation.

Berthouze M, Laurent AC, **Breckler M**, Lezoualc'h F.

Curr Heart Fail Rep. 2011 Sep;8(3):159-67.

Annexe 4

Role of Epac in brain and heart.

Anne-Coline Laurent, **Magali Breckler**, Magali Berthouze, Frank Lezoualc'h,

Biochemical Society Transactions. Biochem Soc Trans. 2012 Feb 1;40(1):51-7.

Résumé en français

L'hypertrophie cardiaque est un mécanisme adaptatif qui se développe en réponse à une surcharge de travail hémodynamique. Lors d'un stress chronique, elle peut mener à l'insuffisance cardiaque (IC), l'une des principales causes de mortalité dans les pays industrialisés. Les voies de signalisation hypertrophiques induites par les récepteurs α et β -adrénergiques font intervenir la petite protéine G Ras et des protéines calcium-dépendantes telles que la calcineurine (CaN) et la Ca^{2+} /calmoduline-dépendante kinase de type II (CaMKII), ainsi que leurs facteurs de transcription respectifs NFAT et MEF2. Dans les cellules immunitaires, la protéine Carabine a été mise en évidence comme inhibant la CaN et de Ras. L'objectif de cette thèse est de caractériser son rôle dans le cardiomyocyte.

In vitro, nous montrons que Carabine est exprimée dans le cardiomyocyte de rat nouveau-né et adulte et inhibe par l'intermédiaire de ses domaines fonctionnels les voies de signalisation de Ras/ERK, CaN/NFAT et CaMKII/MEF2. Sous stimulation chronique adrénérgique, la surexpression de Carabine prévient le remodelage cardiaque en bloquant le développement des marqueurs de l'hypertrophie : la croissance cellulaire, la réexpression des gènes fœtaux et la réorganisation des protéines contractiles. Enfin, dans un modèle d'hypertrophie cardiaque induite par surcharge de pression chez le rat, l'injection intramyocardique d'un adénovirus codant pour Carabine inhibe l'hypertrophie des cardiomyocytes. Ce travail ouvre ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement de l'IC.

Mots Clés : Carabine, récepteurs α et β -adrénergiques, CaN, Ras, CaMKII, hypertrophie cardiaque

Résumé en anglais

Study of signalling pathway regulated by Carabin in the cardiomyocyte and highlights its anti-hypertrophic role *in vitro*

Cardiac hypertrophy is an adaptative mechanism developed in response to hemodynamic overload. During chronic stress, it can lead to heart failure (HF), one of the most important causes of mortality in industrialized countries. Hypertrophic signaling pathway induced under α and β -adrenergic receptor involve small G protein Ras and calcium dependent proteins such as the calcineurine (CaN) and the Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases II (CaMKII), as well as their respective transcription factors NFAT and MEF2. In immune cells Carabin protein has been shown to inhibit CaN and Ras. The purpose of my thesis was to determine the role of Carabin in the cardiomyocyte.

In vitro, we showed that Carabin is expressed in neonatal and adult rat cardiomyocyte and inhibits via its functional domains the Ras/ERK, CaN/NFAT and CaMKII/MEF2 signaling pathways. Under adrenergic chronic stimulation, Carabin overexpression blocks the development of hypertrophic markers (cell size increase, re-expression of embryonic genes and contractile protein reorganisation) preventing thus cardiac remodeling. Finally, in a rat model pressure overload cardiac hypertrophy, intra-cardiac injection of Carabin adenovirus inhibits cardiomyocyte growth. This study opens new insights into the treatment of HF.

Key words: Carabin, cardiac hypertrophy and failure, calcineurine, Ras, CaMKII, Epac

Laboratoires :- INSERM UMR-769, Université Paris-Sud XI, IFR141, Faculté de Pharmacie
5 rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry

- INSERM UMR-1048, I2MC, Université Paul Sabatier, 1 avenue Jean Poulhès
31432 Toulouse