

**ATTENUATION DU PHENOTYPE DE
CARDIOMYOPATHIE DILATEE INDUITE PAR
INVALIDATION DE SRF PAR SUREXPRESSON DE
mIGF-1 CHEZ LA SOURIS**

Mélissa Touvron

► **To cite this version:**

Mélissa Touvron. ATTENUATION DU PHENOTYPE DE CARDIOMYOPATHIE DILATEE INDUITE PAR INVALIDATION DE SRF PAR SUREXPRESSON DE mIGF-1 CHEZ LA SOURIS. Cardiologie et système cardiovasculaire. 2011. <hal-01482709>

HAL Id: hal-01482709

<https://hal-ephe.archives-ouvertes.fr/hal-01482709>

Submitted on 3 Mar 2017

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.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE
présenté
par

Mélissa TOUVRON

pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**ATTENUATION DU PHENOTYPE DE CARDIOMYOPATHIE
DILATEE INDUITE PAR INVALIDATION DE SRF
PAR SUREXPRESSON DE mIGF-1 CHEZ LA SOURIS**

soutenu le 16 décembre 2011 devant le jury suivant :

Pr. Stéphane RICHARD	–	Président
Dr. David TUIL	–	Tuteur scientifique
Dr. Jean-François DECAUX	–	Tuteur scientifique
Dr. Sylvie DEMIGNOT	–	Tuteur pédagogique
Dr. Gisèle BONNE	–	Rapporteur
Dr. Frédéric JOUBERT	–	Examineur

Laboratoire d'accueil

Equipe Génétique, Développement et
physiopathologie du muscle
Institut Cochin
Département Génétique et Développement
24, rue du Faubourg Saint-Jacques
75014 Paris
Tuteur : Jean-François Decaux
(jean-francois.decaux@inserm.fr)

Laboratoire EPHE

Laboratoire de pharmacologie cellulaire et
moléculaire
Centre de recherche des Cordeliers
15, rue de l'École de médecine
75006 Paris
Tutrice : Sylvie Demignot
(sylvie.demignot@crc.jussieu.fr)

RÉSUMÉ

Les maladies cardiovasculaires représentent la deuxième cause de mortalité après les cancers dans les pays développés et constituent un réel problème de santé publique. Dans les conditions de stress ou de maladies génétiques, le cœur doit compenser en s'adaptant aux conditions environnementales. SRF (Serum Response factor), est une protéine ubiquitaire particulièrement abondante dans les muscles striés dont le cœur et constitue un des acteurs impliqué dans le processus de remodelage cardiaque. Chez la souris, son invalidation conditionnelle dans le cœur de manière inductible à l'âge adulte provoque le développement d'une cardiomyopathie dilatée entraînant une défaillance cardiaque puis la mort des animaux en dix semaines.

Afin d'évaluer les effets cardioprotecteurs du facteur de croissance IGF-1 sur notre modèle de cardiomyopathie dilatée, nous avons croisé nos souris invalidées pour le gène *Srf* avec les souris surexprimant l'isoforme mIGF-1 spécifiquement dans le cœur.

L'ensemble de nos recherches effectué sur les souris adultes montre clairement un effet protecteur de l'isoforme mIGF-1 sur la fonction cardiaque des souris invalidées pour le gène *Srf*. Le retard observé dans le développement de la CMD et l'augmentation de la survie des souris sont directement liés à une amélioration des paramètres fonctionnels du cœur et de l'expression d'un certain nombre de gènes cibles de SRF. Des modifications mineures dans la morphologie des cardiomyocytes ont été observées. La réponse inflammatoire et le développement de la fibrose observés dans le processus de remodelage cardiaque sont complètement bloqués. Enfin, ce travail m'a permis de mettre en évidence un effet relationnel entre SRF, CTGF (Connective Tissue Growth Factor) et mIGF-1 dont les données préliminaires restent à confirmer par des expériences plus conséquentes. De par ses relations avec SRF et mIGF-1, CTGF semble une cible idéale pour le développement de futurs traitements thérapeutiques afin de contrer le remodelage cardiaque intervenant lors de l'insuffisance cardiaque.

Mots-clés : SRF – mIGF-1 – cardiomyopathie dilatée – CTGF – remodelage cardiaque – fibrose

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	3
LISTE DES ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION	8
1. LE COEUR	8
1.1. GENERALITES.....	8
1.1.1. Système cardiovasculaire et circulation sanguine.....	8
1.1.2. La révolution cardiaque.....	9
1.1.3. L'unité contractile : le sarcomère.....	9
1.2. LA MORPHOGENESE CARDIAQUE.....	10
1.3. CROISSANCE ET HYPERTROPHIE CARDIAQUE.....	11
1.4. LES MALADIES CARDIAQUES.....	12
1.4.1. L'insuffisance cardiaque.....	12
1.4.2. La cardiomyopathie dilatée.....	13
1.4.3. Remodelage cardiaque et communication entre les cardiomyocytes et les fibroblastes cardiaques.....	14
2. SRF	15
2.1. GENERALITES.....	15
2.1.1. Découverte de la protéine SRF.....	15
2.1.2. Le gène.....	16
2.1.3. La protéine.....	16
2.1.4. Les isoformes.....	17
2.2. LES CIBLES DE SRF.....	18
2.3. REGULATION DE SRF.....	18
2.3.1. Phosphorylation.....	19
2.3.2. Les TCFs.....	19
2.3.3. La myocardine et les MRTFs.....	20
2.3.4. Les microARNs et autorégulation.....	21
2.4. SRF DANS LE CŒUR.....	21
2.4.1. SRF dans la cardiomyogenèse.....	22
2.4.2. SRF et l'hypertrophie post-natale.....	24
2.4.3. SRF chez l'adulte.....	24
2.4.4. SRF au cours du vieillissement.....	25
2.4.5. SRF dans les pathologies cardiaques.....	26
3. IGF-1	27
3.1. GENERALITES.....	27
3.1.1. Le gène.....	27
3.1.2. Les différentes isoformes.....	28

3.1.3. La protéine et sa fonction 29

3.2. REGULATION DE IGF-1 29

3.2.1. Son récepteur : IGF-1R 29

3.2.2. Son homologue : IGF-2 30

3.2.3. Ses protéines de liaison : IGF-1BPs..... 30

3.3. IGF-1 CARDIOPROTECTEUR 31

OBJECTIFS 33

BIBLIOGRAPHIE 34

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AIA	Alcool iso-amylique
ANF	Atrial natriuretic factor
Ang II	Angiotensine II
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine Triphosphate
BC12	B-cell lymphoma 2
BSA	Bovine serumalbumine
CCL2	Chemokine ligand 2
ChIP	Chromatin immuno-precipitation
CMD	Cardiomyopathie dilatée
Col1A1	Collagénase de type 1
Col1A3	Collagénase de type 1
CTGF	Connective tissue growth factor
Cy3	Cyanine 3
DVGFD	Diamète du ventricule gauche en fin de diastole
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique
Egr1	Early growth response 1
Egr2	Early growth response 2
eIF-4E	Eukariotic translation initiation factor 4E
ELK-1	E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ET-1	Endothelin-1
EtOH	Ethanol 100%
FE	Fraction d'éjection
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 beta
HBEGF	Heparin-binding-EGF like growth factor
HDAC	Histone desacetylase
HOP	Hsp70/Hsp90 Organizing Protein
HSP	Heat shock protein
IEC	Immediate early gene
IGF-1	Insulin-like growth factor
IGF-1R	Insulin-like growth factor-1 receptor
IGF-2	Insulin-like growth factor-2
IGF-2R	Insulin-like growth factor-2 receptor
IGFBP	Insulin-like growth factor binding protein

IL-10	Interleukine-10
IL-1 β	Interleukine-1 β
IL-4	Interleukine-4
IL-6	Interleukine-6
KO	Knock out
MADS	MCM-1-Agamous-Deficiens-SRF
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCK	Muscular creatine kinase
MCP1	Monocyte chemoattractant protein 1
MEC	Matrice extracellulaire
MEF2	Myocyte enhancer factor-2
mer	Mutated estrogen receptor
mIGF-1	muscular Insulin-like growth factor-1
miR	microARN
MMP	Matrix metalloproteinase
MRTF	Myocardin-related transcription factor
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NCX1	Sodium/calcium exchanger 1
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NLS	Nuclear localisation site
NTP	Nucléotide tri-phosphate
PBS	Phosphate buffered saline
PBS-T	Phosphate buffered saline-tween
PCR	Polymerization chain reaction
PCRq	PCR quantitative
PCS	protéines convertases ressemblant à la subtilisine
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDK1	Pyruvate dehydrogenase [lipoamide] kinase
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PKC- α	Protéine kinase C α
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
SAP	SAF-A/B, Acinus, PIAS
SAP-1	SRF accessory protein-1
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SEM	Standard errors of the means
SERCA2	Sarco/endoplasmic Reticulum Calcium ATPase-2
Sf	allèle du gène Srf floxé de par et d'autre de l'exon 2
SGK1	Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1
siRNA	small interference ARN
SM α 22	Smooth muscle α 22
SNC	Système Nerveux Central
SRE	Serum response element

SRF	Serum response factor
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	Tris buffered saline-tween
TCF	Ternary complex factor
TEF-1	Transcription enhancer factor-1
TIMPs	Tissue Inhibitors of metalloproteinases
TGF β	Tissue growth factor β
TG-SDS	Tris-Glycin SDS buffer
TNF α	Tumor necrosis factor α
UCP1	Uncoupling protein 1
VG	Ventricule gauche
VRC	Vitesse de raccourcissement des cardiomyocytes
α -MHC	α - Myosin heavy chain
β -MHC	β - Myosin heavy chain

INTRODUCTION

1. Le coeur

Le cœur est un organe creux et musculaire dont la fonction principale est de maintenir une circulation sanguine dans le système vasculaire par des contractions rythmiques et autonomes.

1.1. Généralités

1.1.1. Système cardiovasculaire et circulation sanguine

Le cœur est un muscle strié, comme les muscles squelettiques par opposition aux vaisseaux sanguins et au tube digestif qui sont notamment constitués par des muscles lisses. Il est composé de 4 cavités cardiaques, divisées en 2 parties, droite et gauche. Chaque partie est composée d'une oreillette et d'un ventricule. Des valvules situées à la sortie de chaque oreillette (valvules auriculo-ventriculaires) et de chaque ventricule (valvules sigmoïdes) empêchent le reflux du sang dans le sens inverse et permet de donner un sens unique de circulation. Le sang, chargé en dioxygène, arrive dans l'oreillette gauche par la veine pulmonaire, puis il entre dans le ventricule gauche qui l'expulse via l'aorte vers tout l'organisme afin d'irriguer les organes en dioxygène et en nutriments. En échange, il récupère le CO₂ et les déchets produits par les différents organes. Le sang circule alors jusqu'à l'oreillette droite puis dans le ventricule droit pour être dirigé vers les poumons via l'artère pulmonaire. Il se débarrasse du CO₂ et des toxines avant de se recharger en oxygène et de recommencer son cycle.

1.1.2. La révolution cardiaque

La circulation du sang dans le système vasculaire est possible grâce aux contractions régulières du muscle cardiaque. Ce muscle, appelé myocarde, est protégé à l'extérieur par le péricarde et tapissé à l'intérieur par l'endocarde. A la différence du muscle squelettique, la contraction du myocarde ne dépend pas de notre volonté. Elle est régulée par des stimulations électriques spontanées induites par le système nerveux central (SNC). Un message électrique venant du SNC induit la dépolarisation des cellules du nœud sinusal, situé dans la paroi supérieure de l'oreillette droite. Celle-ci se transmet à toutes les cellules de l'oreillette et induit la contraction simultanée des oreillettes, appelée systole auriculaire. Le nœud atrio-ventriculaire relaie l'information électrique via le faisceau de His aux cellules des ventricules. Elles se contractent à leur tour lors de la systole ventriculaire tandis que les cellules des oreillettes se relâchent puis toutes les cellules cardiaques sont relâchées au cours de la diastole avant de recommencer cette révolution cardiaque : systole auriculaire-systole ventriculaire-diastole. Ce système électrique cardiaque permet d'assurer la régularité du rythme cardiaque même si celui-ci peut être modifié par des influences nerveuses ou hormonales.

1.1.3. L'unité contractile : le sarcomère.

Le sarcomère est la structure contractile caractéristique des cellules musculaires striées. Il est composé de différents filaments : les filaments fins sont composés d'actine polymérisée autour desquels s'enroule un complexe de troponine et tropomyosine. Ils sont reliés entre eux au niveau des stries z par des complexes d'actinine et de desmine. Les filaments épais sont constitués d'un assemblage de chaînes lourdes et légères de myosine. La contraction musculaire correspond à un raccourcissement du sarcomère. Grâce au glissement relatif des filaments fins d'actine par rapport aux filaments épais de myosine, les stries Z se rapprochent entraînant un raccourcissement global de la cellule cardiaque.

Le déclenchement de la contraction commence par la dépolarisation de la membrane des cellules cardiaques entraînant la libération du calcium dans le cytoplasme. Celui-ci se fixe à la troponine C et le changement de conformation obtenu démasque les sites de fixation de

l'actine polymérisée pour les têtes de myosine. Les têtes de la myosine qui se fixent sur le filament d'actine polymérisée changent de conformation provoquant un mouvement d'attraction sur les filaments d'actine. Les filaments d'actine se rapprochent les uns des autres entraînant avec eux les stries z, c'est l'étape de contraction. La fixation d'une molécule d'ATP sur la tête de la myosine et la dissociation du complexe troponine-calcium provoquent le désencrage des têtes de myosine puis la libération des filaments d'actine. Les stries z s'éloignent les unes des autres : c'est l'étape de relâchement.

1.2. La morphogenèse cardiaque

Chez les mammifères, le cœur est le premier organe formé et fonctionnel. Chez la souris, au jour 7 de l'embryogenèse (E7), les précurseurs mésodermiques issus du mésoderme antérieur latéral, se spécifient et se différencient en cardiomyocytes. A E8, les cellules forment le tube cardiaque et peuvent déjà se contracter. De E9 à E12.5, les différentes cavités se mettent en place. Cette période est ponctuée à E10.5 par la courbure du tube cardiaque vers la droite afin de former un tube cardiaque en forme de « S ». On distingue alors une voie afférente, 2 oreillettes primitives, un canal auriculo-ventriculaire, 2 ventricules primitifs et une voie efférente. La croissance du tube et sa septation axiale permettent au cœur dès E12.5 d'être mature et d'assurer la circulation sanguine. Pendant la suite de l'embryogenèse, le cœur croît grâce à la prolifération des cellules cardiaques.

Le cœur est composé de plusieurs types cellulaires : principalement de cardiomyocytes (55% du cœur chez la souris) et de fibroblastes mais aussi de cellules endothéliales, de cellules du muscle lisse et de cellules du système immunitaire (Souders et coll., 2009). Les cardiomyocytes sont les cellules effectrices du cœur qui ont la capacité de se contracter. Les fibroblastes ont un rôle de soutien aux cardiomyocytes et maintiennent l'organisation cellulaire du cœur. Une fine communication entre ces 2 types cellulaires est nécessaire au bon développement du cœur. Au cours de l'embryogenèse, les cardiomyocytes prolifèrent et se mettent en place afin de former un cœur mature. Les fibroblastes cardiaques créent une structure, la matrice extracellulaire (MEC), aidant au développement de l'organisation des cardiomyocytes. Ils maintiennent un équilibre entre synthèse et dégradation des protéines de la MEC grâce à l'expression de metalloprotéases de la matrice (MMPs) qui dégradent les

protéines de la MEC et de leurs inhibiteurs, les TIMPs. Ce réseau de soutien est principalement constitué de fibronectine et de collagène (Kakkar et Lee, 2010). Des cultures de cardiomyocytes embryonnaires ont montré que la présence de ces protéines favorisait leur prolifération *via* l'activation de la voie de signalisation PI3K-AKT et celle des ERK kinases (Ieda et coll., 2009). Cette activation de la prolifération fait intervenir la β 1-intégrine, récepteur de la fibronectine et le facteur de croissance Heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF).

1.3. Croissance et hypertrophie cardiaque

A la naissance, la prolifération des cardiomyocytes s'estompe au profit de la croissance cellulaire. Ainsi, pendant la croissance post-natale, le cœur adapte sa taille à celle de l'organisme non plus par prolifération mais grâce à la croissance individuelle de chaque cardiomyocyte. Plutôt de forme rectangulaire, les cardiomyocytes augmentent proportionnellement leur longueur et leur largeur. Ce phénomène est appelé « hypertrophie physiologique » en opposition à l'« hypertrophie pathologique » où la croissance ne se produit qu'en largeur (« hypertrophie concentrique ») ou qu'en longueur (« hypertrophie excentrique »).

Cette hypertrophie dite « physiologique » peut être aussi observée chez l'adulte en réponse à un entraînement physique régulier. Dans les deux cas, la principale voie de signalisation activée est la voie IGF-1-PI3K-AKT (Chen et coll., 2001). Elle induit la production de protéines *via* l'activation de p70S6K, mTOR et GSK3 β et elle favorise la traduction des ARNm *via* eIF-4E.

Après la naissance, les fibroblastes cardiaques modifient la composition des signaux envoyés aux cardiomyocytes favorisant l'hypertrophie de ces derniers. En effet, une étude a montré grâce à des co-cultures, que les fibroblastes cardiaques adultes favorisaient l'hypertrophie des cardiomyocytes embryonnaires plutôt que leur prolifération contrairement aux fibroblastes cardiaques embryonnaires (Ieda et coll., 2009). Un dialogue permanent entre cardiomyocytes et fibroblastes est indispensable au bon fonctionnement du cœur ; les

cardiomyocytes informent les fibroblastes de leur état et ces derniers adaptent leur phénotype en fonction du contexte établi.

1.4. Les maladies cardiaques

Toute atteinte du système cardiovasculaire mène à l'insuffisance cardiaque. Cependant, on distingue différentes catégories de maladies cardiaques en fonction de la cause, touchant le muscle cardiaque ou le système vasculaire. Nous nous intéresserons tout particulièrement à la cardiomyopathie dilatée.

1.4.1. L'insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque se traduit par l'incapacité du cœur d'assurer un débit sanguin suffisant pour le fonctionnement des autres organes. Touchant environ 500 000 personnes en France et plus de 23 millions de personnes dans le monde, l'insuffisance cardiaque représente le principal problème de santé publique dans les pays industrialisés (Delahaye et de Gevigney, 2001) et fait partie des maladies cardiovasculaires qui représentent la première cause de mortalité du XXIème siècle avec le cancer (Bui et coll., 2011). Chaque année, en France, plus de 32 000 personnes décèdent des suites d'une insuffisance cardiaque et 120 000 nouveaux cas sont répertoriés (Delahaye et de Gevigney, 2001). Bien que le développement de nouveaux traitements pharmaceutiques ait permis d'augmenter l'espérance de vie des patients, ces derniers décèdent en moyenne dans les 5 ans après l'établissement du diagnostic (Bui et coll., 2011). Les traitements actuels permettent uniquement de ralentir le développement de la maladie. En effet, les diurétiques et les vasodilatateurs prescrits soulagent le cœur en diminuant sa charge de travail mais ne permettent pas une totale guérison.

1.4.2. La cardiomyopathie dilatée

La cardiomyopathie dilatée (CMD) est la cardiomyopathie la plus répandue parmi les 3 types répertoriés (dilatée, ischémique et hypertrophique). C'est une atteinte chronique du cœur sans aucun lien avec un dysfonctionnement coronarien ou valvulaire. Elle est caractérisée par une dilatation des 4 cavités cardiaques, principalement du ventricule gauche, et par une fraction d'éjection (FE) inférieure à 45%, comparée à 70% pour un cœur sain. Comme beaucoup de maladies cardiaques, les statistiques concernant la CMD montrent que les hommes, âgés entre 20 et 60 ans, sont plus touchés que les femmes. Dans la majorité des cas de CMD, les facteurs déclencheurs de la maladie ne sont pas connus. Au début de la maladie, les patients ne présentent pas de symptômes particuliers et la découverte de CMD se fait souvent de manière fortuite lors d'un examen cardiaque. Dans 30% à 35% des cas de CMD, les causes sont d'origine génétique. Des mutations touchant les gènes des protéines du système contractile comme l'actine cardiaque, la chaîne lourde de la myosine (α -MHC) ou la troponine T ont été retrouvées chez ces patients (Hershberger et Siegfried, 2011). Une étude par « puce à ADN » a également révélé la mutation de gènes impliqués dans le cytosquelette, la transcription et la traduction (Barrans et coll., 2002). Cette maladie peut également avoir d'autres origines : toxique (alcool, traitement chimiothérapique), infectieuse (virus), métabolique ou encore auto-immune.

A l'heure actuelle, le principal traitement consiste en l'administration de diurétiques et de vasodilatateurs tels que l'inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC). L'administration de β -bloquants peut accompagner les diurétiques et l'IEC. Le but de ces traitements est de soulager le travail du cœur en diminuant la pression sanguine. Des mesures diététiques et d'hygiène de vie sont également de rigueur comme l'arrêt total de consommation de tabac et d'alcool associée à un régime alimentaire pauvre en sel. Cependant, l'ensemble de ces mesures ne font que ralentir l'évolution de la maladie et seule une transplantation cardiaque permet un rétablissement complet du patient. Aujourd'hui, la majorité des transplantations cardiaques réalisées sont en faveur de patients atteints de CMD (Xu et coll., 2010). Malheureusement, le faible nombre de donneurs d'organes limite l'accès à cette intervention.

1.4.3. Remodelage cardiaque et communication entre les cardiomyocytes et les fibroblastes cardiaques

Le remodelage cardiaque est une réponse adaptative du cœur en situation pathologique. Il est caractérisé par une hypertrophie dite « pathologique » des cardiomyocytes accompagnée d'une fibrose cardiaque. Suite aux signaux de stress ou pathologiques, les cardiomyocytes tentent de maintenir leur fonctionnement en s'hypertrophiant. Elle est principalement induite par des facteurs de stress, comme l'angiotensine II (Ang II) ou l'endothéline 1 (ET-1), activant la voie de signalisation des protéines G/MAP kinases (Akhter et coll., 1998 ; Esposito et coll., 2001). La voie calcineurine/NFAT est également fréquemment activée (Lunde et coll., 2011). Cependant, cette hypertrophie pathologique perturbe l'organisation des cardiomyocytes et conduit à un dysfonctionnement du cœur. Suite aux signaux provenant des cardiomyocytes, les fibroblastes répondent par prolifération et augmentation de la production des protéines de la MEC. Le cœur est alors en état de fibrose cardiaque. L'équilibre entre sécrétion et dégradation de la MEC est rompu ; une forte augmentation de collagène et de fibronectine est observée ainsi qu'une augmentation de l'expression des MMPs (Souders et coll., 2009). Les fibroblastes peuvent se transformer en myofibroblastes, exprimant alors certaines protéines de mobilité spécifiques au muscle lisse comme $SM\alpha 22$ et l'actine du muscle lisse. Ces myofibroblastes sont activés par la synthèse de facteurs de croissance tel que TGF- β et des cytokines telles qu'IL-6, IL-1 β , TNF α contribuant à leur prolifération et au renforcement de l'expansion de la MEC et favorisant le recrutement des cellules inflammatoires (Souders et coll., 2009). Ces dernières années, de nombreuses études ont montré le rôle crucial du facteur de croissance Connective Tissue Growth Factor (CTGF) dans l'évolution de la fibrose cardiaque. Induit par TGF- β , CTGF est principalement connu pour activer la prolifération des fibroblastes cardiaques et leur transformation en myofibroblastes et pour stimuler la production de MEC (Daniels et coll., 2008).

L'hypertrophie pathologique et le développement de la fibrose sont deux événements indissociables : le changement de morphologie anormale des cardiomyocytes entraîne l'expansion de la fibrose comme la prolifération des fibroblastes empêche une hypertrophie normale des cardiomyocytes. De plus, l'hypertrophie des cardiomyocytes et la prolifération

des fibroblastes peuvent être toutes deux induites par une même protéine : Ang II. En effet, l'activation de la voie des protéines G-ERK kinases induite par Ang II en cas de stress cardiaque est également observée dans les fibroblastes (Zou et coll., 1998). L'activation de deux mécanismes distincts dans deux types cellulaires différents par une même protéine est possible grâce à l'implication de sous-unités différentes des protéines G : dans les fibroblastes, les protéines $G_{\beta\gamma}$ et G_i sont activées alors que ce sont les protéines G_q dans les cardiomyocytes (Zou et coll., 1998).

2. SRF

Le facteur de réponse au sérum (Serum Response Factor : SRF) est un facteur de transcription ubiquitaire majoritairement exprimé dans les trois types de muscles cardiaque, squelettiques et lisses. SRF a été initialement identifié comme le facteur se liant à l'élément de réponse au sérum (SRE), du promoteur du proto-oncogène *c-fos* (Treisman, 1987).

2.1. Généralités

2.1.1. Découverte de la protéine SRF

Suite à l'addition de sérum de veau fœtal sur des fibroblastes NIH3T3 quiescents, Greenberg et Ziff observèrent l'activation très rapide (15 minutes après stimulation) de la transcription du gène *c-fos*, suivie de la ré-entrée des cellules dans le cycle cellulaire en phase G1 puis en mitose (Greenberg et Ziff, 1984). L'analyse du promoteur proximal du gène *c-fos* a permis la découverte simultanée par deux équipes d'une séquence d'environ 300 pb répondant à l'activation par le sérum (Treisman, 1985) et hypersensible à la DNase I *in vivo* (Deschamps et coll., 1985). Cette séquence fut nommée élément de réponse au sérum (Serum Response Element : SRE). L'année suivante, différentes expériences de gel retard et d'empreinte à la DNase I permirent d'identifier un facteur capable de se fixer au SRE, appelé SRF (Gilman et coll., 1986 ; Prywes et Roeder, 1986, 1987 ; Treisman, 1986, 1987). Aujourd'hui, SRF a été

caractérisé comme facteur appartenant à la famille des protéines à domaine MCM-1-Agamous-Deficiens-SRF (MADS), se fixant sur une séquence consensus bien identifiée « CC(A/T)6GG » appelée boîte CARG (Johansen et Prywes, 1994). Il intervient dans de nombreux processus tels que la prolifération, la croissance cellulaire, la migration, l'adhésion et la différenciation (Sun et coll., 2006).

2.1.2. Le gène

Le gène *Srf*, localisé sur les chromosomes 6p21.1 chez l'homme et 17C chez la souris, est composé de 7 exons et possède une taille d'environ 11 kb (Belaguli et coll., 1997). L'exon 1 code pour le signal de localisation nucléaire (NLS) et pour 1/3 de la boîte MADS, les 2/3 restants sont codés par l'exon 2. Les exons 4, 5 et 6 codent pour le domaine de transactivation. La région promotrice, située en amont du site d'initiation de la transcription, contient une boîte TATA et 2 boîtes CARG permettant ainsi sa propre autorégulation (Belaguli et coll., 1997).

Le domaine MADS est un domaine hautement conservé chez les différents gènes homologues retrouvés chez la levure (*Mcm1* et *Arg80*), chez les plantes (*Agamous* et *Deficiens*) et chez les mammifères (*Srf*) (Chai et Tarnawski, 2002). Le gène *Srf* présente également de nombreux sites de phosphorylation participant à sa régulation (Prywes et coll., 1988). La transcription du gène *Srf* produit deux ARNm de 2,5 kb et 4,5 kb qui ne diffèrent que par la taille de la queue polyA et sont traduits de ce fait en une protéine unique (Chai et Tarnawski, 2002).

2.1.3. La protéine

La protéine SRF est une phosphoprotéine de 67 kDa fonctionnelle sous la forme d'un homodimère. Elle est formée de 508 et de 504 aa, respectivement chez l'homme et chez la souris (Chai et Tarnawski, 2002). Elle est composée de plusieurs domaines importants :

- le domaine NLS (Nuclear Localisation Site) dans la région N-terminale permet à la protéine SRF d'entrer dans le noyau,

- le domaine MADS assure trois rôles indispensables au bon fonctionnement de la protéine : la liaison à l'ADN en reconnaissant la boîte CArG dans les régions promotrices de ses gènes cibles, son homodimérisation et la formation d'un complexe ternaire avec ses cofacteurs,

- le domaine de transactivation est situé dans la région C-terminale.

2.1.4. Les isoformes

Chez l'homme et la souris, il existe différentes isoformes de SRF. La traduction des sept exons conduit à la forme mature de 67 kDa, appelée SRF-L (large). Il existe des isoformes intermédiaires issues d'un épissage alternatif des exons 5, 4-5 et 3-4-5 donnant respectivement les isoformes SRF-M (medium) de 57 kDa, SRF-S (small) de 52 kDa et SRF-I (inhibitor) de 40 kDa (Belaguli et coll., 1999 ; Kemp et Metcalfe, 2000). Seul le domaine d'activation transcriptionnelle de ces isoformes est modifié tandis que la partie N-terminale contenant la boîte MADS de la protéine est conservée. Ces différentes isoformes sont donc capables de s'assembler en homodimères ou en hétérodimères. En formant un hétérodimère avec la forme SRF-L, ces isoformes tronquées agissent comme des dominants négatifs et altèrent l'activation des gènes cibles de SRF (Belaguli et coll., 1999). Certaines isoformes sont retrouvées dans des pathologies humaines (Kemp et Metcalfe, 2000). Par exemple, dans certains cas d'hypoplasticité pulmonaire, la forme SRF-M s'exprime anormalement dans le muscle lisse (Yang et coll., 2000). Cette même isoforme est aussi retrouvée dans le cancer du colon, jouant un rôle dans la survie cellulaire (Patten et coll., 2004). Ces isoformes incomplètes sont produites par épissage alternatif mais peuvent également être générées suite à un clivage par la caspase 3, notamment dans les pathologies cardiaques décrites dans le paragraphe 2.4.4.

2.2. Les cibles de SRF

Les premières cibles décrites de SRF sont les gènes de réponse immédiate au sérum (immediate early genes : IEGs) tels que *c-fos*, *Egr-1*, *Egr-2* et *Srf* lui-même (Shaw et coll., 1989). Comme SRF active la transcription de ses gènes cibles en se liant aux boîtes CArG, la recherche de ces boîtes CArG fonctionnelles dans les régions promotrices a permis d'identifier 30 gènes cibles de SRF (Chai et Tarnawski, 2002). Parmi ces gènes, on retrouve les IEGs (*c-fos*, *Egr-1*, *Egr-2*, *Srf* lui-même) et des gènes codant pour des protéines musculaires (α -*mhc*, β -*mhc*, *actines squelettique*, *cardiaque* et *lisse*). Le développement de la technique de microarrays a permis d'allonger cette liste (Tullai et coll., 2004 ; Phillipar et coll., 2004 ; Balza et Misra, 2005). Chacune de ces études a décrit puis validé de nouveaux gènes directement contrôlés par SRF impliqués dans des processus tels que le cycle cellulaire, l'apoptose, la migration et l'adhésion, le métabolisme calcique ou le sarcomère musculaire. En 2006, le terme de « CArGome » a été introduit afin de définir l'ensemble des gènes possédant des boîtes CArG et potentiellement des gènes cibles directs de SRF (Sun et coll., 2006). Parmi une liste de 188 gènes candidats, obtenue par une étude *in silico*, 60 nouveaux gènes cibles de SRF ont été validés par des techniques de gel retard et d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) (Sun et coll., 2006). A ce jour, environ 250 gènes ont été identifiés comme étant directement contrôlés par SRF et intervenant dans des processus de prolifération, de régulation du cytosquelette et de différenciation, principalement musculaire.

2.3. Régulation de SRF

SRF intervient dans des processus aussi nombreux que variés. Il est au carrefour de différentes voies de signalisation qui lui permettent d'adapter son niveau d'expression et le choix de ses co-facteurs en fonction du contexte cellulaire. Dans le cœur, plusieurs mécanismes sont impliqués dans la régulation de SRF tels que son niveau d'expression, son niveau de phosphorylation, sa liaison avec les co-facteurs TCFs, myocardine ou MRTFs et son interaction avec les microARNs.

2.3.1. Phosphorylation

L'activité de liaison à l'ADN de SRF nécessite la phosphorylation de sérines situées dans la région N-terminale, en amont et dans la région MADS (Prywes et coll., 1988 ; Janknecht et coll., 1992). Ces sites de phosphorylation peuvent se compenser les uns les autres mais une mutation de l'ensemble de ces sites inhibe totalement la liaison de SRF à l'ADN (Manak et Prywes, 1991). La phosphorylation de la région N-terminale de SRF ne perturbe ni sa dimérisation ni sa liaison avec les cofacteurs pour former le complexe ternaire (Ternary Complex Factors : TCFs) (Jenknecht et coll., 1992). Par ailleurs, la phosphorylation par la protéine kinase C- α (PKC α) de la sérine en position 162, située dans la boîte MADS, permettrait de réguler la balance entre l'activation des gènes de la prolifération et ceux de la différenciation (Iyer et coll., 2006). La substitution de cette sérine par une alanine empêche la phosphorylation de ce site. La protéine SRF ainsi mutée peut activer la transcription du gène *c-fos* mais elle ne peut pas se fixer sur les promoteurs des gènes musculaires tels que les *actines cardiaque, musculaire et lisse*, et ce même en présence des cofacteurs Nkx2.5, GATA4 ou myocardine. L'insertion de ce mutant dans des cellules ES SRF^{-/-} induit la transcription des IEGs mais pas des gènes musculaires (Iyer et coll., 2006). Ainsi, le niveau et les sites de phosphorylation de SRF occupent un rôle déterminant dans le choix vers l'activation de la prolifération ou de la différenciation.

2.3.2. Les TCFs

ELK-1 (E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1), SAP-1 (SRF accessory protein-1) et Net/ELK-3/SAP-2 sont 3 facteurs de transcription de la sous-famille des TCFs appartenant à la famille des protéines à domaine Ets. Ces 3 protéines forment un complexe ternaire avec le dimère SRF au niveau de la séquence SRE des promoteurs des IEGs, notamment *c-fos*, afin d'activer la prolifération (Shaw et coll., 1989). Ils se lient à l'ADN sur une séquence spécifique « AGGA » située en amont de la boîte CA_TG. La présence de la séquence SRE et la phosphorylation des TCFs par la voie des MAP kinases est nécessaire à la formation du complexe ternaire (Shaw et coll., 1989 ; Gille et coll., 1992 ; Janknecht et coll.,

1993). Les TCFs seuls peuvent se fixer sur la séquence « AGGA » du SRE mais ne peuvent pas activer la transcription de *c-fos* en l'absence de SRF (Janknecht et coll., 1993).

2.3.3. La myocardine et les MRTFs

La myocardine appartient à la famille des protéines SAP (SAF-A/B, Acinus, PIAS) et elle est exprimée pendant l'embryogenèse exclusivement dans les noyaux des cellules du cœur et du muscle lisse et uniquement dans les cardiomyocytes après la naissance. Elle est impliquée dans la différenciation cardiaque embryonnaire en se liant à SRF (Wang et coll., 2001). Contrairement à la myocardine, ses homologues myocardin-related transcription factors-A et factors-B (MRTF-A et MRTF-B) sont exprimés dans de nombreux tissus embryonnaires et adultes (Wang et coll., 2002). Ils jouent un rôle dans l'homéostasie du cytosquelette et au cours de l'embryogenèse. Si la myocardine est constitutivement présente dans le noyau, les MRTFs sont dépendants de la dynamique de l'actine pour s'associer à SRF et activer ses gènes cibles. En effet, la régulation de SRF est sensible aux changements de concentration de l'actine monomérique. Ces changements sont modulés par la voie RhoA induisant la polymérisation de l'actine (Sotiropoulos et coll., 1999). MRTF-A étant associé à l'actine monomérique dans le cytoplasme, l'activation de la polymérisation de l'actine permet sa libération. MRTF-A entre alors dans le noyau et active la transcription du programme cardiaque en s'associant à SRF (Miralles et coll., 2003). A ce jour, peu de données sont connues concernant le rôle de MRTF-B dans le cœur. Sachant que MRTF-B présente les mêmes motifs RPEL que MRTF-A nécessaires à la liaison avec l'actine, il semblerait que MRTF-B ait les mêmes fonctions que MRTF-A dans le tissu cardiaque (Miralles et coll., 2003) mais cela reste à confirmer.

Il a été décrit l'existence d'une compétition de liaison entre la myocardine et les facteurs TCFs sur le facteur de transcription SRF (Wang et coll., 2004). La myocardine s'associe à SRF par une courte séquence peptidique présentant des homologies avec un domaine des TCFs (Wang et coll., 2004). Après activation de la voie des MAP kinases par le facteur de croissance PDGF, la formation du complexe ELK-1-SRF est favorisée par rapport au complexe myocardine-SRF activant ainsi la croissance cellulaire tandis qu'en absence de

sérum, SRF s'associe préférentiellement à la myocardine et active l'expression des gènes de la différenciation musculaire (Wang et coll., 2004). Ce mécanisme pourrait apporter une autre explication quant à la détermination du choix de SRF entre prolifération et différenciation.

2.3.4. Les microARNs et autorégulation

Les microARNs (miRs) sont des petits ARNs non codants de 20 à 25 nucléotides qui interviennent dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. Ils inhibent la traduction en s'hybridant de manière complémentaire avec les ARNm. L'expression des miRs est restreinte dans l'espace et dans le temps permettant une adaptation fine de l'expression de leurs gènes cibles. La majorité de ces miRs s'expriment spécifiquement dans un tissu donné. Par exemple, *miR-1* et *miR-133* sont deux miRs spécifiques des myocytes et interviennent dans la prolifération et la différenciation cellulaire (Chen et coll., 2006). La relation entre SRF et le cluster biscistronique contrôlant l'expression de *miR-1* et *miR-133* joue un rôle très important dans le muscle cardiaque. En effet, il a été décrit que l'expression de *miR-1* et *miR-133a*, activée par SRF, joue un rôle essentiel dans le développement cardiaque, plus amplement développé dans le paragraphe 2.4.1. (Zhao et coll., 2005 ; Liu et coll., 2008). Chez les souris double KO *miR-133a-1* et *miR-133a-2*, en parallèle des défauts morphologiques cardiaques observés chez l'embryon, les auteurs ont remarqué une augmentation de l'expression de *Srf*. Ainsi *miR-133a* participe aussi à l'autorégulation de SRF et à la balance entre prolifération et différenciation cardiaque (Liu et coll., 2008). Par ailleurs, une étude *in silico* a mis en évidence la présence d'au moins 1 boîte CArG dans les régions promotrices de 169 miRs dont 40 contiennent au moins 3 boîtes CArG, cibles directes potentielles de SRF (Niu et coll., 2007).

2.4. SRF dans le cœur

La protéine SRF occupe un rôle essentiel dans le développement cardiaque, très tôt au cours de l'embryogenèse jusqu'à l'hypertrophie post-natale. Chez l'adulte, elle permet le

maintien de la fonction cardiaque, c'est pourquoi son dysfonctionnement entraîne de nombreux dérèglements cardiaques.

2.4.1. SRF dans la cardiomyogenèse

Le facteur de transcription SRF est connu pour s'exprimer très tôt au cours de la cardiomyogenèse. Il s'associe avec ses cofacteurs GATA4, Nkx2.5, TEF-1 et la myocardine dans le mésoderme précordique afin d'induire la différenciation cardiaque. Cette association avec ces cofacteurs permet d'augmenter l'affinité de SRF pour les boîtes CARG des gènes musculaires au détriment des gènes de prolifération (Sepulveda et coll., 2002 ; Grepin et coll., 1994 et 1995 ; Charron et coll., 1999). SRF s'associe également à des cofacteurs inhibant son activité, comme HDAC et HOP (Davis et coll., 2003 ; Chen et coll., 2002 ; Shin et coll., 2002). L'homéoprotéine HOP est exprimée dans les cardiomyocytes embryonnaires et son association avec SRF inhibe l'expression des gènes musculaires au profit des gènes de la prolifération via le recrutement des HDAC (Kook et coll., 2003).

Différentes études de perte de fonction ont pu mettre en évidence le rôle potentiel de SRF au cours du développement cardiaque. Un KO total de SRF chez la souris a permis de montrer son rôle crucial dans la formation du mésoderme au cours de la gastrulation (Arsenian et coll., 1998). Les embryons *Srf*^{-/-} se développent normalement jusqu'à E6.5 puis meurent à E12.5 en absence d'induction du mésoderme nécessaire à la formation des muscles. Une perte d'expression des gènes du développement (*Bra*, *Shh*, *Bmp2* et *Bmp4*) et des gènes cibles de SRF (*c-fos*, *Egr-1* et les 3 isoformes d'*actines*) empêche la mise en place des couches cellulaires primitives nécessaire à la formation du mésoderme. Des études *in vitro* inhibant l'expression de SRF sur des cellules ES montrent également une perte d'expression des gènes embryonnaires cardiaques et des défauts de formation du cœur (Sepulveda et coll., 2002 ; Niu et coll., 2005). Afin de déterminer le rôle de SRF spécifiquement dans le muscle cardiaque, plusieurs KO conditionnels basés sur la stratégie Cre/LoxP ont été créés chez la souris. Nous avons montré dans le laboratoire qu'une invalidation de SRF dans le coeur obtenue grâce à une recombinaison Cre placée sous le contrôle du promoteur du gène *β-mhc* provoque une diminution de la trabéculatation cardiaque chez les embryons mutants ainsi qu'une dilatation des

cavités cardiaques et une perte d'expression des gènes du développement cardiaque tels que *Nkx2.5*, *Gata4* et *myocardine* (Parlakian et coll., 2004). Une seconde étude de KO ciblée dans le coeur et les cellules du muscle lisse grâce à une recombinaison Cre contrôlée par le promoteur du gène *Sm22α* montrent également des défauts de trabéculations et une forte désorganisation des sarcomères (Miano et coll., 2004). En 2005, la création d'un KO conditionnel dans le coeur utilisant une recombinaison Cre placée sous le contrôle de promoteur du gène *α-mhc* met en évidence le rôle de SRF dans la maturation des cardiomyocytes. Les auteurs observent une augmentation de l'apoptose accompagnée d'une chute d'expression des 3 isoformes d'actines cardiaque, squelettique et lisse (Niu et coll., 2005). Ces 3 modèles de souris transgéniques se révèlent létaux entre E10.5 et E13.5.

SRF contrôle aussi la formation embryonnaire du coeur via les miRs, notamment par *miR-133a* et *miR-1*. Des sites de fixation pour des facteurs de transcription cardiaque tels SRF et MEF2 ont été caractérisés dans les régions promotrices du cluster contrôlant l'expression de ces 2 miRs. Une mutation sur le site de fixation de SRF ou le KO de SRF entraîne une forte diminution de l'expression de *miR-1-1* et *miR-1-2* (Miano et coll., 2004 ; Zhao et coll., 2005). L'apparition de l'expression de *miR-1-1* et de *miR-1-2* dans le coeur à partir de E8.5 suggère un rôle de *miR-1* dans la différenciation des cardiomyocytes. Une surexpression de *miR-1* exclusivement dans le coeur à partir de E9 sous le contrôle du promoteur du gène *β-mhc* entraîne l'arrêt du développement du coeur à E13.5 accompagné d'une diminution de la prolifération des cardiomyocytes et d'un affinement de la paroi ventriculaire (Zhao et coll., 2005). De même, l'interaction entre SRF et *miR-133a* est cruciale lors du développement cardiaque. Une surexpression de *miR-133a* est létale dès E15.5 (Liu et coll., 2008). A E13.5, le coeur des embryons transgéniques est dilaté et possède une paroi ventriculaire amincie. Une diminution de la prolifération est constatée alors que le taux d'apoptose reste inchangé (Liu et coll., 2008). La double invalidation des gènes *miR-133a-1* et *miR-133a-2* entraîne le décès de la majorité des souris au lendemain de leur naissance (Liu et coll., 2008).

2.4.2. SRF et l'hypertrophie post-natale

L'hypertrophie post-natale est un évènement physiologique nécessaire au développement du cœur après l'arrêt de prolifération des cardiomyocytes à la naissance. Un certain nombre d'études laisse apparaître que SRF joue un rôle essentiel au bon déroulement de ce processus. L'addition d'un adénovirus Cre sur des cardiomyocytes isolés de souris *Srf*^{fl/fl} néonatales a permis de montrer une dérégulation de l'expression de nombreux gènes de l'appareil contractile tels que les *actines*, *α-mhc* et la *troponine C* (Balza et Misra, 2005 ; Nelson et coll., 2005). La perte d'expression de SRF dans ces cardiomyocytes isolés montre l'implication de SRF dans le dynamisme calcique et le stress cardiaque *via* la régulation de *Ncx1* et *Anf* (Nelson et coll., 2005). Une surexpression de SRF perturbe aussi l'expression des gènes sarcomériques (Nelson et coll., 2005). Des modèles transgéniques de perte de fonction de SRF confirment ces observations. L'expression dans les cardiomyocytes d'une forme mutée de SRF incapable de se fixer sur la séquence SRE provoque la mort des souris transgéniques entre 9 et 12 jours après la naissance (Zhang et coll., 2001a). Ces animaux meurent suite à une forte désorganisation des sarcomères et une dilatation des ventricules et présentent une chute d'expression des protéines cardiaques telles que α -MHC, actine cardiaque et SERCA2 et une augmentation de l'expression des gènes de stress cardiaque comme *Anf*, *actine squelettique* et *β-mhc* (Zhang et coll., 2001a). Des modèles *in vivo* de surexpression de SRF dans le coeur ont montré une corrélation entre le nombre de copies du transgène *Srf* intégrés et la rapidité de l'évolution de la maladie cardiaque vers le décès de l'animal (Zhang et coll., 2001b). Ces différentes études *in vitro* et *in vivo* montrent qu'une régulation fine de l'expression de SRF est nécessaire au bon déroulement de l'hypertrophie post-natale.

2.4.3. SRF chez l'adulte

SRF joue également un rôle essentiel dans le maintien de la fonction cardiaque chez l'adulte. Plusieurs études incluant celles de notre laboratoire l'ont validé à travers des stratégies de perte ou de gain de fonction.

Notre laboratoire a créé un modèle murin transgénique de perte de fonction de SRF dans le cœur de manière conditionnelle et inductible. A l'aide de la stratégie Cre/LoxP inductible par injections de tamoxifène, l'inactivation du gène *Srf* provoque chez la souris adulte âgées de 2 mois le développement d'une CMD conduisant à la défaillance cardiaque puis au décès des animaux en moins de 10 semaines (Parlakian et coll., 2005). Au cours des 3 premières semaines suivant les injections de tamoxifène, les auteurs ont observé une tentative d'hypertrophie du cœur afin de compenser la perte de SRF mais celle-ci avorte rapidement en faveur d'une CMD. Celle-ci se caractérise par une diminution de la fraction d'éjection (FE), de la vitesse de raccourcissement des cardiomyocytes (VRC) et par une dilatation des ventricules, plus particulièrement le ventricule gauche (VG). Les auteurs ont remarqué une forte désorganisation des sarcomères et le développement d'une fibrose accompagnée d'une chute d'expression des gènes cardiaques tels que *l'actine cardiaque*, *α -mhc*, *Mck* et *Serca2*. Une seconde étude toujours chez la souris a montré qu'une augmentation du taux protéique de SRF après l'intégration de 1 copie du transgène de *Srf* exprimé spécifiquement dans le cœur, entraîne également le développement d'une cardiomyopathie. Elle se caractérise par une dilatation des cavités cardiaques, une hypertrophie pathologique des cardiomyocytes et l'apparition de fibrose cardiaque (Zhang et coll., 2001a). Ces animaux meurent en revanche à l'âge de 6 mois.

2.4.4. SRF au cours du vieillissement

Chez des individus âgés, l'apparition de problèmes cardiaques est fréquente au cours du vieillissement. Le dérèglement de l'expression de SRF pourrait intervenir dans cette perturbation de la fonction cardiaque. En effet, une augmentation d'environ 20% de l'expression de *Srf* dans le cœur avec l'âge a été décrite chez le rat et la souris (Lu et coll., 1998 ; Zhang et coll., 2003). De plus, une surexpression de SRF dans le cœur de 49% en ARNm entraîne l'apparition progressive d'une cardiomyopathie avec une réexpression de gènes fœtaux et le développement primaire d'une fibrose cardiaque (Zhang et coll., 2003). Ces souris transgéniques âgées de 5 semaines ont une fonction cardiaque équivalente à celle des animaux non transgéniques âgés de 16 semaines (Zhang et coll., 2003). Les auteurs

considèrent ce modèle comme un modèle de vieillissement cardiaque bien que l'expression transcriptionnelle de *Srf* soit plus importante que dans le phénomène de vieillissement physiologique. La même équipe a créé un modèle de souris transgéniques exprimant un dominant négatif de SRF. Ces souris âgées de 15 mois exprimant le même taux protéique de SRF que de jeunes souris de 3 mois présentent une meilleure fonction cardiaque que des souris non transgéniques du même âge (Azhar et coll., 2007). L'augmentation de l'expression de *Serca2* améliore la dynamique des échanges calciques et la diminution d'expression de *Bnp* témoigne d'une atténuation du stress cardiaque.

2.4.5. SRF dans les pathologies cardiaques

A ce jour, aucun lien direct n'a été décrit entre une mutation du gène *Srf* et une pathologie cardiaque mais il est clairement établi qu'un dysfonctionnement de l'expression de SRF pourrait jouer un rôle déterminant dans l'évolution vers la défaillance cardiaque. Plusieurs arguments sont en cette faveur. Une première étude a décrit la présence en quantité importante de l'isoforme tronquée SRF-S chez des patients atteints de défaillance cardiaque induite par des cardiomyopathies ou par des pathologies touchant les artères coronariennes (Davis et coll., 2002). Ce taux élevé de SRF-S (40% contre 20% chez un patient sain) s'accompagne d'une diminution de l'expression de SRF-L (14% contre 56% chez un patient sain). Par dimérisation avec la forme mature, ces formes tronquées de SRF agissent comme des dominants négatifs et participent à l'inhibition de son activité transactivatrice (Chang et coll., 2003 ; Kemp et Metcalfe, 2000 ; Belaguli et coll., 1999).

Une forme trans-dominante négative peut également être générée après clivage de SRF-L par la caspase 3 (Chang et coll., 2003). Cette isoforme, appelée SRF-N, est retrouvée chez des patients atteints de cardiomyopathies et est susceptible d'accélérer l'évolution de la maladie vers la défaillance cardiaque. En revanche, il est intéressant de remarquer que cette forme clivée de SRF n'est pas retrouvée chez les patients ayant un stimulateur cardiaque (Chang et coll., 2003). Par ailleurs, il a été montré que SRF-L induisait l'activation du gène anti-apoptotique *Bcl2* (Schratt et coll., 2004). Ces observations renforcent l'idée que l'altération de SRF observée dans les pathologies cardiaques accentue l'évolution de la

maladie vers la défaillance cardiaque via le phénomène d'apoptose impliqué dans le remodelage cardiaque pathologique (Narula et coll., 2000).

3. IGF-1

Initialement décrite comme molécule du sérum pouvant induire la croissance cellulaire (Daughaday et Reeder, 1966), le facteur de croissance similaire à l'insuline (IGF-1) est une protéine bien connue pour intervenir dans la croissance et la prolifération cellulaire mais aussi dans la différenciation musculaire.

3.1. Généralités

3.1.1. Le gène

Très conservé au cours de l'évolution, le gène codant pour IGF-1 possède une taille de 100 kb chez l'Homme et de 80 kb chez les rongeurs. Grâce à ses différents sites d'initiation et ses nombreuses combinaisons d'épissages alternatifs (Rinderknecht et Humbel, 1978 ; Rotwein et coll., 1986a ; Shimatsu et Rotwein, 1987), son locus peut générer différentes isoformes caractérisées par différents peptides signal en N-terminal et différents peptides d'extension (peptide E) en C-terminal de part et d'autre de la protéine IGF-1 mature.

Le gène humain *IGF-1* est composé de 6 exons (Shimatsu et Rotwein, 1987 ; Bucci et coll., 1989). Les exons 1 et 2 codent pour le peptide signal spécifique de chaque isoforme de la protéine IGF-1. L'exon 3 code pour les 27 aa restants du peptide signal, qui sont communs à toutes les isoformes et pour une partie de la protéine mature d'IGF-1. L'exon 4 code pour le reste de la partie mature d'IGF-1 et pour 16 aa du peptide E, communs aux différentes isoformes. Les exons 5 et 6 codent pour les parties du peptide E spécifiques à chaque isoforme.

Le gène *IGF-1* contient 2 promoteurs distincts, chacun spécifique de l'exon 1 et de l'exon 2 (Yang et coll., 1995). Ces promoteurs contiennent respectivement 4 et 3 sites d'initiation de la transcription. Il est intéressant de noter que les isoformes musculaires d'IGF-1 sont principalement initiées par les sites 2 et 3 du promoteur de l'exon 1 (Yang et coll., 1995 ; Simmons et coll., 1993) et l'isoforme cardiaque provient exclusivement de l'initiation à partir du site 3. De plus, seule l'isoforme produite à partir de la transcription de l'exon 1 est retrouvée dans les muscles (Shemer et coll., 1992).

3.1.2. Les différentes isoformes

La complexité du patron d'épissage alternatif en 5' et en 3' génère différentes isoformes d'IGF-1.

En 5', il existe 2 types de peptide signal répartis en classe I et en classe II. Les isoformes de classe I, produits à partir de l'exon 1, possèdent un peptide signal de 48 aa ou de 22 aa en fonction de leur site d'initiation. Il n'existe qu'une isoforme unique de classe II caractérisée par un peptide signal de 32 aa synthétisé à partir de l'exon 2.

En 3' du transcrit de *IGF-1*, 3 types de peptide E ont été décrits chez l'Homme. Il existe un épissage alternatif entre les exons 4 et 6 produisant un peptide Ea de 35 aa présentant 91% d'homologie avec la souris (Jansen et coll., 1983 ; Bell et coll., 1986). L'isoforme IGF-1Ea est principalement retrouvée dans le foie et le muscle (Lowe et coll., 1988 ; Musaro et coll., 2001). Un épissage alternatif est également possible entre les exons 4 et 5 (Rotwein, 1986b). Celui-ci produit un précurseur contenant le peptide Eb de 77 aa, ne présentant aucune similitude avec un homologue murin (Rotwein, 1986b). Enfin, le peptide Ec de 40 aa est généré à partir de l'épissage alternatif entre les exons 4, 5 et 6. L'insertion de 49 pb de l'exon 5 entraîne la modification du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop dans l'exon 6. Ce peptide Ec présente 73% d'homologie avec la souris (Chew et coll., 1995) et l'IGF-1Ec est souvent retrouvé dans le foie, le muscle et le cerveau (Yang et coll., 1996 ; Dluzniewska et coll., 2005). Plusieurs sites de polyadénylation situés dans l'exon 6 interviennent également dans la demi-vie des transcrits d'IGF-1.

3.1.3. La protéine et sa fonction

Comme beaucoup de facteurs de croissance, IGF-1 est produit sous la forme d'un précurseur qui nécessite des modifications post-traductionnelles afin d'être mature. Le peptide signal, en N-terminal, est libéré sous l'action d'une peptidase signal qui clive entre le peptide signal et le proIGF-1 (Martoglio, 2003). En C-terminal, le peptide E est libéré par des sérines protéases de la famille des pro-protéines convertases ressemblant à la subtilisine (PCS) dont la principale représentante est la furine (Barr, 1991 ; Duguay et coll., 1995).

La protéine IGF-1, enfin mature, est composée de 70 aa répartis en 4 domaines B-C-A-D, de N-terminal en C-terminal. Les domaines B et A présente 63% d'homologie avec l'insuline (Rinderknecht et coll., 1978). IGF-1 est principalement sécrété par le foie de manière systémique mais est également produit localement pour une action paracrine ou autocrine par différents organes comme le muscle, le tissu adipeux, le cerveau et le pancréas (Roberts et coll., 1987).

Structuralement similaire à l'insuline, l'IGF-1 induit les mêmes effets métaboliques à court terme tandis qu'à long terme, il active la prolifération de nombreux types cellulaires différents ainsi que la différenciation, celle du muscle squelettique principalement (Ren et coll., 1999).

3.2. Régulation de IGF-1

Le facteur de croissance IGF-1 a besoin d'interagir avec plusieurs partenaires afin d'assurer la régulation de son activité.

3.2.1. Son récepteur : IGF-1R

Le récepteur spécifique d'IGF-1 (IGF-1R) est de type tyrosine kinase. Il est composé de 2 chaînes, α et β , organisées en dimères. Les chaînes α , à l'extérieur de la cellule, interagissent avec leur ligand tandis que les chaînes β , à la fois transmembranaires et

cytoplasmiques, contiennent le domaine tyrosine kinase (De Meyts et Whittaker, 2002). La fixation d'IGF-1 sur son récepteur entraîne le changement de conformation du récepteur et induit la phosphorylation du domaine tyrosine kinase puis des différents effecteurs en aval des voies de signalisation concernées. L'insuline et IGF-2 peuvent interagir avec IGF-1R mais avec une affinité moindre qu'IGF-1 (Pandini et coll., 2002).

3.2.2. Son homologue : IGF-2

IGF-1 possède un homologue, IGF-2. Celui-ci est composé de 67 aa et présente la même structure générale qu'IGF-1. La régulation de son expression est particulière car elle est soumise à l'empreinte parentale ; seul l'allèle paternel est actif (Chao et D'Amore, 2008). IGF-2 possède son propre récepteur, IGF-2R. Ne transmettant pas de signal, celui-ci séquestre IGF-2 pour contrôler son interaction avec IGF-1R (Scott et Firth, 2004). Une augmentation d'IGF-2, pouvant être due à la perte de l'empreinte parentale ou à une inactivation d'IGF-2R, peut induire des effets mitotiques et jouer un rôle dans les cancers (McCann et coll., 1996). Comme IGF-1, IGF-2 intervient dans le développement musculaire et active la différenciation des myocytes *via* PI3K et AKT (Wilson et coll., 2003). Cependant, IGF-2 possède un domaine d'activité différent d'IGF-1. Il semblerait que l'expression transcriptionnelle d'IGF-2 chez la souris soit principalement embryonnaire (DeChiara et coll., 1991, vu dans Chao et D'Amore, 2008) tandis qu'IGF-2 est la forme d'IGF prédominante chez l'homme adulte (LeRoith et Roberts, 2003).

3.2.3. Ses protéines de liaison : IGF-IBPs

L'activité biologique d'IGF-1 et d'IGF-2 est régulée par des protéines de liaison aux IGFs, les IGF-BPs. Ces protéines contrôlent leur disponibilité et leur demi-vie de manière positive ou négative en formant un complexe les empêchant de se fixer au récepteur. Aujourd'hui, on dénombre 6 IGF-BPs (IGFBP-1 à IGFBP-6) de haute affinité retrouvées chez les mammifères (Kiefer et coll., 1991 ; Kim et coll., 1997). Les IGFBP-1 à 4 ont une plus

grande affinité pour IGF-1 tandis que IGFBP-5 et 6 se lient préférentiellement à IGF-2. D'autres IGFBPs (IGFBP-7 à IGFBP-10) ont été décrits comme de faible affinité (Fujinaka et coll., 2010). Parmi ces IGFBPs, IGFBP-8 est plus connu sous le nom de Connective Tissue Growth Factor (CTGF) (Kim et coll., 1997). Comme mac25/IGFBP-7 et les autres IGFBPs de faible affinité, CTGF présente un motif de liaison de faible affinité aux IGFs « GCGCCXXC » en N-terminal (Kim et coll., 1997). Il a été décrit que les IGFBPs jouent un rôle dans la prolifération, la différenciation et la régénération des myoblastes (Mourkioti et Rosenthal, 2005).

3.3. IGF-1 cardioprotecteur

Au cours des deux dernières décennies, de nombreuses études ont clairement montré les effets bénéfiques d'IGF-1 sur le muscle cardiaque.

Chez l'homme, des études cliniques ont montré qu'une administration d'IGF-1 augmentait le débit cardiaque et le volume systolique des sujets sains, témoignant de l'amélioration de leurs capacités contractiles (Russell-Jones et coll., 1995 ; Donath et coll., 1996). Chez plusieurs patients atteints de défaillance cardiaque depuis plus de 3 mois, un traitement d'IGF-1 administré à 60 µg/kg sur 2 jours consécutifs pendant 4h permet de diminuer la surcharge de travail du cœur (Donath et coll., 1998). Les patients ayant reçu ce traitement voient leur volume systolique augmenter ainsi que leur pression artérielle pulmonaire et leur résistance systémique vasculaire diminuer respectivement de 25% et de 28%.

L'utilisation de modèles animaux a conforté ces données. Le hamster CHF147, naturellement déficient en δ -sarcoglycan, est utilisé comme modèle de CMD. Une administration contrôlée d'IGF-1 par micropompe permet à ces animaux de survivre environ 80 jours de plus grâce à une amélioration de leur fonction cardiaque et une inhibition du développement de la fibrose (Serosé et coll., 2005, 2006). De plus, dans un modèle murin de CMD induite par une surexpression de la tropomoduline dans le cœur, une surexpression d'IGF1 améliore la fonction cardiaque de ces animaux grâce à une diminution de l'apoptose.

Elle permet également une restauration de la dynamique des échanges calciques conservant la contractilité des cardiomyocytes (Welch et coll., 2002).

Des études de surexpression d'IGF-1 ont permis d'approfondir les connaissances des effets cardioprotecteurs du facteur de croissance. Une surexpression de l'isoforme humaine IGF-1B sous le contrôle du promoteur du gène *α -mhc* permet d'augmenter la taille du cœur par augmentation du taux de prolifération sans observation d'hypertrophie des cardiomyocytes (Reiss et coll., 1996). La pression sanguine n'est pas influencée mais une augmentation de 39% de la vitesse de raccourcissement des cardiomyocytes est constatée (Redaelli et coll., 1998). Un autre modèle de surexpression d'IGF-1 humain a été créé chez la souris sous le contrôle du promoteur du gène *actine squelettique* (DeLaughter et coll., 1999). Cette isoforme, exprimée dans le cœur et dans le muscle squelettique, améliore le débit cardiaque et augmente d'environ 22% le poids des cœurs des animaux âgés de 10 semaines. Cependant, ces effets bénéfiques s'estompent avec le temps et cette surexpression d'IGF-1 devient néfaste à l'âge de 52 semaines. A 72 semaines, les auteurs observent une hypertrophie concentrique et le développement d'une fibrose cardiaque démontrant les limites d'un traitement chronique par IGF-1 (DeLaughter et coll., 1999).

La cardioprotection apportée par IGF-1 dépend de l'isoforme utilisée et de la localisation de son expression. L'équipe de Nadia Rosenthal a développé un modèle murin de surexpression de l'isoforme musculaire d'IGF-1 de rat (mIGF-1) exclusivement dans le cœur sous le contrôle du promoteur du gène *α -mhc*. Cette surexpression permet de protéger le cœur d'agressions suite à des injections de cardiotoxine (Santini et coll., 2007). La restauration du tissu cardiaque est facilitée grâce à une activation de la prolifération des cardiomyocytes et du signal anti-apoptotique. Une inhibition de la fibrogenèse et de la réponse inflammatoire est également observée. De plus, cette même construction s'avère protectrice contre le stress oxydatif *via* l'activation de l'intermédiaire SirT1, connu pour son rôle protecteur contre l'apoptose (Vinciguerra et coll., 2010 ; Alcendor et coll., 2007). Elle atténue l'hypertrophie pathologique cardiaque induite en inhibant l'expression des gènes fœtaux tels que *actine squelettique* ou *β -mhc* et en activant des gènes cardioprotecteurs comme *adiponectine* et *Ucp-1*.

OBJECTIFS

Afin de mieux appréhender le rôle de SRF et de ses cibles dans le remodelage cardiaque, le laboratoire a développé un modèle murin d'invalidation conditionnelle et inductible du gène codant SRF en utilisant la stratégie Cre-LoxP. Chez les souris adultes âgées de 2 mois, l'invalidation de SRF spécifiquement dans le cœur provoque une diminution de la fonction cardiaque et le développement d'une cardiomyopathie dilatée. Le programme cardiaque de l'expression génique est fortement perturbé avec une diminution de l'expression des gènes cibles de SRF tel que l'actine cardiaque, la MCK ou encore les gènes impliqués dans le métabolisme calcique. L'architecture des cardiomyocytes est profondément altérée au niveau des disques intercalaires. Toutes les souris mutantes meurent de défaillance cardiaque dans les 10 semaines suivant le traitement au tamoxifène pour invalider le gène. L'ensemble de ces données a largement conforté le rôle majeur de SRF sur la fonction cardiaque.

Par ailleurs, de nombreuses équipes ont travaillé, en abordant divers aspects, sur le rôle cardioprotecteur du facteur de croissance IGF-1 dans le muscle cardiaque. Parmi ces équipes, celle de Nadia Rosenthal a développé et caractérisé un modèle murin surexprimant de manière conditionnelle l'isoforme mIGF-1 dans les cardiomyocytes. La surexpression locale de mIGF-1 assure une protection de la fonction cardiaque dans les conditions de stress (injections de cardiotoxine ou ligation de l'artère coronaire gauche) par modulation de la réponse inflammatoire et diminution de l'activité apoptotique.

Afin de déterminer si cette isoforme mIGF-1 pouvait avoir un impact sur le développement de la CMD observée dans le modèle d'invalidation du gène *Srf* dans le cœur, nous avons croisé nos souris avec celles de Nadia Rosenthal et nous avons induit la perte de SRF par injections de tamoxifène en maintenant la surexpression du facteur de croissance chez nos souris âgés de 2 mois.

Les objectifs de mon travail ont été d'analyser les paramètres fonctionnels et morphologiques du cœur pour les différents groupes de souris et d'étudier l'impact de mIGF-1 sur les gènes cibles de SRF. Je me suis intéressée à une caractérisation plus précise de la fibrose cardiaque développée dans notre modèle de CMD en s'attachant particulièrement au rôle de CTGF et à mettre en lumière les effets relationnels entre SRF, CTGF et mIGF-1.

BIBLIOGRAPHIE

Akhter S.A., Luttrell L.M., Rockman H.A., Iaccarino G., Lefkowitz R.J. and Koch W.J. Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science*. 280 (5363): 574-7.1998

Alcendor R.R., Gao S., Zhai P., Zablocki D., Holle E., Yu X., Tian B., Wagner T., Vatner S.F. and Sadoshima J. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res*. 100 (10): 1512-21.2007

Arsenian S., Weinhold B., Oelgeschlager M., Ruther U. and Nordheim A. Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *Embo J*. 17 (21): 6289-99.1998

Azhar G., Zhang X., Wang S., Zhong Y., Quick C.M. and Wei J.Y. Maintaining serum response factor activity in the older heart equal to that of the young adult is associated with better cardiac response to isoproterenol stress. *Basic Res Cardiol*. 102 (3): 233-44.2007

Balza R.O., Jr. and Misra R.P. Role of the serum response factor in regulating contractile apparatus gene expression and sarcomeric integrity in cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 281 (10): 6498-510.2006

Barr P.J. Mammalian subtilisins: the long-sought dibasic processing endoproteases. *Cell*. 66 (1): 1-3.1991

Barrans J.D., Allen P.D., Stamatiou D., Dzau V.J. and Liew C.C. Global gene expression profiling of end-stage dilated cardiomyopathy using a human cardiovascular-based cDNA microarray. *Am J Pathol*. 160 (6): 2035-43.2002

Belaguli N.S., Schildmeyer L.A. and Schwartz R.J. Organization and myogenic restricted expression of the murine serum response factor gene. A role for autoregulation. *J Biol Chem*. 272 (29): 18222-31.1997

Belaguli N.S., Zhou W., Trinh T.H., Majesky M.W. and Schwartz R.J. Dominant negative murine serum response factor: alternative splicing within the activation domain inhibits transactivation of serum response factor binding targets. *Mol Cell Biol*. 19 (7): 4582-91.1999

Bell G.I., Stempien M.M., Fong N.M. and Rall L.B. Sequences of liver cDNAs encoding two different mouse insulin-like growth factor I precursors. *Nucleic Acids Res*. 14 (20): 7873-82.1986

Bucci C., Mallucci P., Roberts C.T., Frunzio R. and Bruni C.B. Nucleotide sequence of a genomic fragment of the rat IGF-I gene spanning an alternate 5' non coding exon. *Nucleic Acids Res*. 17 (9): 3596.1989

Bui A.L., Horwich T.B. and Fonarow G.C. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 8 (1): 30-41.2011

Chai J. and Tarnawski A.S. Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *J Physiol Pharmacol.* 53 (2): 147-57.2002

Chang J., Wei L., Otani T., Youker K.A., Entman M.L. and Schwartz R.J. Inhibitory cardiac transcription factor, SRF-N, is generated by caspase 3 cleavage in human heart failure and attenuated by ventricular unloading. *Circulation.* 108 (4): 407-13.2003

Chao W. and D'Amore P.A. IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19 (2): 111-20.2008

Charron F., Paradis P., Bronchain O., Nemer G. and Nemer M. Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression. *Mol Cell Biol.* 19 (6): 4355-65.1999

Chen F., Kook H., Milewski R., Gitler A.D., Lu M.M., Li J., Nazarian R., Schnepf R., Jen K., Biben C., Runke G., Mackay J.P., Novotny J., Schwartz R.J., Harvey R.P., Mullins M.C. and Epstein J.A. Hop is an unusual homeobox gene that modulates cardiac development. *Cell.* 110 (6): 713-23.2002

Chen J.F., Mandel E.M., Thomson J.M., Wu Q., Callis T.E., Hammond S.M., Conlon F.L. and Wang D.Z. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet.* 38 (2): 228-33.2006

Chen W.S., Xu P.Z., Gottlob K., Chen M.L., Sokol K., Shiyanova T., Roninson I., Weng W., Suzuki R., Tobe K., Kadowaki T. and Hay N. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev.* 15 (17): 2203-8.2001

Chew S.L., Lavender P., Clark A.J. and Ross R.J. An alternatively spliced human insulin-like growth factor-I transcript with hepatic tissue expression that diverts away from the mitogenic IBE1 peptide. *Endocrinology.* 136 (5): 1939-44.1995

Chien K.R., Knowlton K.U., Zhu H. and Chien S. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *Faseb J.* 5 (15): 3037-46.1991

Daniels A., van Bilsen M., Goldschmeding R., van der Vusse G.J. and van Nieuwenhoven F.A. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis. *Acta Physiol (Oxf).* 195 (3): 321-38.2009

Daughaday W.H. and Reeder C. Synchronous activation of DNA synthesis in hypophysectomized rat cartilage by growth hormone. *J Lab Clin Med.* 68 (3): 357-68.1966

Davis F.J., Gupta M., Camoretti-Mercado B., Schwartz R.J. and Gupta M.P. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase activates serum response factor transcription activity by its dissociation from histone deacetylase, HDAC4. Implications in cardiac muscle gene regulation during hypertrophy. *J Biol Chem.* 278 (22): 20047-58.2003

Davis F.J., Gupta M., Pogwizd S.M., Bacha E., Jeevanandam V. and Gupta M.P. Increased expression of alternatively spliced dominant-negative isoform of SRF in human failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 282 (4): H1521-33.2002

De Meyts P. and Whittaker J. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov.* 1 (10): 769-83.2002

DeChiara T.M., Robertson E.J. and Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell.* 64 (4): 849-59.1991

Delahaye F., Roth O., Aupetit J.F. and de Gevigney G. [Epidemiology and prognosis of cardiac insufficiency]. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 94 (12): 1393-403.2001

Delaughter M.C., Taffet G.E., Fiorotto M.L., Entman M.L. and Schwartz R.J. Local insulin-like growth factor I expression induces physiologic, then pathologic, cardiac hypertrophy in transgenic mice. *Faseb J.* 13 (14): 1923-9.1999

Deschamps J., Meijlink F. and Verma I.M. Identification of a transcriptional enhancer element upstream from the proto-oncogene fos. *Science.* 230 (4730): 1174-7.1985

Dluzniewska J., Sarnowska A., Beresewicz M., Johnson I., Srail S.K., Ramesh B., Goldspink G., Gorecki D.C. and Zablocka B. A strong neuroprotective effect of the autonomous C-terminal peptide of IGF-1 Ec (MGF) in brain ischemia. *Faseb J.* 19 (13): 1896-8.2005

Donath M.Y., Jenni R., Brunner H.P., Anrig M., Kohli S., Glatz Y. and Froesch E.R. Cardiovascular and metabolic effects of insulin-like growth factor I at rest and during exercise in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 81 (11): 4089-94.1996

Donath M.Y., Sutsch G., Yan X.W., Piva B., Brunner H.P., Glatz Y., Zapf J., Follath F., Froesch E.R. and Kiowski W. Acute cardiovascular effects of insulin-like growth factor I in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 83 (9): 3177-83.1998

Duerr R.L., Huang S., Miraliakbar H.R., Clark R., Chien K.R. and Ross J., Jr. Insulin-like growth factor-1 enhances ventricular hypertrophy and function during the onset of experimental cardiac failure. *J Clin Invest.* 95 (2): 619-27.1995

Duguay S.J., Lai-Zhang J. and Steiner D.F. Mutational analysis of the insulin-like growth factor I prohormone processing site. *J Biol Chem.* 270 (29): 17566-74.1995

Duisters R.F., Tijssen A.J., Schroen B., Leenders J.J., Lentink V., van der Made I., Herias V., van Leeuwen R.E., Schellings M.W., Barenbrug P., Maessen J.G., Heymans S., Pinto Y.M. and Creemers E.E. miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circ Res.* 104 (2): 170-8, 6p following 178.2009

Esposito G., Prasad S.V., Rapacciuolo A., Mao L., Koch W.J. and Rockman H.A. Cardiac overexpression of a G(q) inhibitor blocks induction of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase activity in in vivo pressure overload. *Circulation.* 103 (10): 1453-8.2001

Fujinaka H., Katsuyama K., Yamamoto K., Nameta M., Yoshida Y., Yaoita E., Tomizawa S. and Yamamoto T. Expression and localization of insulin-like growth factor binding proteins in normal and proteinuric kidney glomeruli. *Nephrology (Carlton).* 15 (7): 700-9.2010

Gille H., Sharrocks A.D. and Shaw P.E. Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature.* 358 (6385): 414-7.1992

Gilman M.Z., Wilson R.N. and Weinberg R.A. Multiple protein-binding sites in the 5'-flanking region regulate c-fos expression. *Mol Cell Biol.* 6 (12): 4305-16.1986

Greenberg M.E. and Ziff E.B. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature.* 311 (5985): 433-8.1984

Grepin C., Dagnino L., Robitaille L., Haberstroh L., Antakly T. and Nemer M. A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Mol Cell Biol.* 14 (5): 3115-29.1994

Grepin C., Robitaille L., Antakly T. and Nemer M. Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks in vitro cardiac muscle differentiation. *Mol Cell Biol.* 15 (8): 4095-102.1995

Heineke J. and Molkentin J.D. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7 (8): 589-600.2006

Hershberger R.E. and Siegfried J.D. Update 2011: clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 57 (16): 1641-9

Ieda M., Tsuchihashi T., Ivey K.N., Ross R.S., Hong T.T., Shaw R.M. and Srivastava D. Cardiac fibroblasts regulate myocardial proliferation through beta1 integrin signaling. *Dev Cell.* 16 (2): 233-44.2009

Iyer D., Chang D., Marx J., Wei L., Olson E.N., Parmacek M.S., Balasubramanyam A. and Schwartz R.J. Serum response factor MADS box serine-162 phosphorylation switches proliferation and myogenic gene programs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (12): 4516-21.2006

Janknecht R., Ernst W.H., Pingoud V. and Nordheim A. Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. *Embo J.* 12 (13): 5097-104.1993

Janknecht R., Hipskind R.A., Houthaeve T., Nordheim A. and Stunnenberg H.G. Identification of multiple SRF N-terminal phosphorylation sites affecting DNA binding properties. *Embo J.* 11 (3): 1045-54.1992

Jansen M., van Schaik F.M., Ricker A.T., Bullock B., Woods D.E., Gabbay K.H., Nussbaum A.L., Sussenbach J.S. and Van den Brande J.L. Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. *Nature.* 306 (5943): 609-11.1983

Johansen F.E. and Prywes R. Two pathways for serum regulation of the c-fos serum response element require specific sequence elements and a minimal domain of serum response factor. *Mol Cell Biol.* 14 (9): 5920-8.1994

Kakkar R. and Lee R.T. Intramyocardial fibroblast myocyte communication. *Circ Res.* 106 (1): 47-57.2010

Kemp P.R. and Metcalfe J.C. Four isoforms of serum response factor that increase or inhibit smooth-muscle-specific promoter activity. *Biochem J.* 345 Pt 3: 445-51.2000

Kiefer M.C., Ioh R.S., Bauer D.M. and Zapf J. Molecular cloning of a new human insulin-like growth factor binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 176 (1): 219-25.1991

Kim H.S., Nagalla S.R., Oh Y., Wilson E., Roberts C.T., Jr. and Rosenfeld R.G. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94 (24): 12981-6.1997

Kook H., Lepore J.J., Gitler A.D., Lu M.M., Wing-Man Yung W., Mackay J., Zhou R., Ferrari V., Gruber P. and Epstein J.A. Cardiac hypertrophy and histone deacetylase-dependent transcriptional repression mediated by the atypical homeodomain protein Hop. *J Clin Invest.* 112 (6): 863-71.2003

Leask A. and Abraham D.J. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *Faseb J.* 18 (7): 816-27.2004

LeRoith D. and Roberts C.T., Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett.* 195 (2): 127-37.2003

LeRoy E.C., Trojanowska M.I. and Smith E.A. Cytokines and human fibrosis. *Eur Cytokine Netw.* 1 (4): 215-9.1990

Liu N., Bezprozvannaya S., Williams A.H., Qi X., Richardson J.A., Bassel-Duby R. and Olson E.N. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev.* 22 (23): 3242-54.2008

Lowe W.L., Jr., Lasky S.R., LeRoith D. and Roberts C.T., Jr. Distribution and regulation of rat insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acids encoding alternative carboxyterminal E-peptides: evidence for differential processing and regulation in liver. *Mol Endocrinol.* 2 (6): 528-35.1988

Lu X.G., Azhar G., Liu L., Tsou H. and Wei J.Y. SRF binding to SRE in the rat heart: influence of age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 53 (1): B3-10.1998

Lunde I.G., Kvaloy H., Austbo B., Christensen G. and Carlson C.R. Angiotensin II and norepinephrine activate specific calcineurin-dependent NFAT transcription factor isoforms in cardiomyocytes. *J Appl Physiol.*2011

Manak J.R. and Prywes R. Mutation of serum response factor phosphorylation sites and the mechanism by which its DNA-binding activity is increased by casein kinase II. *Mol Cell Biol.* 11 (7): 3652-9.1991

Martoglio B. Intramembrane proteolysis and post-targeting functions of signal peptides. *Biochem Soc Trans.* 31 (Pt 6): 1243-7.2003

McCann A.H., Miller N., O'Meara A., Pedersen I., Keogh K., Gorey T. and Dervan P.A. Biallelic expression of the IGF2 gene in human breast disease. *Hum Mol Genet.* 5 (8): 1123-7.1996

McMullen J.R. and Jennings G.L. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 34 (4): 255-62.2007

Miano J.M., Ramanan N., Georger M.A., de Mesy Bentley K.L., Emerson R.L., Balza R.O., Jr., Xiao Q., Weiler H., Ginty D.D. and Misra R.P. Restricted inactivation of serum response factor to the cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 (49): 17132-7.2004

Miralles F., Posern G., Zaromytidou A.I. and Treisman R. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell.* 113 (3): 329-42.2003

Mourkioti F. and Rosenthal N. IGF-1, inflammation and stem cells: interactions during muscle regeneration. *Trends Immunol.* 26 (10): 535-42.2005

Musaro A., McCullagh K., Paul A., Houghton L., Dobrowolny G., Molinaro M., Barton E.R., Sweeney H.L. and Rosenthal N. Localized IGF-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet.* 27 (2): 195-200.2001

Narula J., Kolodgie F.D. and Virmani R. Apoptosis and cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol.* 15 (3): 183-8.2000

Nelson T.J., Balza R., Jr., Xiao Q. and Misra R.P. SRF-dependent gene expression in isolated cardiomyocytes: regulation of genes involved in cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 39 (3): 479-89.2005

Niu Z., Li A., Zhang S.X. and Schwartz R.J. Serum response factor micromanaging cardiogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 19 (6): 618-27.2007

Niu Z., Yu W., Zhang S.X., Barron M., Belaguli N.S., Schneider M.D., Parmacek M., Nordheim A. and Schwartz R.J. Conditional mutagenesis of the murine serum response factor gene blocks cardiogenesis and the transcription of downstream gene targets. *J Biol Chem.* 280 (37): 32531-8.2005

Ohnishi H., Oka T., Kusachi S., Nakanishi T., Takeda K., Nakahama M., Doi M., Murakami T., Ninomiya Y., Takigawa M. and Tsuji T. Increased expression of connective tissue growth factor in the infarct zone of experimentally induced myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol.* 30 (11): 2411-22.1998

Pandini G., Frasca F., Mineo R., Sciacca L., Vigneri R. and Belfiore A. Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J Biol Chem.* 277 (42): 39684-95.2002

Parlakian A., Charvet C., Escoubet B., Mericskay M., Molkentin J.D., Gary-Bobo G., De Windt L.J., Ludosky M.A., Paulin D., Daegelen D., Tuil D. and Li Z. Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the SRF gene in adult heart. *Circulation.* 112 (19): 2930-9.2005

Parlakian A., Tuil D., Hamard G., Tavernier G., Hentzen D., Concordet J.P., Paulin D., Li Z. and Daegelen D. Targeted inactivation of serum response factor in the developing heart results in myocardial defects and embryonic lethality. *Mol Cell Biol.* 24 (12): 5281-9.2004

Patten L.C., Belaguli N.S., Baek M.J., Fagan S.P., Awad S.S. and Berger D.H. Serum response factor is alternatively spliced in human colon cancer. *J Surg Res.* 121 (1): 92-100.2004

Philippar U., Schrott G., Dieterich C., Muller J.M., Galgoczy P., Engel F.B., Keating M.T., Gertler F., Schule R., Vingron M. and Nordheim A. The SRF target gene Fhl2 antagonizes RhoA/MAL-dependent activation of SRF. *Mol Cell.* 16 (6): 867-80.2004

Prywes R., Dutta A., Cromlish J.A. and Roeder R.G. Phosphorylation of serum response factor, a factor that binds to the serum response element of the c-FOS enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85 (19): 7206-10.1988

Prywes R. and Roeder R.G. Inducible binding of a factor to the c-fos enhancer. *Cell*. 47 (5): 777-84.1986

Prywes R. and Roeder R.G. Purification of the c-fos enhancer-binding protein. *Mol Cell Biol*. 7 (10): 3482-9.1987

Redaelli G., Malhotra A., Li B., Li P., Sonnenblick E.H., Hofmann P.A. and Anversa P. Effects of constitutive overexpression of insulin-like growth factor-1 on the mechanical characteristics and molecular properties of ventricular myocytes. *Circ Res*. 82 (5): 594-603.1998

Reiss K., Cheng W., Ferber A., Kajstura J., Li P., Li B., Olivetti G., Homcy C.J., Baserga R. and Anversa P. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in the heart is coupled with myocyte proliferation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93 (16): 8630-5.1996

Rinderknecht E. and Humbel R.E. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem*. 253 (8): 2769-76.1978

Roberts C.T., Jr., Lasky S.R., Lowe W.L., Jr., Seaman W.T. and LeRoith D. Molecular cloning of rat insulin-like growth factor I complementary deoxyribonucleic acids: differential messenger ribonucleic acid processing and regulation by growth hormone in extrahepatic tissues. *Mol Endocrinol*. 1 (3): 243-8.1987

Rotwein P. Two insulin-like growth factor I messenger RNAs are expressed in human liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83 (1): 77-81.1986

Rotwein P., Pollock K.M., Didier D.K. and Krivi G.G. Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene. Alternative RNA processing produces two insulin-like growth factor I precursor peptides. *J Biol Chem*. 261 (11): 4828-32.1986

Sanchez-Lopez E., Rodrigues Diez R., Rodriguez Vita J., Rayego Mateos S., Rodrigues Diez R.R., Rodriguez Garcia E., Lavoz Barria C., Mezzano S., Egido J., Ortiz A., Ruiz-Ortega M. and Selgas R. [Connective tissue growth factor (CTGF): a key factor in the onset and progression of kidney damage]. *Nefrologia*. 29 (5): 382-91.2009

Santini M.P., Tsao L., Monassier L., Theodoropoulos C., Carter J., Lara-Pezzi E., Slonimsky E., Salimova E., Delafontaine P., Song Y.H., Bergmann M., Freund C., Suzuki K. and Rosenthal N. Enhancing repair of the mammalian heart. *Circ Res*. 100 (12): 1732-40.2007

Schratt G., Philippar U., Hockemeyer D., Schwarz H., Alberti S. and Nordheim A. SRF regulates Bcl-2 expression and promotes cell survival during murine embryonic development. *Embo J*. 23 (8): 1834-44.2004

Sepulveda J.L., Vlahopoulos S., Iyer D., Belaguli N. and Schwartz R.J. Combinatorial expression of GATA4, Nkx2-5, and serum response factor directs early cardiac gene activity. *J Biol Chem.* 277 (28): 25775-82.2002

Serose A., Prudhon B., Salmon A., Doyennette M.A., Fiszman M.Y. and Fromes Y. Administration of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) improves both structure and function of delta-sarcoglycan deficient cardiac muscle in the hamster. *Basic Res Cardiol.* 100 (2): 161-70.2005

Serose A., Salmon A., Fiszman M.Y. and Fromes Y. Short-term treatment using insulin-like growth factor-1 (IGF-1) improves life expectancy of the delta-sarcoglycan deficient hamster. *J Gene Med.* 8 (8): 1048-55.2006

Shavlakadze T., Winn N., Rosenthal N. and Grounds M.D. Reconciling data from transgenic mice that overexpress IGF-I specifically in skeletal muscle. *Growth Horm IGF Res.* 15 (1): 4-18.2005

Shaw P.E., Schroter H. and Nordheim A. The ability of a ternary complex to form over the serum response element correlates with serum inducibility of the human c-fos promoter. *Cell.* 56 (4): 563-72.1989

Shemer J., Adamo M.L., Roberts C.T., Jr. and LeRoith D. Tissue-specific transcription start site usage in the leader exons of the rat insulin-like growth factor-I gene: evidence for differential regulation in the developing kidney. *Endocrinology.* 131 (6): 2793-9.1992

Shimatsu A. and Rotwein P. Mosaic evolution of the insulin-like growth factors. Organization, sequence, and expression of the rat insulin-like growth factor I gene. *J Biol Chem.* 262 (16): 7894-900.1987

Shin C.H., Liu Z.P., Passier R., Zhang C.L., Wang D.Z., Harris T.M., Yamagishi H., Richardson J.A., Childs G. and Olson E.N. Modulation of cardiac growth and development by HOP, an unusual homeodomain protein. *Cell.* 110 (6): 725-35.2002

Simmons J.G., Van Wyk J.J., Hoyt E.C. and Lund P.K. Multiple transcription start sites in the rat insulin-like growth factor-I gene give rise to IGF-I mRNAs that encode different IGF-I precursors and are processed differently in vitro. *Growth Factors.* 9 (3): 205-21.1993

Sotiropoulos A., Gineitis D., Copeland J. and Treisman R. Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell.* 98 (2): 159-69.1999

Souders C.A., Bowers S.L. and Baudino T.A. Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res.* 105 (12): 1164-76.2009

Sun Q., Chen G., Streb J.W., Long X., Yang Y., Stoeckert C.J., Jr. and Miano J.M. Defining the mammalian CARgome. *Genome Res.* 16 (2): 197-207.2006

Treisman R. Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and c-fos 3' sequences. *Cell*. 42 (3): 889-902.1985

Treisman R. Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell*. 46 (4): 567-74.1986

Treisman R. Identification and purification of a polypeptide that binds to the c-fos serum response element. *Embo J*. 6 (9): 2711-7.1987

Tullai J.W., Schaffer M.E., Mullenbrock S., Kasif S. and Cooper G.M. Identification of transcription factor binding sites upstream of human genes regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase and MEK/ERK signaling pathways. *J Biol Chem*. 279 (19): 20167-77.2004

van Rooij E. and Olson E.N. Searching for miR-acles in cardiac fibrosis. *Circ Res*. 104 (2): 138-40.2009

Vinciguerra M., Fulco M., Ladurner A., Sartorelli V. and Rosenthal N. SirT1 in muscle physiology and disease: lessons from mouse models. *Dis Model Mech*. 3 (5-6): 298-303.2010

Wang D., Chang P.S., Wang Z., Sutherland L., Richardson J.A., Small E., Krieg P.A. and Olson E.N. Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell*. 105 (7): 851-62.2001

Wang D.Z., Li S., Hockemeyer D., Sutherland L., Wang Z., Schrott G., Richardson J.A., Nordheim A. and Olson E.N. Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99 (23): 14855-60.2002

Wang X., McLennan S.V., Allen T.J. and Twigg S.M. Regulation of pro-inflammatory and pro-fibrotic factors by CCN2/CTGF in H9c2 cardiomyocytes. *J Cell Commun Signal*. 4 (1): 15-23.2010

Wang Y. Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases. *Circulation*. 116 (12): 1413-23.2007

Wang Z., Wang D.Z., Hockemeyer D., McAnally J., Nordheim A. and Olson E.N. Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. *Nature*. 428 (6979): 185-9.2004

Welch S., Plank D., Witt S., Glascock B., Schaefer E., Chimenti S., Andreoli A.M., Limana F., Leri A., Kajstura J., Anversa P. and Sussman M.A. Cardiac-specific IGF-1 expression attenuates dilated cardiomyopathy in tropomodulin-overexpressing transgenic mice. *Circ Res*. 90 (6): 641-8.2002

Wilson E.M., Hsieh M.M. and Rotwein P. Autocrine growth factor signaling by insulin-like growth factor-II mediates MyoD-stimulated myocyte maturation. *J Biol Chem.* 278 (42): 41109-13.2003

Xu Q., Dewey S., Nguyen S. and Gomes A.V. Malignant and benign mutations in familial cardiomyopathies: insights into mutations linked to complex cardiovascular phenotypes. *J Mol Cell Cardiol.* 48 (5): 899-909.2010

Yang H., Adamo M.L., Koval A.P., McGuinness M.C., Ben-Hur H., Yang Y., LeRoith D. and Roberts C.T., Jr. Alternative leader sequences in insulin-like growth factor I mRNAs modulate translational efficiency and encode multiple signal peptides. *Mol Endocrinol.* 9 (10): 1380-95.1995

Yang S., Alnaqeeb M., Simpson H. and Goldspink G. Cloning and characterization of an IGF-1 isoform expressed in skeletal muscle subjected to stretch. *J Muscle Res Cell Motil.* 17 (4): 487-95.1996

Yang Y., Beqaj S., Kemp P., Ariel I. and Schuger L. Stretch-induced alternative splicing of serum response factor promotes bronchial myogenesis and is defective in lung hypoplasia. *J Clin Invest.* 106 (11): 1321-30.2000

Zhang X., Azhar G., Chai J., Sheridan P., Nagano K., Brown T., Yang J., Khrapko K., Borrás A.M., Lawitts J., Misra R.P. and Wei J.Y. Cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of serum response factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280 (4): H1782-92.2001

Zhang X., Azhar G., Furr M.C., Zhong Y. and Wei J.Y. Model of functional cardiac aging: young adult mice with mild overexpression of serum response factor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 285 (3): R552-60.2003

Zhang X., Chai J., Azhar G., Sheridan P., Borrás A.M., Furr M.C., Khrapko K., Lawitts J., Misra R.P. and Wei J.Y. Early postnatal cardiac changes and premature death in transgenic mice overexpressing a mutant form of serum response factor. *J Biol Chem.* 276 (43): 40033-40.2001

Zhao Y., Samal E. and Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature.* 436 (7048): 214-20.2005

Zhou Y., Capuco A.V. and Jiang H. Involvement of connective tissue growth factor (CTGF) in insulin-like growth factor-I (IGF1) stimulation of proliferation of a bovine mammary epithelial cell line. *Domest Anim Endocrinol.* 35 (2): 180-9.2008

Zou Y., Komuro I., Yamazaki T., Kudoh S., Aikawa R., Zhu W., Shiojima I., Hiroi Y., Tobe K., Kadowaki T. and Yazaki Y. Cell type-specific angiotensin II-evoked signal transduction pathways: critical roles of Gbetagamma subunit, Src family, and Ras in cardiac fibroblasts. *Circ Res.* 82 (3): 337-45.1998