



Rôle de la voie de signalisation du récepteur -1 des prokinéticines dans la fonction cardiaque et rénale : implication des cellules progénitrices

Mounia Boulberdaa

► To cite this version:

Mounia Boulberdaa. Rôle de la voie de signalisation du récepteur -1 des prokinéticines dans la fonction cardiaque et rénale : implication des cellules progénitrices. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ077 . tel-01070645

HAL Id: tel-01070645

<https://theses.hal.science/tel-01070645>

Submitted on 2 Oct 2014

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

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

Thèse présentée par

Mounia BOULBERDAA

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Rôle de la voie de signalisation du récepteur-1 des
prokinétines dans la fonction cardiaque et rénale :
implication des cellules progénitrices**

Laboratoire de biotechnologie et signalisation cellulaire

Equipe RCPG et cardiologie, UMR 7242

Soutenue publiquement le 13 septembre 2012 devant les membres du jury :

Directeur de thèse : **Dr. Canan NEBIGIL-DESAUBRY**, DR2, CNRS, Illkirch

Examineur interne : **Pr. Valérie SCHINI-KERTH**, PR1, Université de Strasbourg

Rapporteur externe : **Pr. Thierry PEDRAZZINI**, Université de Lausanne

Rapporteur externe : **Dr. Stéphane ZAFFRAN**, DR2, INSERM, Marseille

Examineur externe : **Pr. Uwe STRAEHLE**, Institut de technologie de Karlsruhe

A Mes Très Chers Parents

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous avez consenti pour moi durant mes longues années d'études.

C'est à travers vos encouragements et vos critiques que je me suis réalisée.

Chaque ligne de cette thèse, chaque mot et chaque lettre vous exprime ma reconnaissance et mon infini amour.

A mes frères et sœurs, Nadia, Schérazade, Jessica et Abda-As-Salam

A qui je témoigne mon affection la plus sincère et mon attachement le plus profond

*Merci pour les bons moments passés ensemble, pour vos précieux conseils, votre soutien
dans les moments les plus difficiles et votre aide à la réalisation de ce travail*

A la mémoire de ma très chère Sabrina

Remerciements

Alors que la rédaction de ce manuscrit s'achève, j'adresse ma profonde reconnaissance à tous ceux ou celles qui ont permis de concrétiser ce travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude et mes remerciements à l'inspiratrice de ce travail Madame Canan Nebigil-Desaubry, Directrice de Recherche au sein du laboratoire de Biotechnologie et Signalisation Cellulaire. Elle a accepté de m'accueillir pour mon projet de Master et m'a donnée la chance de continuer mes travaux de recherche passionnants pour la préparation de cette thèse. Je tiens à la remercier pour son soutien financier durant mes premières années de thèse et pour son aide précieuse qui m'a permise d'obtenir une bourse de l'Association Française contre les Myopathies. Mais aussi pour la confiance qu'elle m'a accordée, pour ses conseils et sa disponibilité.

Je suis très reconnaissante à Madame Valérie Schini-Kerth, Professeur à l'Université de Strasbourg du laboratoire de pharmacologie, à Monsieur Thierry Pedrazzini Professeur à l'Université de Lausanne, à Monsieur Uwe Straehle de l'Institut Technologique de Karlsruhe, et à Monsieur Stéphane Zaffran du laboratoire de Génétique Médicale et Génomique Fonctionnelle de Marseille qui ont accepté de juger ce travail.

J'ai le plaisir de remercier chaleureusement les membres de mon équipe et des autres équipes du laboratoire de Biotechnologie et Signalisation Cellulaire pour l'aide, la gentillesse et les moments agréables que nous avons partagés. Je remercie particulièrement le Dr Kyoji Urayama pour avoir contribué à l'initiation des mes travaux de recherches et pour ses conseils scientifiques. Merci à Valérie Utard pour la relecture de ce manuscrit et pour ses précieux conseils. Merci au Dr. Valérie Toschi qui m'a très fortement aidée pour la finalisation de cette thèse. Merci au Dr. Jean-Philippe Wilmet pour ses critiques constructives.

Je remercie les équipes de l'IGBMC du service de microscopie, de culture cellulaire et de production d'anticorps pour leurs conseils. J'adresse ma reconnaissance particulière à Nadia Messaddeq, à Marcel Boeglin et à Mustapha Oulad-Abdelghani.

A vous mes parents je dis un immense merci. Je vous suis infiniment reconnaissante pour votre soutien et vos encouragements.

Je remercie mes sœurs, mon frère, mes amis, ceux et celles que je porte dans mon cœur qui m'ont toujours encouragée et supportée. J'adresse ma reconnaissance particulière à Nadia pour ses conseils de syntaxe pour la rédaction de cette thèse et à Jessica pour son avis en tant que futur médecin.

Enfin je remercie l'Association Française contre les Myopathies de m'avoir financé durant mes dernières années de Doctorat.

Sommaire

LISTE DES ABBREVIATIONS	14
LISTE DES FIGURES.....	18
LISTE DES TABLEAUX.....	21
PARTIE 1 : INTRODUCTION.....	22
I. Maladies cardiovasculaires et rénales	23
A. Les maladies cardiovasculaires	23
1. Epidémiologie	23
2. Mécanismes physiopathologiques.....	24
3. Les thérapies des maladies cardiovasculaires	28
B. Insuffisance rénale néonatale	29
II. Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG)	31
A. Structure et activation des voies de signalisation des RCPG	32
B. Les RCPG dans le système cardiovasculaire	34
C. Rôle des RCPG dans la contractilité cardiaque.....	34
a. Voies de signalisation associées aux protéines G régulant l'AMPc	34
b. Voies de signalisation associées aux protéines $G_{\alpha q/11}$	36
c. Les voies de signalisation indépendantes des protéines G dans la contractilité cardiaque : rôle de la β -arrestine	37
D. Rôle des RCPG en pathologie cardiaque	39
1. Les voies de signalisation associées aux protéines G régulant l'AMPc.....	39
2. Voies de signalisation associées aux protéines $G_{\alpha q/11}$	40
3. Voies de signalisation associées aux protéines $G_{\alpha 12/13}$	42
4. Voies de signalisation indépendantes des protéines G et associées à la β -arrestine	43
E. Les RCPG dans le rein	45

1.	Arginine-vasopressine	45
2.	L'angiotensine II (AngII)	46
3.	L'hormone parathyroïdienne (PTH).....	46
4.	La dopamine	47
5.	Les prostaglandines	48
III.	La voie de signalisation des Prokinétines.....	51
A.	Structures des Prokinétines et de leurs récepteurs.....	51
B.	Activités biologiques des prokinétines.....	53
1.	Rôle dans l'angiogenèse.....	53
2.	Rôle dans l'activité des cellules progénitrices	56
3.	Rôle dans le système nerveux central et périphérique	57
4.	Rôle dans le système cardiovasculaire : cardiopathie et AVC.....	59
5.	Rôle des prokinétines dans la pathogenèse de certaines maladies chez l'homme	60
IV.	Les cellules progénitrices de l'épicarde : Origine, organisation et fonction	63
A.	Origine de l'épicarde : du proépicarde vers l'épicarde	63
1.	Les premiers stades de l'embryogenèse cardiaque.....	63
2.	Des ébauches pro-épicaudiques à la formation de l'épicarde	64
a.	Formation du proépicarde	64
b.	Marqueurs génétiques du proépicarde.....	65
c.	Développement de l'épicarde.....	67
i.	Adhérence et expansion des cellules du proépicarde à la surface du cœur.....	67
ii.	Transformation épithéliale-mésenchymateuse des cellules de l'épicarde.....	68
iii.	Migration des EPDC au sein du myocarde.....	72
B.	Rôle des EPDC dans l'embryogenèse cardiaque	74
1.	Formation des vaisseaux coronaires.....	74
a.	Contrôle de la vasculogenèse et de l'artériogenèse cardiaque par l'épicarde	74
b.	Contrôle de la vasculogenèse et de l'artériogenèse cardiaque par le myocarde	78

2. Rôle de l'épicarde dans l'expansion et l'architecture du myocarde durant l'embryogenèse	80
3. EPDC : une lignée dérivant des précurseurs cardiaques	84
V. Epicardin: un marqueur commun de développement entre le cœur et le rein.....	85
A. Lien évolutionnaire entre le développement de l'épicarde et des glomérules rénaux..	85
B. Facteurs communs entre le développement de l'épicarde et du rein.....	86
1. Premier facteur : WT1	86
2. Deuxième facteur : TBX18	87
3. Troisième facteur : epicardin.....	88
VI. Cellules souches et régénération cardiaque et rénale	89
A. Les cellules souches	89
B. La régénération cardiaque et la thérapie cellulaire.....	91
1. Médecine régénérative cardiaque : fondements et intérêts thérapeutiques	91
2. Les cellules candidates	94
a. Les cellules souches exogènes au cœur.....	94
b. Les cellules progénitrices cardiaques endogènes	96
c. L'épicarde : source idéale de cellules souches pour la thérapie cellulaire ?	97
C. Régénération rénale et insuffisance rénale	98
D. Les freins à la thérapie cellulaire.....	99
PARTIE 2 : OBJECTIFS	101
PARTIE 3 : MATERIEL ET METHODE	104
I. Culture cellulaire	105
A. Culture d'une population hétérogène de cellules rénales cultivées à partir d'explants de reins néonataux.....	105
1. Isolation des cellules et induction de la prolifération.....	105
2. Co-immunofluorescence indirecte	105
B. Culture d'une population homogène de cellules epicardin ⁺ isolées à partir de tissus rénal et cardiaque	106

1.	Isolation des cellules epicardin ⁺	106
a.	Biotynylation de l'anticorps	106
b.	Isolation des cellules	107
2.	Caractérisation de l'expression du facteur epicardin sur une population de cellules progénitrices rénales.....	108
a.	Analyse par western blot	108
b.	Analyse par immunofluorescence	109
c.	Analyse par FACS de la pureté de la population de cellules epicardin ⁺ isolées des cœurs et reins de souris néonatales	110
d.	Analyse de l'expression génique par PCR semi-quantitative	113
3.	Protocol de différenciation	115
a.	Vasculogenèse	115
b.	Adipogenèse	116
c.	Cardiomyogenèse	117
II.	Travail in vivo	118
A.	Génération des souris PKR1 ^{-/-}	118
B.	Génération des souris epi-PKR1 ^{-/-}	121
C.	Coloration des tissus.....	122
1.	Coupes des tissus avant coloration.....	122
a.	Coupes paraffines	122
b.	Cryocoupes.....	122
2.	Coloration au trichrome de Mallory	123
3.	Coloration à l'oil red	123
4.	Coloration au « Succinate Déshydrogénase » (SDH)	123
5.	Analyse en coupe par microscopie électronique	124
D.	Analyses fonctionnelles.....	124
1.	Electrocardiogramme (ECG).....	124
2.	Echocardiographie.....	124

3.	Cage métabolique	125
4.	Analyse urinaire et sanguine	125
5.	Ligature de l'artère coronaire gauche descendante	125
E.	Extraction des lipides par la méthode Folch	126
F.	Isolation des cardiomyocytes	126
1.	Extraction des cardiomyocytes.....	126
2.	Mesure de la contractilité	127
3.	Mesure de la taille	127
4.	Milieu conditionné	127
G.	Milieu conditionné/H5V	128
H.	Extraction des glomérules	128
1.	Taille des glomérules à 24 semaines	128
2.	Isolation des cellules endothéliales glomérulaires	129
I.	Traitement au BrdU et immunofluorescence	130
J.	Analyse de l'apoptose par la méthode dite TUNNEL.....	130
K.	Extraction de protéines.....	131
L.	Immunofluorescence	132
M.	Analyse de l'expression des gènes par PCR semi quantitative et PCR quantitative 132	
	PARTIE 4 : RESULTAT	136
I.	Rôle de la voie de signalisation PKR1 dans la fonction cardiaque et rénale	137
A.	Confirmation de l'absence du gène codant pour <i>Pkr1</i> dans les souris PKR1 ^{-/-}	138
B.	Analyse du phénotype cardiaque des souris PKR1 ^{-/-}	139
1.	Analyses morphologique, histologique et fonctionnelle des cœurs	139
a.	Défauts de la morphologie et de l'histologie du coeur.....	139
b.	Développement de dysfonctions cardiaques	141
2.	Etude des anomalies cellulaires associées aux dysfonctions cardiaques	145

a.	Développement d'anomalies structurales lors de la délétion du récepteur PKR1	145
b.	Anomalies morphologique et fonctionnelle des mitochondries	145
C.	Etude du phénotype du rein lors de la délétion du gène codant <i>Pkr1</i>	147
1.	Profil d'expression de PKR1 dans le rein	147
2.	Analyses macroscopiques, histologiques et morphologie du glomérule.....	149
a.	Anomalies morphologique et histologique	149
b.	Altération de la vascularisation glomérulaire.....	149
3.	Analyses structurales du rein.....	151
a.	Anomalies structurales du glomérule	151
b.	Anomalies morphologiques des composants de l'espace interstitiel rénal et de la fonction des mitochondries	151
4.	Analyse de la fonction rénale	152
D.	Mécanismes cellulaire et moléculaire à l'origine des dysfonctions cardio-rénales observées chez la souris PKR1 ^{-/-}	155
1.	Angiogenèse et survie	155
a.	Altération de l'angiogenèse cardiaque et rénale à la naissance qui est compensée à l'âge adulte	155
b.	Développement d'un environnement hypoxique	155
c.	Altération des voies de survie contrôlées par la voie de signalisation Akt	156
2.	Implication des cellules progénitrices dans les dysfonctions cardiaques et rénales	158
a.	Réduction de la population des cellules epicardin ⁺	158
i.	Population cellulaire epicardin ⁺ dans les cœurs	158
ii.	Population cellulaire epicardin ⁺ dans les reins	159
b.	Rôle de la voie de signalisation PKR1 dans l'activité des cellules epicardin ⁺ .	160
E.	Conclusion de partie	162

II. Rôle de la voie de signalisation PKR1 provenant de l'épicaarde dans la fonction cardiaque et rénale	164
A. Confirmation de l'absence du gène codant pour PKR1 dans l'épicaarde des souris epi-PKR1 ^{-/-}	165
B. Les souris epi-PKR1 ^{-/-} développent des anomalies cardiaques au jour postnatal 1 ...	167
1. Anomalies de la structure et de la fonction cardiaque au jour postnatal 1	167
2. Altération de la prolifération des cellules cardiaques au jour postnatal 1	169
3. Régression de l'angiogenèse et de l'artériogenèse au jour postnatal 1	171
4. Altération des communications cellulaires cardiaques autocrines et paracrines provenant des cellules epicardin ⁺ chez les souris epi-PKR1 ^{-/-}	172
C. Les souris epi-PKR1 ^{-/-} développent une cardiomyopathie hypertrophique à l'âge adulte	178
1. Dymorphie et dysfonction cardiaques à l'âge adulte.....	178
2. Hypertrophie des cardiomyocytes à l'âge adulte	180
3. Anomalies de la structure cardiaque	182
4. Altération de la fonction mitochondriale.....	184
5. Apoptose abondante à l'origine de la réduction de la masse du ventricule gauche	186
6. Dysfonction cardiaque à l'âge adulte	188
D. Les souris epi-PKR1 ^{-/-} développent des anomalies rénales au stade néonatal	191
1. Anomalies de la morphologie rénale, de la structure des glomérules et des tubules rénaux	191
2. Altération de la prolifération cellulaire	193
3. Altération de l'angiogenèse et de l'artériogenèse	195
4. Altération des communications cellulaires rénales autocrine et paracrine provenant des cellules epicardin ⁺ chez les souris epi-PKR1 ^{-/-}	196
E. Les souris epi-PKR1 ^{-/-} développent une altération de la fonction rénale à l'âge adulte	200
1. Altération de l'histologie rénale et atteinte glomérulaire à l'âge adulte	200
2. Altération de la structure rénale et dysfonction mitochondriale	202

3. Amplification de l'apoptose des cellules rénales	204
4. Altération de la fonction rénale	205
F. Conclusion de partie.....	207
PARTIE 5 : DISCUSSION	209
I. Phénotype cardiaque : PKR1 ^{-/-} versus epi-PKR1 ^{-/-}	211
A. PKR1 est essentiel pour le contrôle autocrine et paracrine de la survie des cardiomyocytes.....	212
B. Rôle de PKR1 dans la prolifération et la rythmicité cardiaque.....	213
C. Les mécanismes moléculaires responsables de la survie des cardiomyocytes dépendants de la voie de signalisation PKR1.....	216
D. PKR1 est essentiel à la vascularisation cardiaque.....	218
II. Phénotype rénal : PKR1 ^{-/-} versus epi-PKR1 ^{-/-}	221
A. Les maladies cardiaques et rénales chez les souris PKR1 ^{-/-} et epi-PKR1 ^{-/-} sont indépendantes	222
B. PKR1 est essentiel au développement de l'angiogenèse glomérulaire	222
1. Contrôles autocrine et paracrine des mécanismes d'angiogenèse et d'artériogenèse du rein dépendants des cellules epicardin ⁺ par la voie de signalisation PKR1	222
C. Rôle de PKR1 dans la survie des cellules rénales	227
D. PKR1 est essentiel à la fonction rénale	228
PARTIE 6 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES	231
REFERENCE	235
ANNEXE	280
1. Boulberdaa M <i>et al.</i> Genetic inactivation of prokinetidin receptor-1 leads to heart and kidney disorders. <i>Artheroscler Thromb Vasc Bio</i> , 2011 Apr, 31 (4): 842-850;	280
2. Boulberdaa M <i>et al.</i> Genetic inactivation of prokineticin receptor-1 signaling in cardiovascular and kidney function. <i>Cardiovasc Res</i> . 2011 Sept 29.	280

LISTE DES ABBREVIATIONS

α AR: Récepteur α -Adrénérquiques	CCNE: Cellules de la Crête Neurale Entérique
α -MHC: α -Myosin Heavy Chain	c/EBP α : CCAT/Enhancer Binding Protein α
α -SMA: Smooth Muscle α -Actin	CEC: Cellules Endothéliales Coronariennes
β AR: Récepteur β -Adrénérquiques	CEG: Cellules Endothéliales Glomérulaires
β -MHC: β -Myosin Heavy Chain	C-GSF: Granulocyte Colony-Stimulating Factor
A1: Récepteur 1 de l'Adénosine	CML: Cellules Musculaires Lisses
A3: Récepteur 3 de l'Adénosine	Ct: threshold Cycle
AC: Adénylate Cyclase	cMyBP: cardiac Myosi-Binding Protein
AND: Acide Desoxyribonucléique	CMV: CytoMegaloVirus
AKAP-lbc: A-Kinase Anchoring Protein	CPC: Cellules Progénitrices Cardiaques Endogènes
AMPc : Adénosine 3',5' Monophosphate Cyclique	CSA: Cellules souches adultes
Ang II: Angiotensine II	CSE: Cellules Souches Embryonnaires
ANP: Atrial Natriuretic Peptide	CSF: Cellules souches Fœtales
APEMP: Adult Parietal Epithelial Multipotent Progenitors	CSH: Cellules Souches Hématopoïétiques
APS: Sodium Persulfate	CSM: Cellules Souches Mésenchymateuses
AQ: Aquaporines	cTnI: Troponine Cardiaque I
ARHGAP: Rho GTPase Activating Protein	CTP: Cancers de la Thyroïde Papillaire
ARN: Acide RiboNucléique	D2 et D4: Récepteur 2 et 4 central de la Dopamine
ATP: Adénosine TriPhosphate	DA1 et DA2: Récepteur périphérique 1 et 2 de la Dopamine
AT1R: Récepteur 1 de l'Ang II	DAG: DiAcyGlycerol
AVC: Accident Vasculaire Cérébral	DAPI: 4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole
BMP: Bone MorPhogenetic Protein	DEPC: DiEthylPyroCarbonate
BNP: Brain Natriuretic Peptide	DIVGd: Diamètre Interne Diastolique du ventricule gauche
BrdU: BromodeoxyUridine	DIVGs: Diamètre Interne Systolique du ventricule gauche
BSA: Bovine Serum Albumin	DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
Bv8: <i>Bambina variegata</i> 8	
CaMKII: Protéine kinase calcium/Calmoduline dépendante	

DMX: Dexamethasone	HEPES: Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine ethane sulfonique
dNTP: désoxyNucléotide TriPhosphate	HIF-1 α : Hypoxia Inducible Factor 1 α
DTT: DieThioThreitol	IBMX: Isobuthylxanthine
EcaC: Canal Calcique Epithélial	IGF: Insulin Growth Factor
ECG: ElectroCardioGramme	IGFR1: Récepteur 1 de l'IGF
EDTA: Ethylène Diamine Tetra Acétique	IP3: Inositol-3-Phosphate
EGF: Epithelium Growth Factor	iPS: Cellules souches pluripotentes induites
EGFR: Récepteur de l'EGF	ISL1 : Insulin Gene Enhancer Protein
eIF4E: Eukaryotic Translation Initiation Factor-4E	Jpc: Jour post-coïtum
EP1 et EP3: Récepteur 1 et 3 aux Eicosanoïdes	KAch: canaux potassiques sensibles à l'acétylcholine
EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition	KCl: chlorure de potassium
EPAC: Exchange Protein Activated by AMPC	LAS AF: Leica Application Software Advanced Fluorescence
EPC: Endothelial Progenitor Cells	LDCC: Canaux Calciques voltage Dépendant de type L
EPDC: Epicardial Progenitor Derived Cells	M2: Récepteur 2 Muscarinique
ERK: Extracellular signal-Regulated protein Kinase	MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
ET1: Récepteur-1 de l'Endothéline	MEC: Matrice ExtraCellulaire
FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting	MEF2: Myocyte-specific Enhancer Factor-2
FCS: Fetal Calf Serum	MgCl2: Chlorure de Magnésium
FGF: Fibroblast Growth Factor	MgSO4: Sulfate de magnésium
FGFR: Récepteur du FGF	miRNA: microRNA
FOXD1: Forkhead D1	MIT1: Mamba Intestinal Toxin 1
GADPH: Glycéraldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase	MNK-1: MAP-Kinase-Interacting-Kinase 1
GATA4: Globin transcription Factor 4	MSK-1: Mitogen-Activated-Kinase 1
GATA-5: Globin transcription Factor 5	Na2HPO4: Sodium hydrogénophosphate
GDNF/Ret: Facteur Neurotrophique Dérivé de la lignée des cellules Gliales	Na3VO4: Sodium orthovanadate
GDP: Guanosine Diphosphite	NaCl: Chlorure de sodium
GFP: Green Fluorescent Protein	NaH2PO4: Sodium Dihydrogénophosphate
GRK: GPCR Kinase	NaN3: Azide de sodium
GTP: Guanosine Triphosphat	NaPi : Co-transporteur sodium/phosphate

NBC : Co-transporteur sodium/hydrogène	PPVG : Paroi Postérieur du Ventricule Gauche
NCC: Co-transporteur sodium/chlorure	PTH: Hormone ParaThyroidienne
NCX: Co-transporteur sodium/calcium	PVDF: Polyvinylidène fluoride
NHE: Echangeur sodium/hydrogène	RALDH2: RétinALdéhyde DeHydrogenase-2
NF1: NeuroFibromine-1	RCPG: Récepteur Couplé aux Protéines G
NFAT: Nuclear Factor Activated T Cells	Rho Gef: Rho guanine-nucleotide exchange factors
NFATC1: Nuclear Factor of Activated T-cells, Cytoplasmic 1	RPM: Rotation Par Minute
NFκB: Nuclear Factor-κ B	RT: Reverse Transcriptase
NKX2.5: NK-2 Protein 5	RXRα: Retinoid X Receptor-α
PBS: Phosphate Buffered-Saline	RyR: Récepteur Ryanodine
PBS-T: PBS-tween	S1P: Sphingosine-1-Phosphate
PCR: Polymerase Chain Reaction	SCX : SCLeraXis
PCRq: PCR quantitative	SDS : Sodium Dodécyle Sulfate
PDGF: Platelet Derived Growth Factor	SEMA3D: SEMAphorine 3D
PDGFRα: Récepteur α du PDGF	SERCA: Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases
PDGFRβ: Récepteur β du PDGF	SDH: Succinate DesHydrogénase
PECAM-1: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1	SFD-1: Stromal Derived Factor-1
PIP2: Phosphoinositol 4,5bis Phosphate	SIV: Septum Inter-Ventriculaire
PIPES: Acide pipérazine-N,N bis (2-éthane-sulfonique)	SMAD: Mothers Against Decapentalgic Homologue 1
PKA: Protéine Kinase A	STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3
PKC: Protéine Kinase C	TAE: Tris Acétate EDTA
PKD1: Protéine Kinase D1	TBX5: T-BoX 5
PKR1: Récepteur 1 des Prokinéticines	Tbx-18 : T-BoX 18
PKR2: Récepteur 2 des Prokinéticines	TGFβ: Transforming Growth Factorβ
PLB: PhosphoLamBane	TGFβR: Récepteur du TGFβ
PLC: PhosphoLipase C	THX: Récepteur du THromboXane
PPAR-α: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-α	TNF: Tumor Necrosis Factor
PPAR-γ: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ	TRCV: Temps de Contraction iso-Volumétrique.

TRIV : Temps de Relaxation Iso-Volumétrique

TUNNEL: Terminal Deoxynucleotidyl
Transferase-Mediated In Situ End Labeling

V1 et V2 : Récepteur 1 et 2 de l'Argénine-
Vasopressine

VCAM-1: Vascular Cells Adhesion Molecule-
1

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VR : Récepteur de l'Argénine-Vasopressine

WT1: Wilm's Tumor-1

ZMR: Zone Migratoire Rostrale

ZO-1: Zona Occludens-1

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Principales causes de mortalité en 2008 dans le monde (%). Source : OMS	23
Figure 2. Représentation schématisée du phénomène de remodelage cardiaque post-infarctus. (Konstam et al., 2011)	25
Figure 3. Remodelage cardiaque : niveau cellulaire, tissulaire et signes cliniques associés. ..	28
Figure 4. Insuffisance rénale, lésions glomérulaires et tubulaires.	31
Figure 5 Activation des RCPG et voies de signalisation associées.....	33
Figure 6. Rôle de la voie de signalisation dépendante et indépendante aux protéines G dans la contractilité cardiaque.	38
Figure 7. Rôle des voies de signalisation dépendantes et indépendantes des protéines G en pathologie cardiaque.	44
Figure 8. Rôle des RCPG dans la fonction rénale	50
Figure 9. Séquence d'acides aminés des protéines de la famille AVITGA de différentes espèces.....	52
Figure 10. Alignement des séquences protéiques des récepteurs PKR1 et PKR2. (Soga et al., 2002).....	53
Figure 11. Formation et plicature du tube cardiaque (Fishman and Chien, 1997).....	64
Figure 12. Proépicaide : localisation et migration au niveau de la surface cardiaque (Mercader, 2009).....	65
Figure 13. Développement de l'épicaide : implication dans la vascularisation cardiaque et l'architecture du myocarde.....	82
Figure 14. Hiérarchie cellulaire des cellules progénitrices cardiaques et leur plasticité (Sturzu and Wu, 2011)	85
Figure 15. Comparaison de la disposition anatomique des glomérules externes du pronephros des agnathes et du proépicaide des gnathostomes (Pombal et al., 2008).	86
Figure 16. Hiérarchie et plasticité des cellules souches	91
Figure 17. Mécanismes d'action des cellules souches lors de la régénération cardiaque.....	94
Figure 18. Protocole d'isolation des cellules epicardin ⁺ et caractérisation.....	112
Figure 19 Analyse de l'expression génique des gènes Gapdh, Ssmad, Epicardin, Gata5, c-myc, Foxd1, Tbx5, Pkr1 sur des échantillons de cellules epicardin ⁺ cardiaques (cEpi ⁺) et rénales (rEpi ⁺).....	115

Figure 20. Génération des souris PKR1 ^{-/-}	120
Figure 21. Génotypage des souris WT et epi-PKR1 ^{-/-}	122
Figure 22. Analyse de l'expression de PKR1 et PKR2 chez les souris PKR1 ^{-/-}	138
Figure 23. Analyse morphologique et histologique des cœurs WT et PKR1 ^{-/-}	140
Figure 24. Analyses morphométrique des cardiomyocytes, de la fonction cardiaque et de l'expression des gènes spécifiques au cycle du calcium chez les souris WT et PKR1 ^{-/-}	142
Figure 25. Analyse structurale, de l'homéostasie mitochondriale et de l'apoptose dans les cœurs WT et PKR1 ^{-/-}	146
Figure 26. Expression rénale de PKR1	148
Figure 27. Analyses morphologique et histologique des reins WT et PKR1 ^{-/-}	150
Figure 28. Analyse histologique et microscopique des tubules et glomérules issus des reins WT et PKR1 ^{-/-}	152
Figure 29. Paramètres mesurés, par 24 heures, lors du placement des souris en cage à métabolisme : prise de nourriture (g), prise d'eau (ml), diurèse en ml.	153
Figure 30. Mécanismes cellulaire et moléculaire impliqués dans les dysfonctions cardio-rénales des souris PKR1 ^{-/-}	157
Figure 31. Niche des cellules epicardin ⁺ dans les cœurs et reins WT et PKR1 ^{-/-}	159
Figure 32. Prolifération des cellules progénitrices issues d'explants de reins néonataux WT et PKR1 ^{-/-}	160
Figure 33. Différenciation des cellules progénitrices issues d'explants de reins néonataux WT et PKR1 ^{-/-}	162
Figure 34. Schématisation des conséquences pathologiques de la délétion de Pkr1 chez la souris.	163
Figure 35. Expression de PKR1 dans les cœurs et reins des souris epi-PKR1 ^{-/-}	166
Figure 36. Analyses histologique, microscopique, contractilité des cardiomyocytes et accumulation de lipides des cœurs WT et epi-PKR1 ^{-/-} au stade néonatal.....	168
Figure 37. Apoptose et prolifération des cœurs WT et epi-PKR1 ^{-/-} au stade néonatal	170
Figure 38. Angiogenèse et artériogenèse des cœurs WT et epi-PKR1 ^{-/-} au stade néonatal ...	171
Figure 39. Précurseurs des cellules matures dans les cœurs WT et epi-PKR1 ^{-/-} au stade néonatal	173
Figure 40. Différenciation des cellules epicardin ⁺ cardiaques en cellules vasculaires et cardiomyocytes.....	175
Figure 41. Contrôle paracrine de l'activité des cellules endothéliales et cardiomyocytes par la voie de signalisation PKR1 dépendante des cellules epicardin ⁺ cardiaques	177

Figure 42. Analyse histologique des cœurs de souris WT et epi-PKR1 ^{-/-} à 24 semaines	179
Figure 43. Analyse morphométrique des cardiomyocytes et de l'expression des gènes hypertrophiques des cœurs WT et epi-PKR1 ^{-/-} à l'âge adulte.....	181
Figure 44. Vue en coupe par microscopie électronique de cœurs de souris à 24 semaines ...	183
Figure 45. Analyse de la fonction mitochondriale des cœurs WT et epi-PKR1 ^{-/-} à 24 semaines	185
Figure 46. Apoptose et vascularisation de cœurs WT et epi-PKR1 ^{-/-} à 24 semaines.....	187
Figure 47. ECG et analyse de la fonction cardiaque des souris WT et epi-PKR1 ^{-/-}	189
Figure 48. Analyse histologique et microscopique et accumulation de lipides des reins WT et epi-PKR1 ^{-/-} au stade néonatal.....	192
Figure 49. Prolifération et apoptose des reins WT et epi-PKR1 ^{-/-} au stade néonatal.....	194
Figure 50. Angiogenèse et artériogenèse des reins WT et epi-PKR1 ^{-/-} au stade néonatal	195
Figure 51. Niche de cellules epicardin ⁺ dans les reins WT et epi-PKR1 ^{-/-} au stade néonatal.....	197
Figure 52. Contrôle paracrine de l'activité des cellules endothéliales glomérulaires par la voie de signalisation PKR1 dépendante des cellules epicardin ⁺ rénales.....	199
Figure 53. Histologie rénale, fibrose interstitielle et morphologie glomérulaire des reins WT et epi-PKR1 ^{-/-} à 24 semaines	201
Figure 54. Fonction des tubules rénaux et lipogenèse des reins WT et epi-PKR1 ^{-/-} à 24 semaines	203
Figure 55. Apoptose, niche de progéniteurs epicardin ⁺ et angiogenèse des reins WT et epi-PKR1 ^{-/-} à 24 semaines	204
Figure 56. Paramètres mesurés lors de la mise en cage à métabolisme des souris WT et epi-PKR1 ^{-/-} incluant la prise de nourriture en g, la prise d'eau en ml et la diurèse des 24 heures en ml (n=7).....	206
Figure 57. Schématisation de l'effet délétère de l'inactivation de Pkr1 spécifique au niveau de l'épicarde sur la fonction cardiaque et rénale.....	208
Figure 58. Rôle de PKR1 et de la voie de signalisation épicarde-PKR1 dans la fonction cardiaque	211
Figure 59. Rôle de la voie de signalisation dans la communication cellulaire entre : l'épicarde et le myocarde ; l'épicarde et l'endothélium vasculaire.....	220
Figure 60. Effet de la délétion de Pkr1 sur la fonction rénale.....	221
Figure 61. Contrôle du devenir des cellules progénitrices de l'épicarde en adipocytes et cellules vasculaires.....	233

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Voie de signalisation des prokinétines : fonctions biologiques et pathologies associées	62
Tableau 2. Voie de signalisation du myocarde ayant un rôle dans la vasculogenèse et l'artériogenèse induite par les EPDC	79
Tableau 3. Facteurs impliqués dans les différents stades de développement cardiaque	82
Tableau 4. Séquences des oligonucléotides utilisés pour l'analyse de l'expression des gènes des cellules epicardin ⁺	114
Tableau 5. Séquences des oligonucléotides utilisés pour le génotypage des souris PKR1 ^{-/-} .	119
Tableau 6. Séquences d'oligonucléotides utilisés pour le génotypage des souris epi-PKR1 ^{-/-}	121
Tableau 7. Séquences d'oligonucléotide utilisé pour l'analyse de l'expression génique par RT-PCR	133
Tableau 8. Séquences d'oligonucléotides utilisées pour la PCRq	135
Tableau 9. Echocardiographie à 24 semaines avant traitement à la dobutamine (n=6).	143
Tableau 10. Echocardiographie à 24 semaines après traitement à la dobutamine (n=6).	144
Tableau 11. Analyses urinaire et sanguine à 24 semaines (n=6).	154
Tableau 12 : Echocardiographie à 24 semaines (n=5).	190
Tableau 13. Analyse urinaire (n=7).....	206

PARTIE 1 : INTRODUCTION

I. Maladies cardiovasculaires et rénales

A. Les maladies cardiovasculaires

1. Épidémiologie

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Ainsi en 2008, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a estimé que 7.3 millions de décès étaient dus à une pathologie cardiovasculaire ischémique, soit 12.8 % de la mortalité mondiale totale (Cf. figure 1). D'ici 2030, l'OMS évalue à 23.6 millions le nombre de décès imputable à une atteinte cardiovasculaire ischémique.

En France, le CépiDC (Centre d'épidémiologie des causes médicales de décès), via son interrogation relative aux causes de décès survenus entre 1979 et 2009, a déclaré que les affections cardiovasculaires représentaient l'une des principales causes de mortalité. Le taux de mortalité des cardiopathies ischémiques s'élève respectivement à 7.9% et à 6.3% chez les hommes et chez les femmes. Malgré leur constante réduction depuis une trentaine d'année, elles restent encore un facteur important entraînant irrémédiablement des décès.

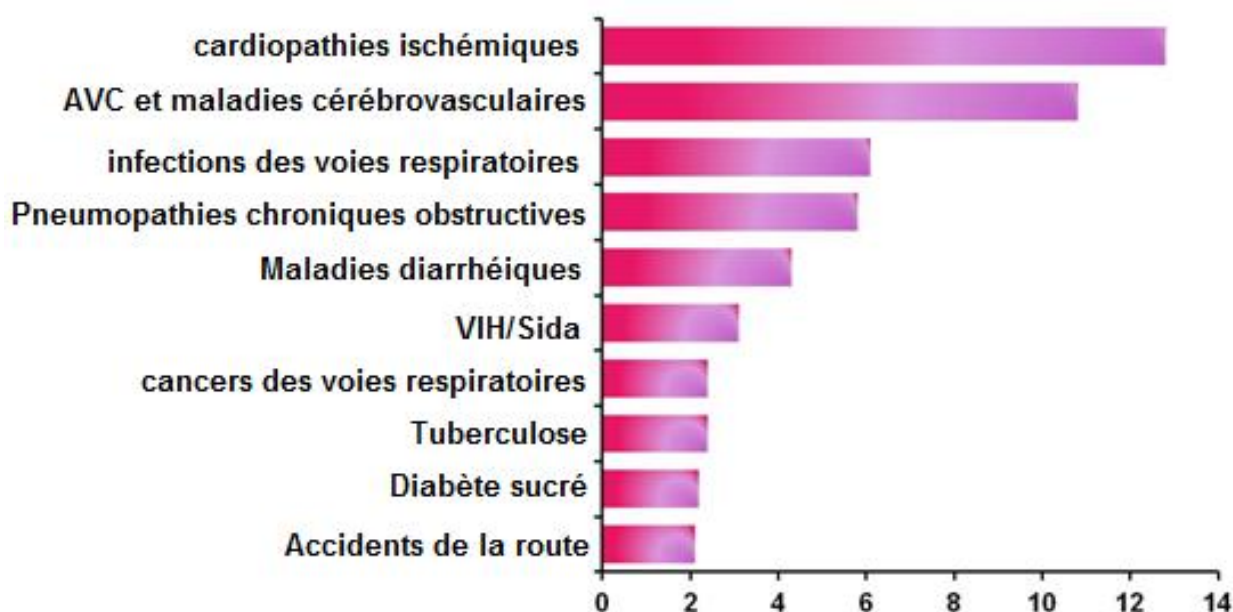


Figure 1. Principales causes de mortalité en 2008 dans le monde (%). Source : OMS

2. Mécanismes physiopathologiques

Les principaux facteurs de risque de maladies cardiovasculaires regroupent l'hypertension artérielle, les dyslipidémies, le diabète, le tabagisme et l'âge. Ils favorisent, le plus généralement, la formation d'une plaque d'athérosclérose qui provoque une réduction du flux sanguin coronarien. La rupture de la plaque induit la mise en contact du noyau lipidique avec le sang et la formation d'un thrombus par coagulation sanguine. Ce thrombus évolue vers une occlusion d'abord partielle puis totale de l'artère coronaire et entraîne le développement d'une cardiopathie ischémique. Après occlusion prolongée, les cardiomyocytes subissent une mort cellulaire qui engendre une altération de la fonction systolique, traduite par l'apparition de trouble de la contraction, et/ou une altération de la fonction diastolique qui provoque des anomalies du remplissage du ventricule. Par ailleurs, une nécrose du myocarde qui atteint 20% du tissu cardiaque peut être à l'origine des signes cliniques d'insuffisance ventriculaire gauche. A partir de 45% de myocarde nécrosé apparaît un état de choc cardiogénique en général fatal.

Pour pallier à cette défaillance cardiaque et pour maintenir un débit sanguin adéquat, le cœur développe des mécanismes compensatoires. Ils correspondent à ce que nous appelons plus communément le remodelage cardiaque. Ce dernier se définit par une association simultanée d'hypertrophie pathologique, d'apoptose des cardiomyocytes, de prolifération des myofibroblastes et de la fibrose interstitielle. Ce processus entraîne par conséquent un changement architectural du ventricule (Eaton et al., 1979; Erlebacher et al., 1982; McKay et al., 1986). Il se manifeste par une hypertrophie symétrique de type concentrique de la zone non infarctée accompagnée du développement d'une fibrose interstitielle. La zone dite infarctée, quant à elle, est amincie et forme une cicatrice fibreuse (Cf. figure 2) (Cohn, Ferrari, and Sharpe, 2000; Rumberger et al., 1993)

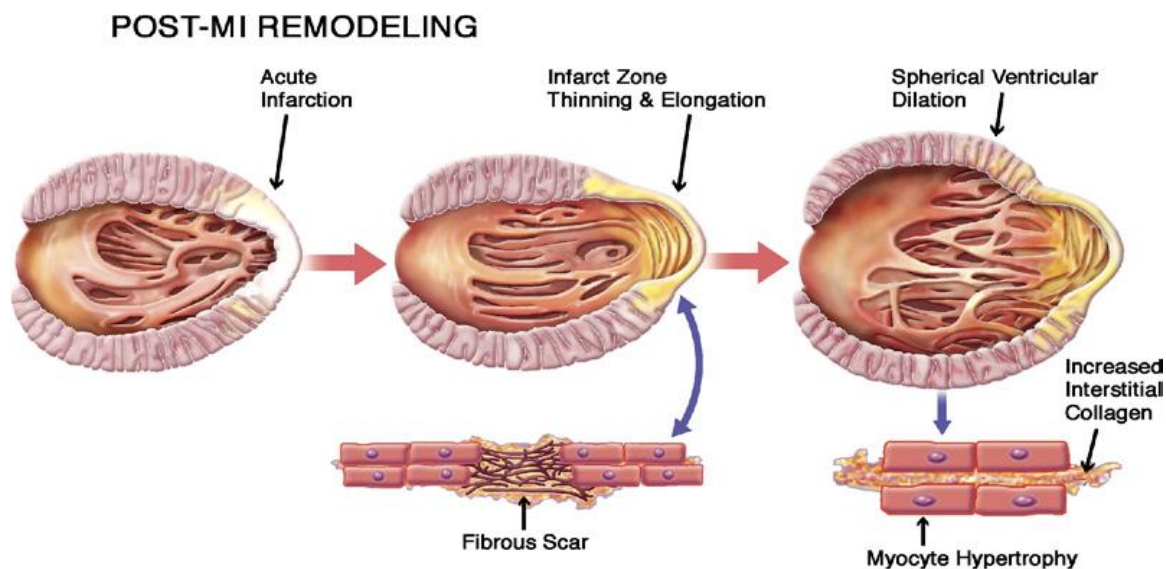


Figure 2. Représentation schématique du phénomène de remodelage cardiaque post-infarctus. (Konstam et al., 2011)

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans le remodelage cardiaque et conduisent au développement de cardiomyopathie (Cf. figure 3) :

- La mort cellulaire des myocytes cardiaques : Une occlusion de l'artère coronaire peut engendrer une mort cellulaire soit par apoptose (Gottlieb et al., 1994; Kajstura et al., 1996b), soit par nécrose (Baines and Molkenstein, 2005; Jennings et al., 1960; Kajstura et al., 1996b), en association avec l'autophagie (Hamacher-Brady, Brady, and Gottlieb, 2006; Matsui et al., 2007; Takagi, Matsui, and Sadoshima, 2007). Lors d'une occlusion coronarienne, les phénomènes d'apoptose atteignent leur maximum au bout de 6 heures alors que les phénomènes de nécrose atteignent leur pic dans les 24 heures suivant l'occlusion (Kajstura et al., 1996a). Par ailleurs, les zones en bordure de l'aire atteinte d'ischémie ont également tendance à devenir apoptotiques (Saraste et al., 1997).
- L'activation des facteurs de transcription : Tels que MEF-2 (Myocyte-specific Enhancer Factor-2), NFκB (Nuclear Factor-κ B), GATA4 (Globin Transcription Factor-4) et NKX2.5 (NK2 protein 5). Ils sont impliqués dans l'hypertrophie cardiaque chez l'adulte via l'activation des gènes fœtaux (Azakie, Fineman, and He, 2006).

- L'activation des gènes fœtaux dont :
 - Les peptides natriurétiques, puissants inhibiteurs de l'hypertrophie, dont le peptide natriurétique auriculaire (ANP ou Atrial Natriuretic Peptide) et le peptide natriurétique de type B (BNP ou Brain Natriuretic Peptide), sont respectivement retrouvés au niveau de l'atrium et du ventricule. Leur expression est élevée durant l'embryogenèse et les premiers mois de la vie mais physiologiquement inexistante à l'âge adulte (Chien et al., 1993).
 - La chaîne lourde de la β -myosine (β -MHC ou β -Myosin Heavy Chain) et la chaîne lourde de l' α -myosine (α -MHC ou l' α -Myosin Heavy Chain) dont les niveaux d'expression sont inversés lors de pathologies cardiaques. Chez les rongeurs, lors de l'infarctus du myocarde, une augmentation de la β -MHC au détriment de l' α -MHC, à plus forte activité ATPasique, est observée (Izumo et al., 1987). Chez l'homme, dans un état physiologique, la β -MHC est prédominante par rapport à l' α -MHC (Everett, 1986; Kurabayashi et al., 1988). Dans les cœurs défaillants, l'expression de l' α -MHC est réduite (Reiser et al., 2001) tandis que chez les patients atteints de cardiomyopathies, l'expression de la β -MHC est augmentée (Nakao et al., 1997). Enfin, il est à préciser que la réduction de l' α -MHC dans les cœurs défaillants est à l'origine d'une réduction de la contractilité du muscle cardiaque (Lowes et al., 1997).
- La libération des cytokines inflammatoires : Telles que le facteur de nécrose tumorale (TNF ou Tumor Necrosis factor) qui à court terme, est protecteur pour le myocarde mais devient rapidement néfaste et est à l'origine d'hypertrophie et de dysfonctionnement cardiaque, après une exposition prolongée (Deswal et al., 2001). La sécrétion des cytokines permet la migration des monocytes circulants dans la zone infarctée et leur différenciation en macrophages. L'infiltration de macrophages dans le ventricule gauche favorise la phagocytose, l'élimination des débris cellulaires, l'activation des fibroblastes et l'angiogenèse qui jouent un rôle important dans les phénomènes de réparation (Ren, Dewald, and Frangogiannis, 2003). Les macrophages sont impliqués dans l'élimination des myocytes cardiaques nécrotiques, des neutrophiles apoptotiques, dans la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance, et dans la régulation de la réponse angiogénique (van Amerongen et al., 2007).
- La fibrose : Lorsqu'elle se situe au niveau de la zone infarctée, est dite de réparation et se développe via la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) durant les premiers jours

qui suivent la nécrose du myocarde. Elle est activée via la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires qui favorisent le recrutement des fibroblastes et leur différenciation en myofibroblastes (Narine et al., 2006; Petrov et al., 2008). Ces derniers envahissent la région infarctée et participent à la production et à la sécrétion des protéines de la MEC dont le collagène et la fibronectine formant la cicatrice. Cette fibrose de réparation permet la destruction et la cicatrisation du tissu nécrotique via l'infiltration de cellules inflammatoires et de macrophages (Heymans S, 1999; Ren, Dewald, and Frangogiannis, 2003; van Amerongen et al., 2007).

Dans la région non infarctée, on parle de fibrose réactionnelle, qui produit un dépôt de protéines de la MEC empêchant la contraction des cardiomyocytes fonctionnels et provoquant à long terme une insuffisance cardiaque (Cleutjens and Creemers, 2002; Swynghedauw, 1999).

- L'altération des voies de signalisation : Deux grandes voies de signalisation sont activées par l'étirement des cardiomyocytes : la voie des protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK ou Mitogen Activated Protein Kinase) et la voie de la calcineurine. Les MAPK sont activées par la stimulation des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G dont les protéines G_{as} et $G_{\alpha q/11}$. Ils correspondent par exemple aux récepteurs de la noradrénaline, de l'angiotensine II et de l'endothéline (Sugden, 2003a; Sugden, 2003b). La voie de la calcineurine est activée par l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium dans les cardiomyocytes (Wilkins and Molkentin, 2002).

La modification de ces deux voies aboutit à l'activation de facteurs de transcription qui déclenchent le processus hypertrophique et la réexpression du programme fœtal.

- La dysfonction mitochondriale et la lipotoxicité : Le métabolisme cardiaque à l'âge adulte dépend principalement de l'utilisation des acides gras donnant lieu à la génération d'Adénosine Triphosphate (ATP) et à la production d'énergie alors que durant la vie embryonnaire, le glucose est le principal substrat utilisé pour la génération d'énergie. Ainsi, lors de la naissance, la reprogrammation des gènes cardiaques conduit à l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras (Bartelds et al., 1998; Fisher, Heymann, and Rudolph, 1980; Rajabi et al., 2007). Lors d'une hypertrophie ou d'une défaillance cardiaque, le programme génétique est à nouveau modifié pour induire une surexpression des gènes ayant un rôle dans le métabolisme

glucidique. Ce phénomène provoque une inutilisation des lipides et donc leur accumulation dans le tissu cardiaque (Rajabi et al., 2007). Il est donc suggéré que l'augmentation des lipides intra-myocardiques contribue au développement des dysfonctions cardiaques par l'apparition d'effets lipotoxiques. Cela a été démontré, chez la souris, par la surexpression du gène *Pparγ* (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ) spécifiquement dans le myocarde. Cette surexpression engendre une augmentation de l'expression des gènes spécifiques au métabolisme des acides gras et une forte capture des triglycérides. Ces souris transgéniques développent une cardiomyopathie dilatée associée à une augmentation des dépôts lipidiques et glucidiques et à des anomalies structurales des mitochondries (Son et al., 2007). Chez l'homme, l'augmentation des dépôts de lipides dans le myocarde est également associée à l'hypertrophie ventriculaire gauche et à la surexpression du gène *Pparγ* (Marfella et al., 2009).

La progression de l'ischémie ou encore les phénomènes de remodelage cardiaque, sont à la base des traitements utilisés en thérapeutique. Nous décrirons donc par la suite les traitements actuellement employés pour pallier aux développements des dysfonctionnements cardiaques.

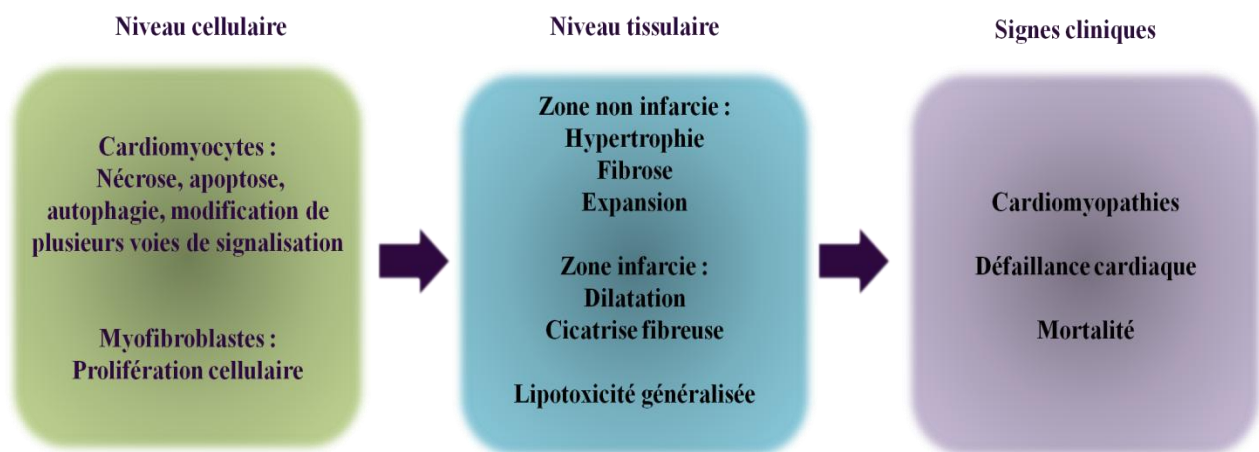


Figure 3. Remodelage cardiaque : niveau cellulaire, tissulaire et signes cliniques associés.

3. Les thérapies des maladies cardiovasculaires

Le traitement d'une pathologie cardiaque ischémique a pour but principal d'améliorer la fonction cardiaque et de réduire la progression de l'ischémie. Il permet, en outre, de limiter la

mortalité et d'améliorer les conditions de vie du patient. Les deux principaux traitements regroupent :

- Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine augmentent le flux sanguin et la fraction d'éjection et limitent le remodelage cardiaque (Garg and Yusuf, 1995; Jong et al., 2002);
- Les β -bloquants augmentent le volume d'éjection systolique, la fraction d'éjection et diminuent les troubles du rythme ventriculaire (Bouzamondo et al., 2003).

Malgré les avancées actuelles en thérapeutique pour le traitement des maladies cardiovasculaires, le pronostique des patients insuffisants cardiaques reste pauvre. Le développement de thérapeutiques alternatives est donc un enjeu majeur de santé publique.

B. Insuffisance rénale néonatale

L'insuffisance rénale peut se développer dès la naissance indépendamment d'une atteinte cardiaque, on parle alors d'insuffisance rénale néonatale. Elle peut représenter une atteinte aiguë et concerne 3 à 8% des nouveau-nés (Hui Stickler S., 2005). Il s'agit dans ce cas d'une insuffisance rénale fonctionnelle par hypo perfusion pouvant être compliquée de lésions tubulo-interstitielles (Agras et al., 2004; Andreoli, 2004; Cataldi et al., 2005). L'insuffisance rénale chronique néonatale est, quant à elle, beaucoup plus rare et est le plus souvent associée à des malformations congénitales.

La classification des néphropathies est anatomo-clinique. La lésion initiale de l'un des composants du parenchyme rénal qui regroupent les glomérules, les tubules, le tissu interstitiel, les vaisseaux, est au centre de cette classification. En outre, on distingue quatre grands types de lésions pouvant se développer lors de néphropathies (Cf. figure 4) :

- Les lésions glomérulaires : Elles se caractérisent entre autres, par des cellules endothéliales glomérulaires qui présentent une hyperplasie et des podocytes qui fusionnent et subissent un étalement de leurs pédicelles. Ces anomalies sont généralement accompagnées de protéinurie et de micro thrombose. La membrane basale est épaissie par l'accumulation de métabolites due à une dysfonction des podocytes, des cellules mésangiales et des cellules endothéliales glomérulaires.

- Les lésions vasculaires : Se caractérisent par la raréfaction du réseau vasculaire interstitielle, processus important dans la pathogenèse de l'insuffisance rénale (Basile, 2007; Rabelink, de Boer, and van Zonneveld, 2010). Ces phénomènes impliquent en outre, la baisse de l'expression des facteurs de croissance tels que celui de l'endothélium vasculaire (VEGF ou Vascular Endothelium Growth Factor) et la surexpression des inhibiteurs de l'angiogenèse (Kang et al., 2001a; Kang et al., 2001b; Norman and Fine, 2006). La réduction du nombre de capillaires sanguins est associée à l'apparition d'hypoxie qui mène à l'augmentation des lésions tubulaires et à la fibrose interstitielle.
- Les lésions tubulaires : L'ischémie induite par la baisse du réseau vasculaire cause une lésion de l'épithélium rénal via une perte de l'intégrité du cytosquelette et de la perte de la polarité cellulaire (Sutton and Molitoris, 1998). Cette dernière conduit à la mauvaise localisation des protéines membranaires telles que les co-transporteurs sodium/potassium et à la désorganisation de l'interaction cellulaire (Zuk et al., 1998). Ces lésions sont responsables de la mort cellulaire des tubules rénaux par nécrose ou apoptose.
- La fibrose rénale : Se développe lorsque les phénomènes de réparation tissulaire sont défaillants. Elle caractérise le plus généralement les néphropathies chroniques. Les événements cellulaires conduisant à la fibrose interstitielle regroupent : l'infiltration de cellules inflammatoires, l'activation et l'expansion des fibroblastes, la production et la déposition de MEC. De plus, elle se décrit par l'atrophie des tubules et la raréfaction du réseau microvasculaire existant (Eddy, 2000; Liu, 2006; Wynn, 2008).

Le système cardiovasculaire comme le système rénal sont régis par l'action de diverses hormones et médiateurs qui agissent pour permettre la transduction de signaux cellulaires par le biais de récepteurs cellulaires. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), forment la plus grande famille de protéines impliquées dans la signalisation cellulaire. A l'heure actuelle, ils sont la principale cible des thérapeutiques, néanmoins leur potentiel n'est que peu exploité. Il est donc important de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de l'activation de ces récepteurs et de mettre en évidence le rôle des RCPG dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires et rénales.

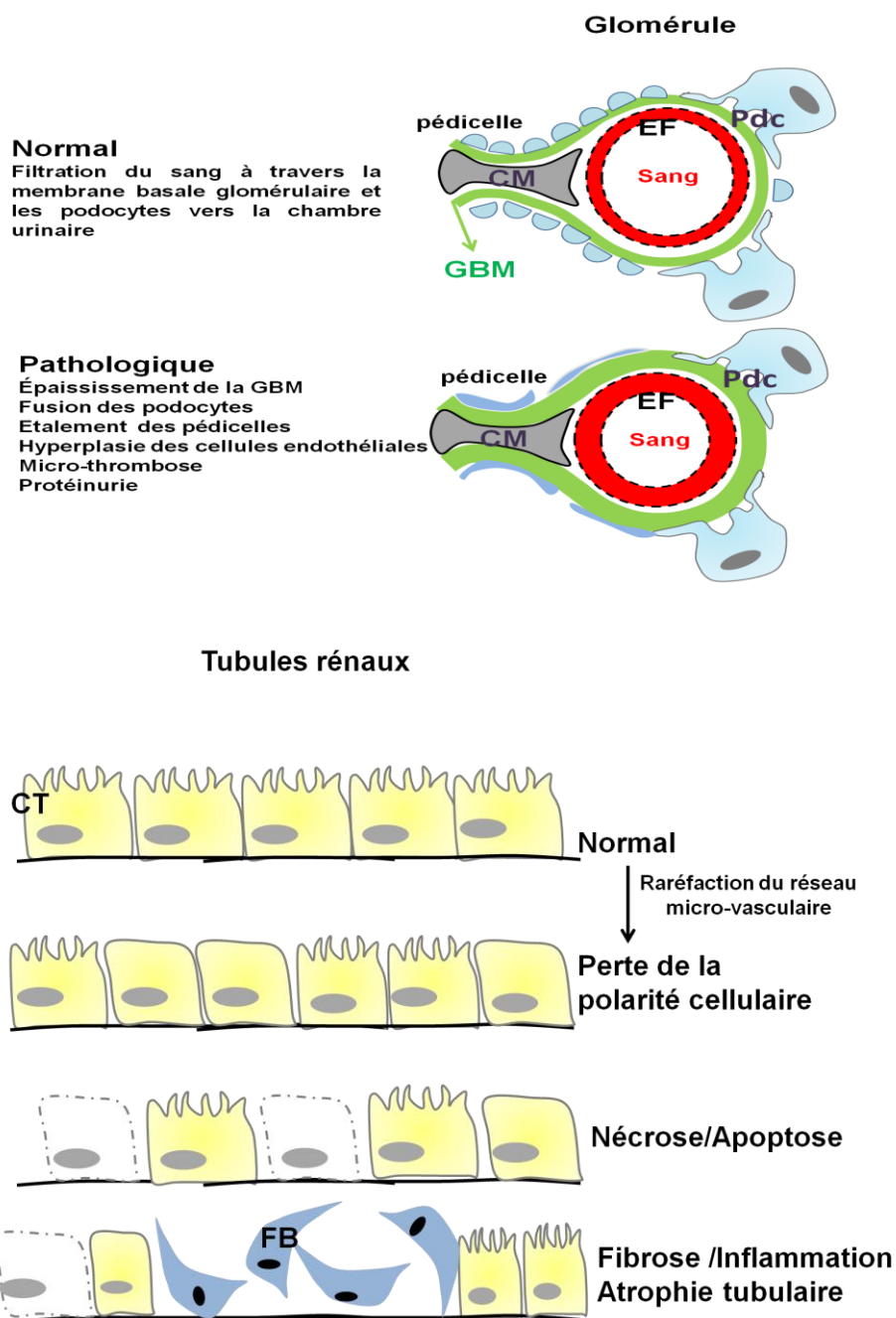


Figure 4. Insuffisance rénale, lésions glomérulaires et tubulaires.

CM : Cellules Mésangiales ; GBM : Membrane Basale Glomérulaire ; EF : Endothélium Fenestré, Pdc : Podocytes ; CT : Cellules Tubulaires ; FB : Fibroblastes

II. Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG)

A. Structure et activation des voies de signalisation des RCPG

Les RCPG sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires et constituent une large famille de molécules de surface impliquée dans la transduction de divers signaux cellulaires. Ainsi, ils peuvent être activés par des stimuli sensoriels (lumière, odorat...) ou encore par des stimuli chimiques (catécholamines, acides aminés...). Ils sont classifiés en trois grands groupes selon le type d'agoniste qui les active :

- 1) Le groupe A (récepteur de type rhodopsine) forme la plus grande sous-famille de RCPG et se caractérise par une séquence conservée d'acides aminés essentiels à leur fonction (Baldwin, 1994; Van Rhee AM, 1996; Wess, 1993). Il regroupe le plus généralement les récepteurs : des neurotransmetteurs, de la prostaglandine, des neuropeptides, des agents olfactifs et gustatifs, des petits ligands tels que le rétinol.
- 2) Le groupe B (récepteur sécrétine/glucagon) se caractérise par une séquence de 20 acides aminés conservée et de 6 résidus cystéines (Laburthe et al., 1996). Il se compose des récepteurs pour les hormones protéiniques de masse importante telles que le glucagon ou l'hormone parathyroïdienne.
- 3) Le groupe C comprend les récepteurs de l'acide γ -aminobutyrique (Kaupmann et al., 1997), les récepteurs métabotropes du glutamate (Conn and Pin, 1997) et les récepteurs extracellulaires du calcium (Brown et al., 1993).

Les RCPG agissent via un mécanisme moléculaire qui leur est commun. La liaison d'un agoniste cause un changement de conformation du récepteur qui mène à l'association du récepteur à différentes classes de protéines G trimériques (Bourne, 1997; Conklin and Bourne, 1993; Dohlman et al., 1991; Neer, 1995; Wess, 1997). Celles-ci sont des trimères qui se composent d'une sous-unité α se liant au GDP (guanosine diphosphate) et d'une sous-unité $\beta\gamma$. L'interaction du ligand avec le récepteur induit le changement de liaison du GDP par le GTP (guanosine triphosphate) sur la sous-unité α . Ceci entraîne une séparation des sous-unités de la protéine G dont l' α -GTP et la $\beta\gamma$, qui interagiront avec différents effecteurs pour donner lieu à la réponse physiologique attendue (Clapham and Neer, 1997; Conklin and Bourne, 1993).

Les protéines G trimériques sont classifiées en quatre grands groupes en fonction des similitudes en acides aminés de la sous-unité α (Conklin and Bourne, 1993; Neer, 1995; Rens-Domiano and Hamm, 1995) :

- ✓ La famille G_{as} inclut les sous unités α_s et α_{olf} , cette dernière étant exprimée dans l'épithélium olfactif ;
- ✓ La famille $G_{ai/o}$;
- ✓ La famille $G_{aq/11}$ se compose des membres α_q , α_{11} , α_{14} , α_{15} et α_{16} (ces deux dernières correspondant à une version murine et humaine d'un même gène) ;
- ✓ La famille $G_{a12/13}$ regroupe deux membres α_{12} et α_{13} .

Chacune des sous-unités α interagit avec un effecteur cible spécifique (Cf. figure 5). Les sous-unités α_s et α_i régulent le niveau intracellulaire d'adénosine 3',5' monophosphate cyclique (AMPC) en agissant, respectivement, sur l'activation ou l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC) qui régule l'activité de la protéine kinase A (PKA).

La sous-unité $\alpha_{q/11}$ agit sur la phospholipase C (PLC) qui induit la transformation du phosphoinositol-4,5bis-phosphate (PIP2) en inositol-3-phosphate (IP3) et diacylglycerol (DAG) (Conklin and Bourne, 1993; Neer, 1995; Rens-Domiano and Hamm, 1995).

La sous-unité $G_{a12/13}$ active la Rho guanine-nucleotide exchange factor (Rho Gef).

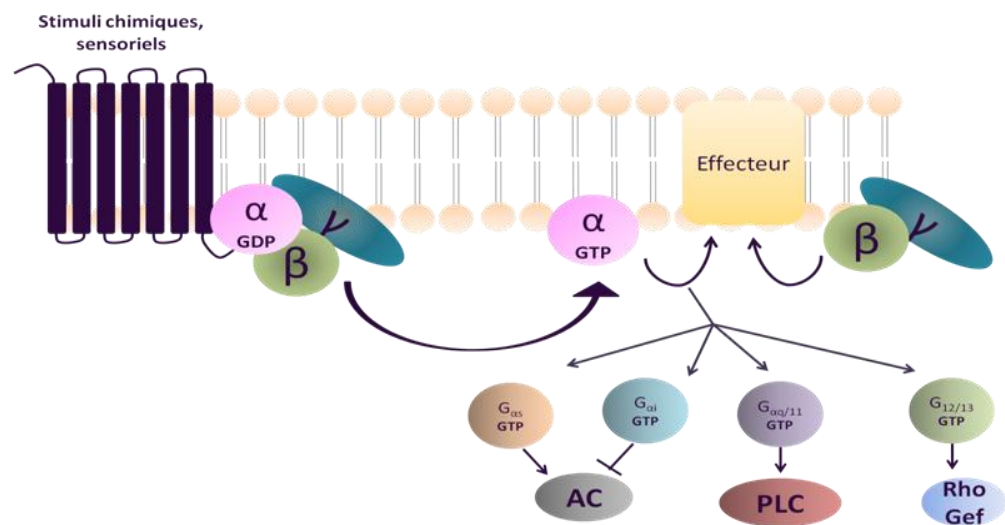


Figure 5 Activation des RCPG et voies de signalisation associées

L'action des ligands sur les RCPG via l'activation des protéines G permet la stimulation de la signalisation cellulaire propre aux états physiologique et pathologique du cœur et du rein. Nous développerons dans les parties suivantes les voies de signalisation des RCPG spécifiques aux systèmes cardiovasculaire et rénal.

B. Les RCPG dans le système cardiovasculaire

La voie de signalisation par les RCPG est prédominante dans le cœur, ainsi on estime à 200 le nombre de récepteur, cible potentielle pour le traitement des maladies cardiovasculaires. Les pathologies cardiaques restant la principale cause de mortalité dans le monde, une meilleure compréhension de la voie de signalisation des RCPG dans le cœur sain et défaillant permettrait une avancée considérable dans le traitement de ce type de pathologies. Dans cette partie, nous nous focaliserons ainsi sur la description de la voie de signalisation des RCPG dans le cœur à l'état physiologique et pathologique.

C. Rôle des RCPG dans la contractilité cardiaque

a. Voies de signalisation associées aux protéines G régulant l'AMPc

- **Les récepteurs couplés aux protéines $G_{\alpha s}$ (Cf. figure 6)**

Les principaux récepteurs cardiaques qui agissent via les protéines $G_{\alpha s}$, sont les récepteurs β -adrénergiques (β AR) qui sont activés par les catécholamines endogènes. Le récepteur β 1AR régule les fonctions inotropes (relatives à la force de contraction) et chronotropes (relatives à la fréquence cardiaque) du cœur à l'état physiologique.

Ainsi chez l'homme, le traitement avec des agonistes spécifiques β 1AR et β 2AR provoque l'amplification du flux de calcium via les canaux calciques voltages dépendants de type L (LDCC) et conduit à des effets inotropes cardiaques (Christ et al., 2011).

Dans le même sens, la surexpression du gène β 1ar, chez la souris, induit l'augmentation de la fonction cardiaque mais également l'apparition d'hypertrophie progressive et de défaillance cardiaque (Engelhardt et al., 1999; Tilley and Rockman, 2006).

L'inactivation du gène β 2ar, toujours chez la souris, provoque une perte des effets inotropes et chronotropes cardiaques (Chruscinski et al., 1999). Les récepteurs β 2AR ont donc les mêmes effets positifs sur la fonction cardiaque mais peuvent également être couplés aux protéines $G_{\alpha i}$ (Daaka, Luttrell, and Lefkowitz, 1997).

- **Les récepteurs couplés aux protéines G_{ai} (Cf. figure 6)**

Les protéines G_{ai} s'opposent à la voie de signalisation des protéines G_{as} . Ainsi, via l'inhibition de l'AC et de la réduction de l'AMPc, ils permettent de bloquer la force de contraction des cardiomyocytes en agissant négativement sur les LDCC (Brodde and Michel, 1999).

Le récepteur 2 muscarinique (M2), activé par l'acétylcholine, a des effets inotropes négatifs via l'activation de la sous-unité α_{i2} (Boknik et al., 2009; Nagata et al., 2000) et chronotropes négatifs via l'activation de la sous-unité $\beta\gamma$ de la protéine G (Logothetis et al., 1987)

Un autre récepteur, celui du lipide Sphingosine-1-phosphate (S1P), joue un rôle dans la bradycardie. Les récepteurs S1P sont capables d'inverser la réponse contractile induite par une stimulation β AR. Ils agissent via l'activation des protéines $G_{ai/o}$ et la régulation des canaux potassiques (K_{Ach}) pour permettre la réduction du flux de calcium dans la cellule et ainsi la baisse de la contractilité (Landeem et al., 2008; Means et al., 2008).

- **Voies de signalisation dépendantes de la PKA (Cf. figure 6)**

La contractilité des cardiomyocytes est donc induite par le biais de l'activation des protéines G_{as} qui entraînent la stimulation de la voie de signalisation AC/AMPc/PKA. Cette voie est responsable du contrôle de la contractilité cardiaque via la phosphorylation de protéines cibles dont :

- ✓ Les canaux LDCC qui appartiennent à la superfamille des canaux ioniques membranaires dépendants du potentiel. Ils permettent le contrôle positif des récepteurs de la ryanodine (RyR) afin de libérer le calcium présent dans le réticulum sarcoplasmique et d'induire la contractilité cardiaque (Cannell, Cheng, and Lederer, 1995).
- ✓ Le récepteur de la RyR dont l'activité est contrôlée par la PKA et par la protéine kinase calcium/Calmoduline dépendante (CaMKII.). La PKA augmente la vitesse d'ouverture du canal et active la libération du calcium dans le cytoplasme durant la systole (Ai et al., 2005; Curran et al., 2010; Soltis and Saucerman, 2010; Ullrich, Valdivia, and Niggli, 2012).
- ✓ Le phospholambane (PLB), à l'état déphosphorylé, est une protéine associée à la pompe calcium-ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA) et entraîne une inhibition de l'entrée du calcium dans le réticulum sarcoplasmique. Phosphorylé, il

perd son affinité pour SERCA ce qui provoque l'entrée du calcium dans le réticulum et la relaxation de la fibre cardiaque (Toyofuku et al., 1993).

- ✓ La troponine cardiaque I (cTnI) qui réduit la sensibilité du myofilament pour le calcium accélérant ainsi la relaxation du muscle (Zhang et al., 1995).

La PKA augmente également la production d'espèces réactives à l'oxygène impliquées dans les effets inotropes de la voie de signalisation des protéines $G_{\alpha s}$ (Andersson et al., 2011; Kubin et al., 2011).

- **Voies de signalisation dépendantes de l'EPAC ou Exchange Protein Activated by AMPc (Cf figure 6)**

La génération d'AMPc provoque également l'activation de l'EPAC, protéine ayant des effets contractiles indépendants de ceux de la PKA, vu précédemment. L'EPAC induit également la phosphorylation du récepteur RyR, du PLB et de la troponine cardiaque et l'activation de la CaMKII (Cazorla et al., 2009; Oestreich et al., 2009; Pereira et al., 2007; Smrcka et al., 2007).

b. Voies de signalisation associées aux protéines $G_{\alpha q/11}$

- **Les récepteurs couplés aux protéines $G_{\alpha q/11}$ (Cf. figure 6)**

Le récepteur $\alpha 1$ -Adrénérergique ($\alpha 1AR$) active la signalisation cellulaire via les protéines $G_{\alpha q/11}$ et jouent un rôle principal dans la régulation de la pression artérielle et la contractilité (Cavalli et al., 1997; O'Connell et al., 2003; O'Connell et al., 2006). La surexpression du gène $\alpha 1ar$, chez un modèle de souris insuffisant cardiaque, conduit à l'augmentation de la contractilité (Lin et al., 2001) par la translocation du récepteur TRPC6 (Transient Receptor Potential Canonical-6) responsable de l'augmentation du flux calcique (Mohl et al., 2011).

Les récepteurs de l'endothéline-1 (ET-1), un vasoconstricteur puissant, ont également des actions chronotropes et inotropes sur le cœur (Asano et al., 2002).

- **Voies de signalisation activées par les protéines $G_{\alpha q/11}$ (Cf. figure 6)**

Les voies de signalisation $G_{\alpha q/11}$ ont des effets inotropes sur les cardiomyocytes via la PLC, l'IP3 et le DAG responsables de la libération du calcium dans le cytoplasme (Fabiato and

Fabiato, 1979; Marks, 2001; Marks, 2002; Simpson, 1985; Simpson, McGrath, and Savion, 1982; Simpson et al., 1991). L'activation de cette voie de signalisation conduit à la stimulation de diverses isoformes de la PKC, à l'activation de la protéine kinase D (PKD) et de la CaMKII qui sont impliquées dans :

- ✓ La phosphorylation du PLB qui est phosphorylé par la voie de signalisation CaMKII/PKC ϵ , (Oestreich et al., 2009). La surexpression de l'isoforme δ c du gène de la *CamkII* induit, chez la souris, une altération du transport du calcium alors que son inhibition provoque l'effet inverse (Huke et al., 2011). La phosphorylation du PLB peut être inhibée par la PKC α via une protéine de déphosphorylation appelée phosphatase-1 mediated dephosphorylation (Braz et al., 2004).
- ✓ La phosphorylation des canaux LDCC qui comprennent plusieurs sites de phosphorylation spécifiques aux isoformes de la PKC (Yang et al., 2009) et à la PKD (Jhun et al., 2012).
- ✓ L'interaction de la cTnI avec la PKC α après l'augmentation intracellulaire du calcium afin de maintenir la force contractile (Molnar et al., 2009). La phosphorylation du cTnI par la PKC β II augmente sa sensibilité au calcium (Wang et al., 2006a) alors que la PKC ϵ ou la PKD ont un rôle inverse (Goodall et al., 2010; Kooij et al., 2010).
- ✓ La phosphorylation de la protéine cMyBP (cardiac Myosin-Binding Protein), dépendante de la PKC α , de la PKC ϵ et de la PKD, induit l'accélération des cycles d'étirements-raccourcissements du sarcomère (Bardswell et al., 2010).

c. **Les voies de signalisation indépendantes des protéines G dans la contractilité cardiaque : rôle de la β -arrestine**

Les voies de signalisation induites par les RCPG mais indépendantes des protéines G mettent en jeu la phosphorylation des RCPG par les GRKs (GPCR Kinase) et le recrutement de la β -arrestine. (Krupnick, Gurevich, and Benovic, 1997). Il a été mis en évidence le rôle de cette dernière dans la contractilité cardiaque : le traitement par des ligands biaisés du récepteur 1 de l'angiotensine II (AT1R) provoque l'activation de voies de signalisation dépendantes de la β -arrestine 2 et l'induction de la contractilité de cardiomyocytes isolés de cœurs de souris adultes (Rajagopal et al., 2006; Tilley, Nguyen, and Rockman, 2010; Violin et al., 2010). Les mécanismes par lesquels la β -arrestine induit la contractilité cardiaque ne sont pas encore

totale­ment connus. Ils comprennent : l'activation de protéines régulant la contractilité cardiaque telles que l'EPAC ou la CaMKII (Mangmool, Shukla, and Rockman, 2010) ; la phosphorylation de diverses protéines impliquées dans la contractilité cardiaque (Sanni et al., 2010; Xiao et al., 2007) ; la réorganisation du cytosquelette puisque la stimulation des récepteurs AT1R induit l'association de la β -arrestine 1 avec l'ARHGAP21 qui est une protéine activant les Rho GTPase. Ces dernières jouent un rôle dans la réorganisation des fibres de stress (Anthony et al., 2011; Barnes et al., 2005).

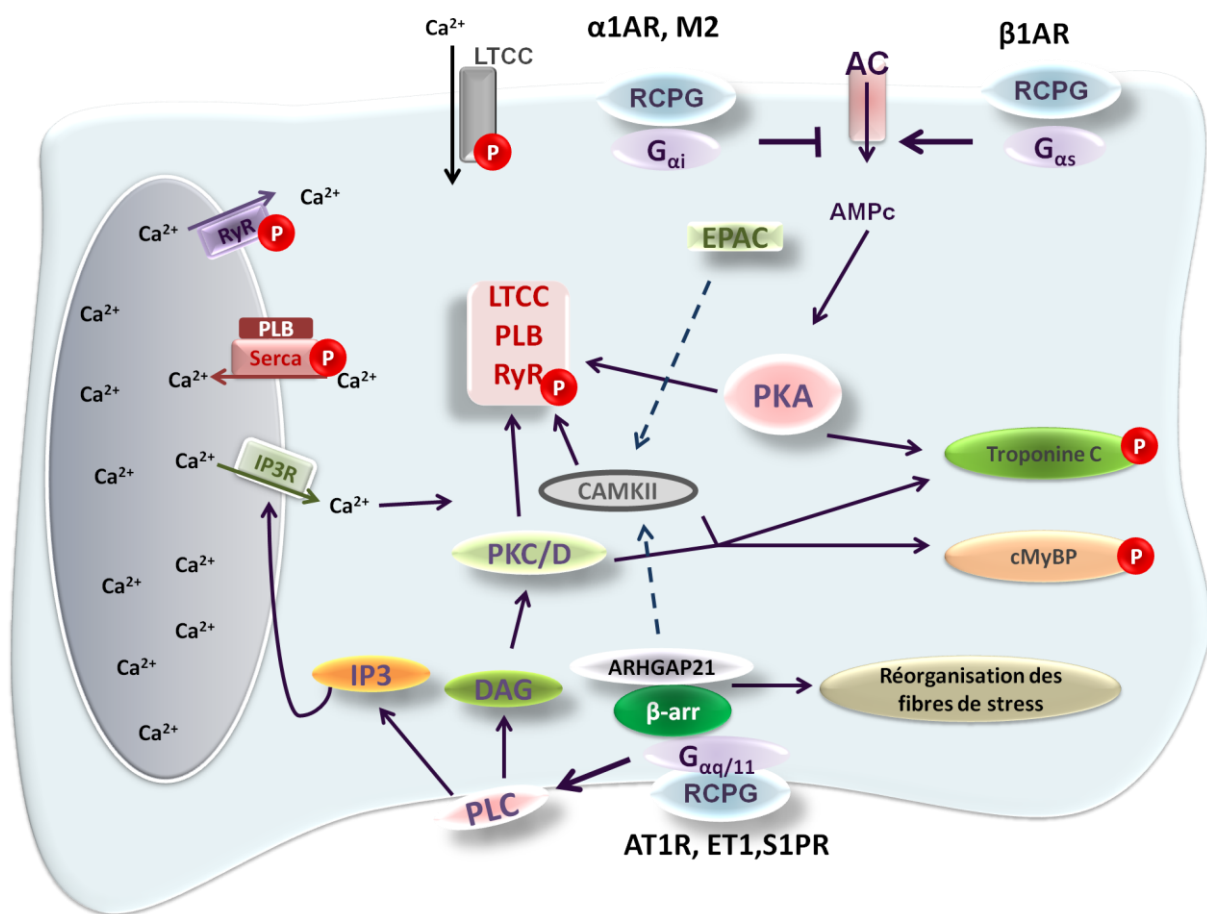


Figure 6. Rôle de la voie de signalisation dépendante et indépendante aux protéines G dans la contractilité cardiaque.

RyR : récepteur à la ryanodine ; PLB : phospholambane ; IP3R : récepteur 3 de l'inositol-3-phosphate ; LTCC : canaux calciques voltage dépendant de type L ; AC : adénylate cyclase ; PKA : protéine kinase A ; PKC : protéine kinase C ; PKD : protéine kinase D ; EPAC : exchange protein activated by cAMP ; CaMKII : calmodulin dependant protein kinase II ; DAG : diacylglycerol ; IP3 : inositol-3-phosphate ; PLC : phospholipase C ; β -arr : β -arrestine

D. Rôle des RCPG en pathologie cardiaque

1. Les voies de signalisation associées aux protéines G régulant l'AMPc

- **Voies de signalisation dépendantes des protéines G_{as} (Cf. figure 7)**

En situation pathologique, les récepteurs β AR subissent une activation chronique. Celle-ci induit l'hypertrophie, la fibrose et par la suite la défaillance cardiaque. Il a été notamment constaté qu'une surexpression des protéines G_{as} spécifiquement au niveau des cardiomyocytes, entraîne une augmentation de la fréquence cardiaque et de la contractilité, une hypertrophie, une fibrose et une nécrose cellulaire en réponse à la stimulation par les catécholamines (Gaudin et al., 1995; Iwase et al., 1996).

En situation pathologique, l'expression des récepteurs β 1AR est réduite en comparaison à l'expression des récepteurs β 2AR. Plus particulièrement, on observe une modification de l'expression du ratio β 1AR/ β 2AR qui se décrit, respectivement, de la façon suivante : 80 :20 à 60 :40 dans les cœurs sains et défaillants (Bristow et al., 1989; Ungerer et al., 1993).

Les récepteurs β AR déclenchent l'activation de la voie de signalisation AMPc/PKA/ERK/Akt qui est l'une des principales voies régulant l'hypertrophie cardiaque (Nunn et al., 2010). Le rôle de l'EPAC est également associé dans l'hypertrophie induite par la stimulation des β AR via l'activation de la voie de signalisation Ras/Calcineurine/CaMKII (Metrich et al., 2008). L'activation de cette voie de signalisation permet la régulation de l'activité de la CaMKII, du facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT), et de la protéine MEF2 qui jouent un rôle dans l'initiation de l'hypertrophie (Metrich et al., 2010).

Une stimulation chronique par les catécholamines induit donc l'hypertrophie et l'apoptose de myocytes cardiaques menant à une réduction de la contractilité (Xiang and Kobilka, 2003). L'apoptose des cardiomyocytes est l'une des causes conduisant à l'insuffisance cardiaque. Dès lors, dans les cœurs insuffisants cardiaques, les processus de mort cellulaire par apoptose chez les cardiomyocytes sont augmentés de 200 fois en comparaison aux cœurs sains (Olivetti et al., 1997). Une relation entre la stimulation de la signalisation des β AR et l'apoptose des cardiomyocytes a été établie. Ainsi, les agonistes β AR (norépinephrine ou isoprotérénol) induisent l'apoptose des cardiomyocytes en culture (Communal et al., 1998). Cette relation a été confirmée *in vivo* par l'injection chronique d'isoprotérénol chez le rat (Shizukuda et al., 1998).

- **Voies de signalisation dépendantes des protéines G_{ai} (Cf. figure 7)**

Les protéines G_{ai} sont largement impliquées dans l'hypertrophie et la progression de l'insuffisance cardiaque.

Ainsi, l'augmentation de l'expression des protéines G_{ai} a été détectée chez un modèle génétique d'induction de la voie de signalisation Ras/MAPK déclenchant l'hypertrophie. En effet, cette augmentation est corrélée avec la régulation du transport du calcium qui mène à l'hypertrophie ventriculaire et l'arythmie cardiaque qui sont toutes deux normalisées par l'utilisation de la toxine pertussique, inhibiteur des protéines G_{ai} (Ruan et al., 2007).

Néanmoins, l'inhibition des protéines G_{ai} , lors de l'ischémie/reperfusion, a démontré une augmentation de l'apoptose révélant un rôle cardio-protecteur de ces protéines lors de stress ischémique cardiaque (DeGeorge et al., 2008). Le récepteur 1 de l'adénosine (A_1) a ainsi été décrit comme cardio-protecteur puisqu'il permet la réduction de la zone infarctée chez des modèles animaux d'infarctus du myocarde (Olafsson et al., 1987; Pitarys et al., 1991) et l'atténuation des dysfonctions post-ischémiques (Donato and Gelpi, 2003; Mosca, Gelpi, and Cingolani, 1994; Ogawa et al., 1996; Sekili et al., 1995).

Par ailleurs, le récepteur α_2AR est impliqué dans l'atténuation des voies de signalisation activées par les récepteurs βAR . En effet, l'inactivation de ce récepteur, induite par manipulation génétique chez la souris et congestive chez l'homme, provoque le développement de dysfonctions cardiaques (Small et al., 2002; Xiang and Kobilka, 2003).

2. Voies de signalisation associées aux protéines $G_{aq/11}$

- **Les RCPG couplés aux protéines $G_{aq/11}$ (Cf. figure 7)**

Les principaux RCPG couplés aux protéines $G_{aq/11}$ regroupent les récepteurs de l'angiotensine II, de l'endothéline et α -adrénergique.

En situation d'hypertrophie, la libération de l'Ang II augmente et provoque une surexpression de son récepteur AT_1R , régulée négativement à long terme conduisant, le plus généralement à des phénomènes de décompensation et à la défaillance cardiaque (Lambert, Massillon, and Meloche, 1995; Makita et al., 1992; Meggs et al., 1993; Regitz-Zagrosek et al., 1997; Regitz-Zagrosek et al., 1995; Rogg et al., 1996; Suzuki et al., 1993). A ce titre, il a été observé que la surexpression du gène *At1r* chez la souris entraîne des mécanismes hypertrophiques et de fibroses qui favorisent la mortalité lors de l'induction de l'infarctus du myocarde (Paradis et

al., 2000). L'inactivation du gène *At1r*, pour sa part, entraîne une réduction de la réponse hypertrophique, une baisse de la dilation du ventricule gauche et de la fibrose induite par l'AngII chez un modèle d'infarctus du myocarde (Harada et al., 1999). A long terme, néanmoins, cette inactivation provoque le développement d'hypertrophie (Harada et al., 1998a; Harada et al., 1998b). Les récepteurs $\alpha 1$ AR jouent également un rôle dans la régulation de la pression artérielle, de la contractilité et des réponses hypertrophiques (Cavalli et al., 1997; O'Connell et al., 2003; O'Connell et al., 2006).

L'endothéline est aussi impliquée dans l'induction des réponses hypertrophiques. Ainsi, la surexpression spécifique du gène *Et-1* ou de sa voie de signalisation conduit à la mort par insuffisance cardiaque principalement due à des phénomènes inflammatoires, d'hypertrophie et d'apoptose (Asano et al., 2002; Yang et al., 2004).

- **Voies de signalisation associées à la PLC/PKC/MAPK (Cf. figure 7)**

Les récepteurs couplés aux protéines $G_{\alpha q/11}$ jouent donc un rôle crucial dans l'apoptose et l'hypertrophie cardiaque. Le DAG active la PKC qui est impliquée dans l'apoptose, la nécrose et l'hypertrophie cardiaque (Simpson, 1985; Simpson, McGrath, and Savion, 1982; Simpson et al., 1991; Vega et al., 2004). Différentes isoformes de la PKC existent, dont :

- ✓ La PKC α , prédominante dans le cœur humain (Hahn et al., 2003), agit en régulant la contractilité via la phosphorylation du PLB et de SERCA (Braz et al., 2004).
- ✓ La PKC β est un important régulateur de l'hypertrophie, de la contractilité cardiaque et de la croissance cardiaque du nouveau-né (Bowman et al., 1997; Wakasaki et al., 1997).
- ✓ La PKC δ est un régulateur crucial de la nécrose post-ischémique, de la dysfonction et de la contraction cardiaque (Inagaki et al., 2003; Lin et al., 2001).
- ✓ La PKC ϵ est considérée comme ayant un rôle protecteur lors de l'ischémie (Inagaki, Churchill, and Mochly-Rosen, 2006; Shi, Papay, and Perez, 2012).

La stimulation des récepteurs $\alpha 1$ AR provoque une réponse hypertrophique par l'activation de la voie de signalisation PLC/PKC. En effet, l'inhibition d'acides aminés situés dans la région C-terminale de la PLC $\beta 1b$ conduit au blocage de l'hypertrophie résultante de l'activation des récepteurs $\alpha 1$ AR (Filtz et al., 2009).

Par ailleurs, les MAPK ont également été décrites comme cibles de la voie PLC/PKC activée par les protéines $G_{\alpha q/11}$ (Kehat and Molkentin, 2010). L'activation et l'inhibition de la PKC

ont respectivement des effets positifs et négatifs sur l'activité d'ERK1/2 qui contrôle la croissance cellulaire (Dorn and Force, 2005). De plus, l'inhibition des cibles de la kinase d'ERK1/2 (Extracellular signal-regulated protein kinase) telles que la MSK-1 (Mitogen-Activated Kinase-1), SAK-1 (Stress-Activated Kinase-1) et MNK-1 (MAP-kinase-interacting-kinase 1), conduit à la réduction de la réponse hypertrophique (Markou et al., 2009; Spruill and McDermott, 2006). Il est important d'ajouter que ERK1/2 est également impliqué dans la régulation de l'expression des gènes tels que la kinase ribosomale S6 de 70kDa ou du NFAT (Sanna et al., 2005). Enfin, l'activation d'ERK1/2 contribue au développement de l'hypertrophie concentrique alors que son inhibition provoque l'apparition de l'hypertrophie excentrique (Kehat et al., 2011).

- **Voies de signalisation associées à la CaMKII (Cf. figure 7)**

Lors de l'activation des protéines $G_{\alpha q/11}$, l'IP3 induit la libération de calcium qui provoque l'activation des gènes de la réponse hypertrophique et de la calcineurine dont la cible est le NFAT (Dorn and Force, 2005). L'isoforme 3 de cette dernière agit avec la CaMKII pour permettre le déclenchement de la réponse hypertrophique en situation pathologique mais également lors de la croissance cardiaque (Brodde and Michel, 1999; Dorn and Force, 2005) : la surexpression des isoformes δb et δc de la *CamkII* entraîne le développement de l'hypertrophie cardiaque (Zhang et al., 2007b). Cependant, l'inhibition de la *CamkII* δ n'empêche pas le développement de l'hypertrophie via un mécanisme permettant la surexpression de la *CamkII* γ (Ling et al., 2009). Cette inhibition a, néanmoins, des effets bénéfiques puisqu'elle améliore la dysfonction ventriculaire et réduit le remodelage cardiaque lors de l'insuffisance du myocarde chez des modèles animaux de défaillances cardiaques (Mishra et al., 2010).

3. Voies de signalisation associées aux protéines $G_{\alpha 12/13}$

Les protéines $G_{\alpha 12/13}$ par le biais de l'activation de la famille RhoGEF induisent la stimulation des petites GTPase RhoA qui sont impliquées dans le contrôle de divers processus cellulaires. Ainsi, l'activation des récepteurs AT1R, ET1 et $\alpha 1AR$ entraîne, par le biais de la stimulation des protéines $G_{\alpha 12/13}$, des réponses hypertrophiques et de fibroses du tissu cardiaque via la

l'activation des voies de signalisation associées à la kinase c-Jun (Fujii et al., 2005; Maruyama et al., 2002; Nishida et al., 2007; Nishida et al., 2005). L'AKAP-lbc (A-Kinase Anchoring Protein), protéine comportant une activité RhoGEF, induit également l'activation des voies de signalisation $\alpha 1AR/G_{\alpha 12/13}$ contrôlant la kinase p38 (Appert-Collin et al., 2007; Cariolato, Cavin, and Diviani, 2011).

4. Voies de signalisation indépendantes des protéines G et associées à la β -arrestine

- **β -arrestine/MAPK (Cf. figure 7)**

La stimulation des récepteurs AT1R provoque la formation d'un complexe liant la β -arrestine et s'internalisant pour prolonger l'effet de MAPK telle que l'ERK1/2 (DeWire et al., 2007). Les effets majeurs de cette voie de signalisation incluent la survie des cardiomyocytes, l'hypertrophie et la synthèse protéique (Ahn et al., 2009; Aplin et al., 2007; DeWire et al., 2008).

Le complexe AT1R/ β -arrestin 2 provoque l'activation d'ERK1/2 et de la protéine ribosomale S6 de 90kDa impliquée dans la synthèse protéique et la prolifération (Aplin et al., 2007). De plus la MNK1 est également capable d'interagir avec le complexe AT1R/ β -arrestine et d'induire la synthèse protéique par le biais de la phosphorylation du facteur eIF4E (Eukaryotic Translation Initiation Factor-4E) (DeWire et al., 2008).

- **β -arrestine/transactivation du récepteur du facteur de croissance de l'épithélium (EGF ou epithelium growth factor) (Cf. figure 7)**

Divers RCPG ont été associés à l'induction de la transactivation de l'EGFR et à l'activité d'ERK1/2, tout deux initiant l'hypertrophie (Esposito et al., 2011; Kim et al., 2009a; Tilley et al., 2009; Zhai et al., 2006).

De plus, la stimulation du récepteur $\beta 1AR$ par les catécholamines est capable d'induire la transactivation de l'EGFR via un complexe EGFR/ERK1/2 activé par la β -arrestine (Tilley et al., 2009).

La transactivation de l'EGFR par l'activation de l'AT1R provoque la prolifération des fibroblastes, l'hypertrophie et l'apoptose (Seta and Sadoshima, 2003; Zhai et al., 2006).

- *β -arrestine/régulation de l'expression génique*

La β -arrestine joue également un rôle dans la régulation de l'expression génique.

En réponse à la stimulation des catécholamines, le récepteur $\beta 1AR$ par le biais de la β -arrestine et de l'activation d'Akt induit l'augmentation de l'expression des gènes fœtaux et de la synthèse protéique dans les cardiomyocytes de rat (Morisco et al., 2008).

Par ailleurs, la transactivation de l'EGFR via la stimulation du récepteur AT1R/ β -arrestine-2 induit l'activation de l'ERK1/2 jouant un rôle dans la synthèse de l'ADN (Kim et al., 2009a).

La voie de signalisation AT1R/ β -arrestine potentialise également l'action du récepteur β 2AR sur la stimulation de l'expression des gènes hypertrophiques (Christensen et al., 2011). Dans le même sens, il a été révélé un lien entre l'activation de la β -arrestine induite par la stimulation des récepteurs AT1R et β 2AR dans l'activation de la contractilité cardiaque et l'hypertrophie (Barki-Harrington, Luttrell, and Rockman, 2003; Cervantes, Crosby, and Xiang, 2010).

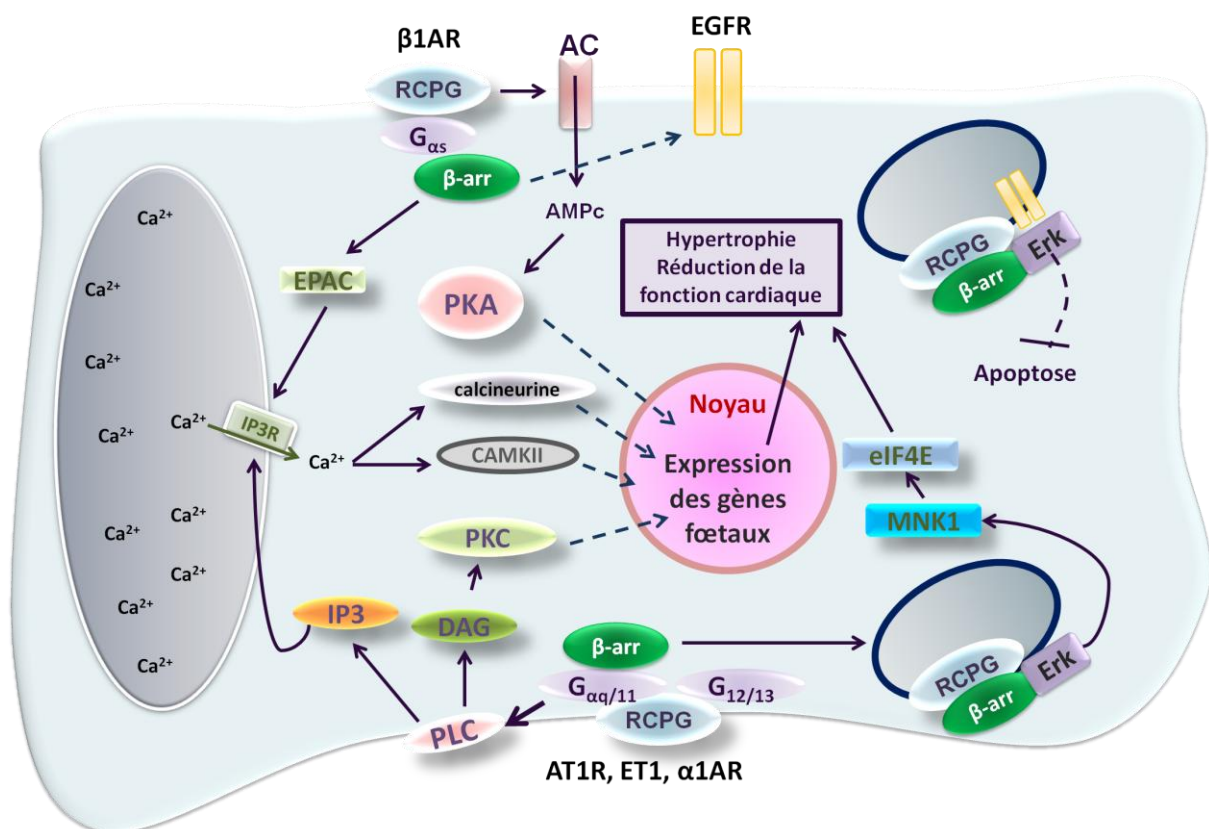


Figure 7. Rôle des voies de signalisation dépendantes et indépendantes des protéines G en pathologie cardiaque.

IP3R : récepteur 3 de l'inositol-3-Phosphat ; AC : adénylate cyclase ; PKA : protéine kinase A ; PKC : protéine kinase C ; EPAC : exchange protein activated by cAMP ; CAMKII : calcium/calmodulin dependant protein kinase II ; DAG : diacylglycérol ; IP3 : inositol-3-phosphate ; PLC : phospholipase C ; β -arr : β -arrestine ; eIF4E : Eukaryotic Translation Initiation Factor-4E ; MNK-1 : MAP-kinase-interacting-kinase 1.

E. Les RCPG dans le rein

Tout comme pour le système cardiovasculaire, la fonction rénale est régulée par le biais de diverses voies de signalisation impliquant des RCPG. L'activation de ces récepteurs se fait par l'action d'hormones peptidiques dont l'argénine-vasopressine, l'angiotensine II, l'hormone parathyroïdienne, par l'action de la dopamine ou encore des métabolites de l'acide arachidonique (Cf. figure 8).

1. Argénine-vasopressine

L'argénine-vasopressine est une hormone peptidique régulatrice clé de l'homéostasie hydrique. Elle agit via deux récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs V1 et V2 :

- Le récepteur V₂ couplé aux protéines G_{as} est exprimé au niveau de la membrane basale des cellules principales du tubule collecteur rénal. Il leur confère, via la translocation des aquaporines à la surface membranaire, une perméabilité élevée à l'eau qui est réabsorbée et rejoint l'interstitium médullaire (Breyer and Ando, 1994; Maeda et al., 1992; Pernot et al., 2011). Au niveau des tubules distaux, le récepteur V₂ permet la réabsorption des ions chlorure de sodium via la phosphorylation du co-transporteur des ions sodium/chlorure (NCC) (Mutig et al., 2010).
- Le récepteur V₁ et le récepteur V₂ permettent la stimulation du co-transporteur NCC au niveau de la partie ascendante de l'anse de Henlé (Paliege et al., 2012; Wittner et al., 1991).

2. L'angiotensine II (AngII)

L'Ang II est une hormone impliquée dans la physiopathologie rénale. En effet, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion, bloquant la synthèse de l'Ang II, utilisés lors du traitement des maladies cardiovasculaires, ont montré des effets bénéfiques sur le rein puisqu'ils permettent de réduire la progression de l'insuffisance rénale (Breyer et al., 1994; Laffel, McGill, and Gans, 1995; Lewis et al., 1993).

L'Ang II joue ainsi un rôle dans la production de la MEC, par les cellules mésangiales, impliquée dans les phénomènes de réparation lors de pathologies rénales (Dzau, Gibbons, and Pratt, 1991; Griffin et al., 1991).

Les récepteurs de l'Ang II sont exprimés au niveau des :

- Glomérules et sont couplés aux protéines G_{as} et des cellules mésangiales et sont couplés aux protéines G_{aq} avec un rôle dans la synthèse protéique et la mitogenèse (Ernsberger et al., 1992; James et al., 2001; Pfeilschifter, 1990; Skorecki et al., 1983).
- Tubules distaux qui régule l'échangeur des ions sodium/hydrogène (NHE), l'activation de la pompe sodium/potassium-ATPase (NKA), la réabsorption de l'eau et l'activation du NCC (Castaneda-Bueno et al., 2012; Kwon et al., 2005; Liu et al., 2011; San-Cristobal et al., 2009; Sandberg et al., 2007; Turban, Wang, and Knepper, 2003).

3. L'hormone parathyroïdienne (PTH)

Le récepteur de la PTH est exprimé dans la plupart des compartiments rénaux incluant les tubules proximaux et distaux, la portion corticale de la partie large ascendante de l'anse de Henlé, les podocytes et les vaisseaux intra rénaux (Lee et al., 1996). Il exerce une action :

- Régulatrice sur l'absorption des phosphates et du sodium en inhibant le co-transporteur des ions sodium/phosphate (NaPi) et les NHE sur la membrane apicale des tubules rénaux (Biber et al., 2004). Le contrôle du co-transporteur NaPi se fait par le biais de l'activation des voies de signalisation PLC/PKC et AMPc/PKA qui activent les protéines ERK1/2/MAPK responsables de l'internalisation du co-transporteur NaPi et de sa dégradation (Capuano et al., 2007; Pfister et al., 1997) ;

- Négative sur la pompe NKA via l'activation de la voie de signalisation de la PKC α /ERK (Khundmiri et al., 2008; Khundmiri et al., 2004; Khundmiri et al., 2005; Khundmiri and Lederer, 2002)
- Vasodilatatrice sur les artères rénales (Massfelder et al., 1996a; Massfelder et al., 1996b; Roca-Cusachs, DiPette, and Nickols, 1991);
- Proliférative sur les cellules mésangiales et les cellules tubulaires proximales (Bosch et al., 1999; Garcia-Ocana et al., 1995; Garcia-Ocana et al., 1999; Massfelder et al., 2001; Soifer et al., 1993).

4. La dopamine

Le récepteur-1 périphérique de la dopamine (DA1) est localisé au niveau du réseau vasculaire rénal (Kinoshita, Ohlstein, and Felder, 1990). Il induit, via l'activation de la PKA et la réduction du calcium, la relaxation des CML (Cheung et al., 1997). Le récepteur-2 périphérique de la dopamine (DA2) est exprimé au niveau des glomérules et de l'endothélium vasculaire (Felder et al., 1984a; Felder et al., 1984b).

Au niveau des néphrons, la dopamine joue divers rôles :

- Dans les tubules proximaux :
 - ✓ les récepteurs DA1, DA2 et le récepteur-1 central de la dopamine (D1), couplés aux protéines G_{as}, permettent l'inhibition de la pompe NKA par l'activation de la voie de signalisation PKC/PI3K (Aperia, Bertorello, and Seri, 1987; Bertorello and Aperia, 1990; Gomes and Soares-da-Silva, 2002; Pedemonte, Efendiev, and Bertorello, 2005; Satoh, Cohen, and Katz, 1992; Vyas, Eichberg, and Lokhandwala, 1992).
 - ✓ Le récepteur-2 central de la dopamine (D2) active la pompe NKA via la stimulation de la voie de signalisation PKA/MAPK/p44-42 (Hussain, Abdul-Wahab, and Lokhandwala, 1997; Narkar, Hussain, and Lokhandwala, 2002).
 - ✓ La dopamine agit sur l'internalisation du co-transporteur NaPi via l'activation de la voie de signalisation PKA/PKC (Bacic et al., 2005; Weinman et al., 2010) et sur l'activation de la voie de signalisation PLC/PKC/MAPK jouant un rôle dans la libération de calcium intracellulaire (Han et al., 2007).

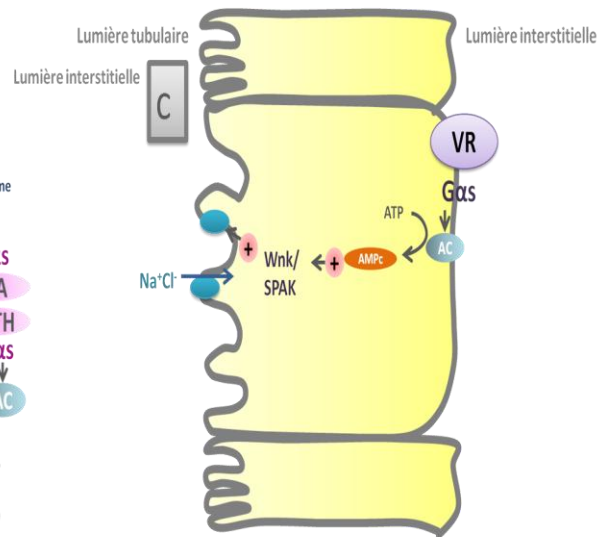
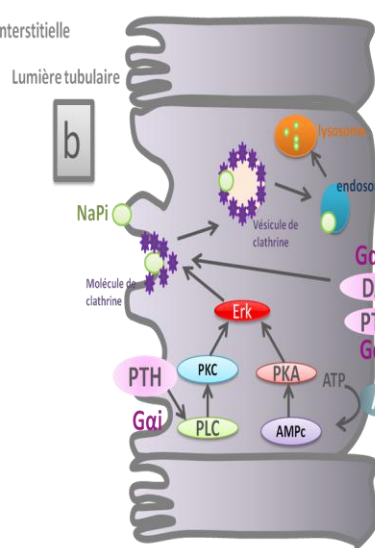
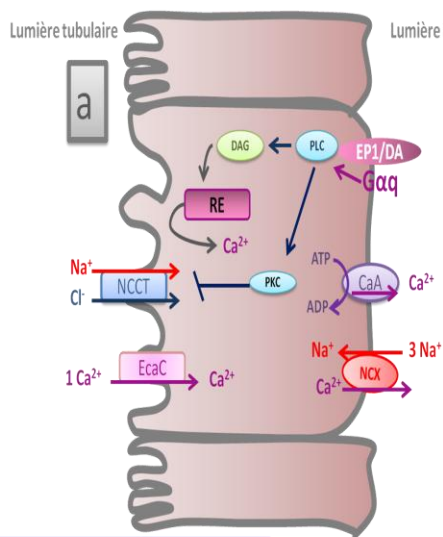
- Au niveau de l'anse de Henlé, la dopamine stimule la pompe des ions sodium/potassium/chlorure (NKCC) via l'activation de la voie de signalisation de la PKA (Aoki et al., 1996).
- Au niveau du tube collecteur, la dopamine agit, via l'activation du récepteur-4 central de la dopamine (D4) couplé à une protéine G_{ai} , en inhibant la réabsorption de l'eau (Li and Schafer, 1998).
- Le récepteur DA1 inhibe également l'échangeur NHE via l'augmentation de l'AMPc (Albrecht et al., 2000; Bacic et al., 2003; Bobulescu et al., 2010; Felder et al., 1990).

5. Les prostaglandines

Ce sont des métabolites de l'acide arachidonique activant de nombreux RCPG :

- Le récepteur des thromboxanes couplé aux protéines $G_{\alpha q/11}$. Par le biais de la libération de calcium et l'activation de la PKC, il permet la vasoconstriction des CML et des cellules mésangiales glomérulaires induisant l'augmentation du débit de filtration glomérulaire (Spurney et al., 1993).
- Les récepteurs 1 et 3 aux eicosanoïdes (EP1 et EP3) couplés aux protéines $G_{\alpha q/11}$ ou $G_{\alpha s}$. L'EP1 est retrouvé au niveau du tube collecteur cortical et inhibe le transport de sodium via la libération de calcium (Hebert, Jacobson, and Breyer, 1991). L'EP3 est exprimé au niveau de la partie ascendante de l'anse de Henlé et permet l'absorption des ions sodium/chlorure (Breyer et al., 1993). L'EP3 permet également au niveau du tube collecteur la réabsorption de l'eau (Bonilla-Felix, 2004).
- Le récepteur des prostacyclines couplé aux protéines $G_{\alpha s}$ ou $G_{\alpha q/11}$. Il est un important vasodilatateur du réseau vasculaire glomérulaire et régulateur de la perméabilité hydrique des cellules épithéliales rénales (Boie et al., 1994; Namba et al., 1994).

Etant donné le large rôle des RCPG dans la physiopathologie cardiaque et rénale, il est important d'identifier de nouveaux RCPG pouvant être impliqués dans la fonction de ces deux organes. L'étude de ces récepteurs pourrait permettre la mise en évidence de nouvelles voies de signalisation permettant le développement de traitements contre les maladies cardio-rénales.



PTH et Ang2
Rôle sur la prolifération des CM

Ang2
Stimule la production de MEC par les CM
La MEC est essentiel aux phénomènes de réparation lors de l'insuffisance rénale

PTH
Vasodilatatrice sur les artères rénales

DA
Vasodilatatrice via l'activation de la voie de signalisation PKA et la réduction du taux de Ca^{2+} intracellulaire

THX
Vasoconstricteur via l'activation de PKC et l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire

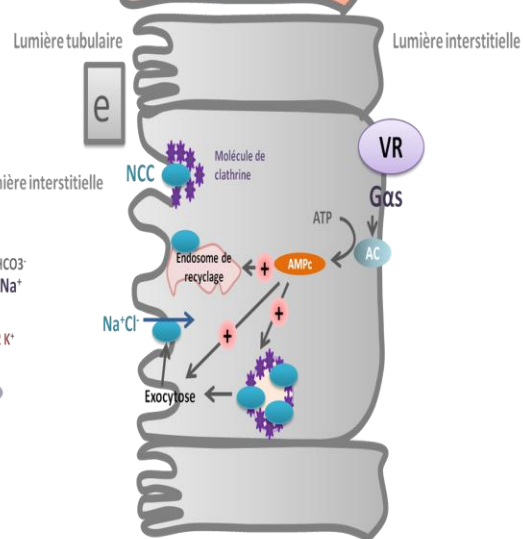
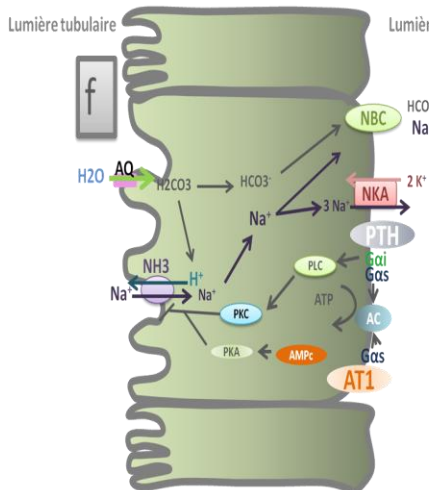
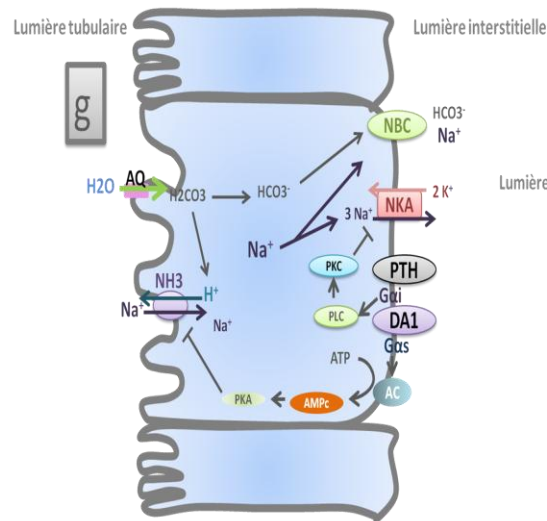
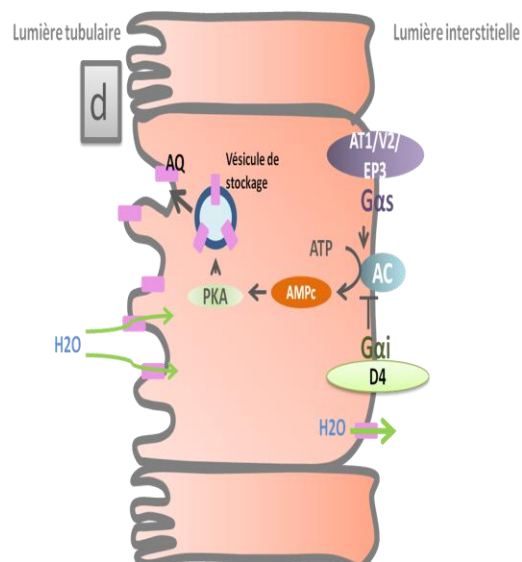
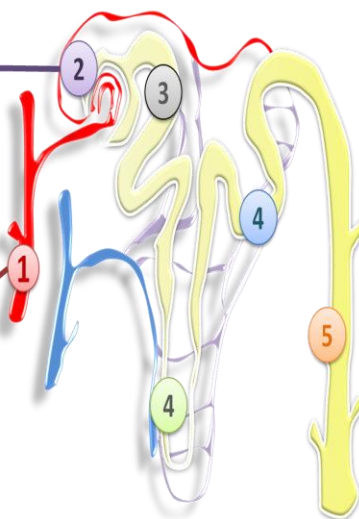


Figure 8. Rôle des RCPG dans la fonction rénale

(1) Réseau vasculaire rénal ; (2) Glomérule; (3) Tubule proximal (TP) (4) Tubule distal (TD); (5) Anse de Henlé (AH) (6) Tube collecteur (TC)

- Voies de signalisation retrouvées au niveau du TC : a : Contrôle négatif et positif, de la recapture apicale et basale du Na^+/Cl^- , respectivement, par les récepteurs DA et EP1 ; b : Contrôle de l'internalisation du co-transporteur NaPi par les récepteurs PTH et DA
- Voies de signalisation retrouvées au niveau du TP : a : cf. ci-dessus ; c : Activation du transport apical du Na^+/Cl^- par les récepteurs VR
- Voies de signalisation retrouvées au niveau de l'AH : d : réabsorption de l'eau par les aquaporines activées par les récepteurs AT1R, V1, EP3 et inhibées par le récepteur D4 ; e : Activation du transport du Na^+/Cl^- par la translocation du co-transporteur NCC contrôlée par le récepteur VR
- Voies de signalisation retrouvées au niveau du TD, TP et HA : f : contrôle négatif par les récepteurs PTH et AT1R, de l'activation de l'échangeur Na^+/H^+ provoquant l'inhibition de la pompe NKA et du co-transporteur NBC ; g : contrôle négatif de l'activité de l'échangeur Na^+/H^+ et de la pompe NKA par les récepteur PTH et DA1

AT1 : récepteur 1 de l'angiotensine 2 ; V2 : récepteur 2 de la vasopressine ; VR : récepteur de la vasopressine ; EP1 et 3 : récepteur 1 et 3 aux eicosanoïdes ; D4 : récepteur central 4 de la dopamine ; DA : récepteur de la dopamine ; PTH : récepteur de l'hormone parathyroïdienne ; THX : récepteur du thromboxane ; NaPi : co-transporteur Na^+/Pi ; NBC : co-transporteur $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$; NKA : co-transporteur Na^+/K^+ ; NHE3 : échangeur Na^+/H^+ ; DA1 récepteur périphérique 1 de la dopamine ; NCX : co-transporteur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; NCC : co-transporteur Na^+/Cl^- ; NBC : Co-transporteur $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$; EcaC : canal calcique épithélial ; AQ : aquaporine ; RE : réticulum sarcoplasmique. ; PLC : phospholipase C ; AC : adénylate cyclase ; PKC : protéine kinase C ; PKA : protéine kinase A.

III. La voie de signalisation des Prokinétines

A. Structures des Prokinétines et de leurs récepteurs

Les prokinétines sont des peptides sécrétés regroupant la prokinétine-1 (PK1) et la prokinétine-2 (PK2), considérées comme homologues chez les mammifères. Ces peptides ont été décrits pour la première fois, chez les mammifères, en 2001 grâce à une similarité de séquence avec la toxine intestinale-1 du serpent mamba (MIT1) et une autre protéine provenant des sécrétions dermiques des grenouilles *Bambina variegata* (Bv8) (Joubert and Strydom, 1980; Li et al., 2001; Mollay et al., 1999). Ainsi, la MIT1 et la Bv8 sont les homologues respectivement de la PK1 et de la PK2 qui sont exprimées chez l'homme. La MIT1 a été décrite comme puissant contractant de l'iléum de cochon d'inde (Schweitz, Bidard, and Lazdunski, 1990; Schweitz et al., 1999) tout comme la Bv8 (Mollay et al., 1999).

La PK1 et la PK2 partagent environ 50% d'homologie de séquences en acides aminés (Bullock, Li, and Zhou, 2004). La PK1 est codée par le chromosome 1p1 chez l'homme et 3 chez la souris alors que la PK2 est codée par le chromosome 3p21.1 chez l'homme et 6 chez la souris. La PK2 est codée par 4 exons et sa forme active comprend 81 acides aminés codés par les exons 1, 2 et 4. Une forme longue de la PK2, dite PK2-L, a été mise en évidence et consiste en l'insertion par un épissage alternatif, après le résidu 47, d'une séquence de 21 acides aminés. Le clivage protéolytique de la PK2-L produit une forme active appelée PK2- β (Chen et al., 2005; Wechselberger et al., 1999).

Les prokinétines font partie de la famille des protéines AVIT qui se caractérisent par une séquence conservée dans le domaine N-terminal nommée AVITGA correspondant aux acides aminés qui la composent. Cette séquence est essentielle à leur activité biologique et se retrouve identique chez plusieurs espèces dont le serpent mamba (Joubert and Strydom, 1980; Schweitz et al., 1999), la grenouille *Bambina variegata* (Mollay et al., 1999), l'homme et les rongeurs (LeCouter et al., 2001; Li et al., 2001; Masuda et al., 2002; Wechselberger et al., 1999). Le domaine C-terminal, modérément conservé, de cette famille de protéines est une séquence de 10 résidus cystéines formant cinq paires de ponts disulfures (Cf. Figure 9) (Boisbouvier et al., 1998; Bullock, Li, and Zhou, 2004; Li et al., 2001).

H1	AVITGACERDVCCSAGTCCASISLWLRGLRMCPTPL	H1	GREGECHPGSHKVPFFR-KRKHHTCCCLPNLIC
R1	AVITGACERDVCCSAGTCCASISLWLRGLRMCPTPL	R1	GREGECHPGSHKIPFFR-KRQHHTCCCLPSLIC
M1	AVITGACERDVCCSAGTCCASISLWLRGLRMCPTPL	M1	GREGECHPGSHKIPFLR-KRQHHTCCCLPSLIC
Mam	AVITGACERDLCCSGKTCCAVSLWIKSVRVCTPV	Mam	GTSGEICHIPASHKIPFSGQRKMHHHTCCCLPNLAC
Bom	AVITGACERDVCCSGTCCASASWSRNIRFCPL	Bom	GNSGEICHIPASHKVPYDG-KRLSSLCCCLKSGLTIC
F1	AVITGACERDVCCSLGLCCAVSLWLRGLRMCAPR	F1	GLEGDECHIPFSHKVPYPG-KRQHHTCCCLPHLVIC
H2	AVITGACDKDSQCCGGMCCAVSIWVKSIRICTPM	H2	GKLGDSCHPLTRKVPFFG-RRMHHTCCCLPGLAC
M2	AVITGACDKDSQCCGGMCCAVSIWVKSIRICTPM	M2	GQVGDSCHPLTRKVPFFG-RRMHHTCCCLPGLAC
R2	AVITGACDKDSQCCGGMCCAVSIWVKSIRICTPM	R2	GQVGDSCHPLTRKVPFFG-RRMHHTCCCLPGLAC
B2	AVITGACDRDPCCGGMCCAVSLWVKSIRICTPM	B2	GKVGDSCHPMTRKVPFLG-RRMHHTCCCLPGLAC
F2	AVITGACDKDSQCCGGMCCAVSLWIRSLRMCPTM	F2	GREGDICHIPMSHTVPFFG-KRLHHTCCCLPNLIC

H1	SRFPDGRYRCMDLKNINF	86
R1	SRFPDGRYRCQDLKNVNF	86
M1	SRFPDGRYRCPRDLKNANF	86
Mam	VQTSPKKFKCLSK	80
Bom	SKSGE-KFKCS	77
F1	TRDRDSKYRCDDDFKNVDLYEVGQTLR	94
H2	LRTSFNRFICLAQK	81
M2	LRTSFNRFICLARK	81
R2	LRTSFNRFICLARK	81
B2	SRTSFNRYTICLAQK	81
F2	IPMDEGRAKCLSTYKYPDYLL	88

Figure 9. Séquence d'acides aminés des protéines de la famille AVITGA de différentes espèces.

H : homme ; R : rat ; M : souris, Mam : serpent black mamba ; Bom : grenouille bambina variegata ; F : fugu. Les numéros désignent le type 1 ou 2 de chaque peptide (Kaser et al., 2003).

-  Séquence AVITGA conservée en N-terminale  Résidu cystéine
-  Nombre d'acides aminés (86 acides aminés pour la PK1 humaine et 81 acides aminés pour la PK2 humaine)

Les prokinétines exercent leurs activités biologiques via deux récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs 1 et 2 des prokinétines (PKR1 et PKR2). Les récepteurs PKR1 et PKR2 sont codés chez l'homme par des gènes localisés sur le chromosome 2p14 et 20p13 respectivement. Ils présentent 85% d'acides aminés identiques et ils diffèrent dans le domaine N-terminal. L'affinité des prokinétines pour leurs récepteurs est différente : la PK2 a une plus forte affinité pour les récepteurs PKR1 et PKR2 que la PK1. Le classement de l'affinité des ligands pour les récepteurs est le suivant :

- Pour PKR1 : PK2>PK2-β≈PK1
- Pour PKR2 : PK2>PK1>PK2-β

Les gènes *Pkr1* et *Pkr2* se composent de 2 exons et codent pour 393 et 384 acides aminés respectivement (Cf. figure 10) (Masuda et al., 2002; Soga et al., 2002).

Figure 10. Alignement des séquences protéiques des récepteurs PKR1 et PKR2. (Soga et al., 2002).

La régulation de l'expression des prokinétines a été décrite dans le système reproductif, les neurones et les macrophages.

Dans le système reproductif, l'expression de la PK1 est régulée positivement par les œstrogènes, la progestérone, les gonadotrophines chorioniques humaines mais également par le facteur inductible par l'hypoxie (HIF1- α) (Ngan et al., 2006; Tiberi et al., 2010).

Dans le bulbe olfactif, l'expression de la PK2 est stimulée par deux facteurs de transcription de type hélice-boucle-hélice (neurognin1 et Mash1) et réprimée par les facteurs de transcription de type homéobox (distal-less homeobox 1 et 2) (Long et al., 2007; Zhang et al., 2007a). Chez les amphibiens, l'expression de la Bv8 est contrôlée par le facteur de transcription « activating-protein 1 » (Marsango et al., 2009).

La PK2 est également capable de réguler positivement l'activité des cellules myéloïdes CD11b⁺Gr1 induite par le facteur stimulant des colonies de granulocytes (C-GSF ou Granulocyte Colony Stimulating Factor) (Shojaei et al., 2007).

B. Activités biologiques des prokinétines

Les prokinétines et leurs récepteurs sont exprimés dans de nombreux tissus incluant les testicules, les ovaires, l'utérus, le placenta, les glandes surrénales, le cerveau, le tractus gastro-intestinal, le cœur et les cellules hématopoïétiques. Il est à noter que ce profil d'expression suggère que les prokinétines jouent un rôle dans de nombreux processus physiologiques ou pathologiques (Cf. Tableau 1).

1. Rôle dans l'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus important régulant les phénomènes liés à la reproduction et à la progression tumorale :

- **Reproduction chez l'homme**

Chez l'homme, l'expression de la PK1 est restreinte aux cellules de Leydig dans les testicules et celle de la PK2 au niveau des spermatocytes I (LeCouter et al., 2003; Wechselberger et al., 1999). Les récepteurs des prokinéticines sont quant à eux exprimés au niveau des cellules endothéliales dérivées des testicules (LeCouter et al., 2003).

La voie de signalisation des prokinéticines est impliquée dans la prolifération et la fenestration (formation de pores dans l'endothélium vasculaire) des cellules endothéliales, formant le lit vasculaire des testicules et dans le transport de la testostérone (LeCouter et al., 2003; Samson et al., 2004).

- **Cycle menstruel**

Par ailleurs, la voie de signalisation des prokinéticines est retrouvée dans l'ovaire, l'utérus et dans divers tissus qui se développent pendant de la grossesse (Battersby et al., 2004; Ferrara et al., 2003; Hoffmann, Feige, and Alfaidy, 2006). Pour sa part, la PK1 est détectée dans les cellules de la granulosa du follicule primaire et dans les cellules de la thèque du follicule de De Graaf (Ferrara et al., 2003). Des études ont ainsi montré le rôle de la PK1 dans la prolifération et la survie des cellules endothéliales du corps jaune (Kisliouk, Podlovni, and Meidan, 2005; Kisliouk et al., 2005). La PK1 est également exprimée par l'épithélium glandulaire, par les cellules endothéliales de l'endomètre et par les cellules endothéliales et CML du myomètre. L'expression de la PK1 dans l'endomètre est hormono-dépendante : elle est régulée par l'action d'hormone dont les œstrogènes et la progestérone. Dès lors, durant la période fertile, l'expression de la PK1 est dépendante des phases du cycle menstruel avec une augmentation graduelle de son expression entre la phase folliculaire et la phase lutéale pour connaître un déclin dans l'étape terminale de la phase lutéale (Kisliouk et al., 2007). A la ménopause la PK1 n'est plus détectée (Battersby et al., 2004; Ngan et al., 2006).

- **Grossesse**

Le système des prokinéticines est également impliqué dans les phénomènes d'implantation durant la grossesse (Evans et al., 2009; Waddell et al., 2011).

Ainsi, chez la femme, la PK1 est localisée dans la couche syncytiotrophoblastique (issue de la différenciation du trophoblaste) entre la 8^{ème} et la 10^{ème} semaine de gestation. Chez la souris, la PK1 et le récepteur PKR1, qui ont une expression maximale jusqu'au jour *post-coïtum* (jpc) 10.5, sont localisés majoritairement dans la chambre intervillieuse alors que le récepteur PKR2

est localisé dans les cellules trophoblastiques et endothéliales (Hoffmann, Feige, and Alfaidy, 2006; Hoffmann, Feige, and Alfaidy, 2007).

La PK1 stimule également la prolifération, la migration, la survie, l'activité vasculaire et la perméabilité des cellules endothéliales microvasculaires du placenta (Brouillet et al., 2010).

L'activation de la PK1 est aussi impliquée dans le développement de l'environnement inflammatoire lors de la gestation et dans l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires (Cook et al., 2010; Evans et al., 2009; Evans et al., 2008; Gorowiec et al., 2011; Maldonado-Perez et al., 2009).

L'expression de la PK1 et de PKR1 est augmentée également lors de l'hypoxie observée pendant la placentation. En concordance avec ces données, les séquences géniques de PK1 et de son récepteur PKR1 possèdent un promoteur reconnu par le facteur de transcription HIF-1 α (Hoffmann, Feige, and Alfaidy, 2006).

Par ailleurs, la gonadotrophine chorionique humaine contrôle l'expression de la PK1, des récepteurs PKR1 et PKR2 sur des explants de placenta et de cellules de trophoblastes (Brouillet et al., 2012; Evans et al., 2009).

Pour finir, la voie de signalisation des prokinétines est également associée aux grossesses extra-utérines et aux fausses-couches (Salker et al., 2010; Shaw et al., 2010; Su et al., 2010).

- **Progression tumorale**

Etant donné le rôle du système des prokinétines dans les phénomènes de reproduction liés à l'angiogenèse, il n'est pas étonnant de voir augmenter le nombre d'études menées pour déterminer le rôle des prokinétines et de leurs récepteurs dans la formation des tumeurs dépendante des mécanismes de l'angiogenèse.

Ainsi, le développement des cancers colorectaux, de la prostate et du testicule est corrélé au profil d'expression des prokinétines qui agissent pour favoriser la néo-vascularisation (Goi et al., 2004; Nagano et al., 2007; Pasquali et al., 2006; Samson et al., 2004).

Une étude relative à l'évolution du neuroblastome démontre que les récepteurs PKR1 et PKR2 sont associés aux différents stades de croissance tumorale et aux métastases. Plus particulièrement, l'activation d'Akt par les prokinétines permet la migration, la prolifération et la survie des cellules de ce cancer (Ngan et al., 2008; Ngan et al., 2007b).

L'expression génique et l'expression protéique de la PK1 sont également augmentées dans les cancers de la thyroïde papillaire (CTP). De plus, dans 60% des échantillons de CTP analysés, l'expression de la PK1 est corrélée positivement avec la mutation du protooncogène BRAF2.

La mutation de ce protooncogène est associée avec le pronostic clinique pauvre des patients atteints de CTP (Pasquali et al., 2011).

Par ailleurs, l'angiogenèse tumorale est dépendante des cellules myéloïdes de la moelle osseuse dont notamment les cellules CD11⁺GR1⁺. La PK2 favorise alors la migration de ce type cellulaire vers la tumeur et ainsi l'expansion de la vascularisation tumorale par le biais de l'activation de la voie STAT3/C-GSF (Qu et al., 2012; Shojaei et al., 2008; Shojaei et al., 2007).

2. Rôle dans l'activité des cellules progénitrices

- **Hématopoïèse et régulation de la réponse immunitaire innée**

Les prokinétines jouent un rôle dans la régulation de l'hématopoïèse et de la réponse immunitaire innée. Ainsi, elles sont retrouvées dans les sites inflammatoires au niveau des cellules myéloïdes dont les macrophages et les neutrophiles et au niveau des cellules lymphoïdes dont les lymphocytes-T (Kisliouk et al., 2007; LeCouter et al., 2004; Monnier et al., 2008). En ce qui concerne les récepteurs, ceux-ci sont exprimés dans les cellules souches hématopoïétiques et les cellules sanguines matures (Dorsch et al., 2005; LeCouter et al., 2004; Monnier et al., 2008).

La PK1 induit ainsi la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en monocytes ou macrophages et la libération de cytokines pro-inflammatoires (Dorsch et al., 2005; Monnier et al., 2008). De plus la PK2 contrôle la fonction, la croissance et la survie des cellules myéloïdes (LeCouter et al., 2004).

- **Neurogenèse du bulbe olfactif**

Le bulbe olfactif, région du cerveau destiné à contrôler les informations olfactives, est soumis à l'addition continue de nouveaux neurones par le biais de phénomènes migratoires des cellules progénitrices neuronales dans la zone migratoire rostrale (ZMR) vers les sites de différenciation. L'implication des prokinétines dans la neurogenèse du bulbe olfactif a été étudiée par la délétion des gènes de la *Pk2* et de *Pkr2* chez la souris. Ainsi, la délétion du gène de la *Pk2* induit une réduction de la taille du bulbe olfactif, une altération de son architecture et l'accumulation des cellules progénitrices neuronales dans la ZMR. Dans le même sens, la

suppression du gène de *Pkr2* a des effets similaires à ceux de l'inactivation de la *Pk2*. De ce fait, elle conduit à : (1) une réduction de la taille du bulbe olfactif principalement reliée à une altération de la prolifération ; (2) un défaut de l'architecture du bulbe olfactif associé à une amplification de l'apoptose ; (3) une altération de la migration des cellules progénitrices neuronales (Ng et al., 2005; Prosser, Bradley, and Caldwell, 2007).

- **Contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules de la crête neurale**

La PK1 est exprimée dans la muqueuse et le mésenchyme de l'intestin d'embryon durant le développement du système nerveux. De plus, son récepteur PKR1 est exprimé dans les cellules de la crête neurale entérique (CCNE). Ainsi, la stimulation du récepteur PKR1 par la PK1 induit l'activation de la voie de signalisation Akt/MAPK provoquant la prolifération et la différenciation des CCNE (Ngan et al., 2007a). Il est important de savoir que le facteur neurotrophique dérivé de la lignée des cellules gliales (GDNF/Ret) est indispensable aux processus de prolifération, de différenciation et de migration des CCNE. Ainsi, il a été démontré que le traitement des CCNE par le GDNF/Ret provoque la surexpression de PKR1. Dans le même sens, l'ablation génique de ce facteur chez la souris a pour conséquence une réduction de l'expression de PKR1 (Ngan et al., 2008). Récemment, une étude a élargi le rôle de la voie de signalisation des prokinétines dans le développement du système nerveux. Ainsi, elle démontre que les récepteurs PKR1 et PKR2 sont exprimés par les CCNE provenant de ganglions entériques d'enfants atteints ou non de la maladie de Hirschprung (affection intestinale caractérisée par l'absence de cellules ganglionnaires dans la sous-muqueuse et dans les plexus myentériques du tube digestif). Cette étude révèle que les récepteurs PKR1 et PKR2 peuvent participer à l'activité des CCNE par l'activation de la voie de signalisation GDNF/Ret (Ruiz-Ferrer et al., 2011).

3. Rôle dans le système nerveux central et périphérique

- **Système nerveux central**

Au sein du système nerveux central, la PK2 et son récepteur PKR2 sont largement exprimés (Cheng et al., 2005; Lambert et al., 2005; Li et al., 2006; Masumoto et al., 2006; Zhang, Truong, and Zhou, 2009).

C'est ainsi que la voie de signalisation PK2/PKR2 est impliquée dans la régulation du cycle circadien et l'activité locomotrice nocturne. Plus précisément, l'expression de la PK2 change au fil des cycles sommeil-éveil avec une forte expression en phase diurne (Cheng et al., 2005; Masumoto et al., 2006; Prosser et al., 2007). La déplétion du gène de la *Pk2* induit chez la souris une réduction de l'activité locomotrice diurne et provoque ainsi le changement de plusieurs paramètres physiologiques dont la baisse des phases de sommeil (Hu et al., 2007; Li et al., 2006). Le contrôle de la locomotion nocturne des souris par la PK2 se fait par le biais de la régulation de l'activité électrique des neurones du noyau supra chiasmatique (Ren et al., 2011).

Dernièrement, des études ont mis en évidence la relation étroite entre l'expression de la PK2 ou de PKR2 et le développement des troubles de l'humeur (Ingves and Ferguson, 2010; Kishi et al., 2009).

L'appétit, autre phénomène régulé lors des cycles biologiques, est également modulé par la PK2. En effet, cette dernière a des effets anorexigènes directement liés à la mélanocortine, hormone agissant sur la réduction de l'appétit (Gardiner et al., 2010).

- **Système nerveux périphérique : sensibilité à la douleur**

Les récepteurs PKR1 et PKR2 se situent dans les ganglions de la racine dorsale de la moelle épinière. Ils jouent un rôle dans la sensibilité à la douleur thermique ou mécanique (Negri et al., 2002).

L'inactivation du gène *Pkr1* permet la réduction de la sensibilité à la douleur lors de stimuli thermiques ou chimiques (Negri et al., 2006). La voie de signalisation PK2/PKR1 joue également un rôle dans la douleur induite par les phénomènes inflammatoires. Ainsi la perte du gène *Pkr1* chez la souris induit une baisse de l'hyperalgésie observée lors de l'inflammation (Giannini et al., 2009).

La PK2 semble également jouer un rôle dans la libération des transmetteurs excitateurs dans la moelle épinière impliqués dans l'hyperalgésie (De Felice et al., 2012). De plus, il a été récemment démontré, chez les cellules neuronales des ganglions de la racine dorsale que la voie de signalisation de la PK2/PKC stimule l'activité des canaux ioniques sensibles aux protons qui jouent un rôle dans l'acidose tissulaire douloureuse lors de l'inflammation (Qiu et

al., 2012). Au niveau de l'intestin cette fois ci, la surexpression de la PK2 a été montrée dans des biopsies provenant de patients atteints de coliques ulcéraives (Watson et al., 2012).

4. Rôle dans le système cardiovasculaire : cardiopathie et AVC

- **Homéostasie cardiaque**

Dans le système cardiovasculaire, la PK2 et ses récepteurs PKR1 et PKR2 sont exprimés dans différents types de cellules dont : les cardiomyocytes, les cellules endothéliales et les cellules progénitrices dérivées de l'épicarde (EPDC). Le système des prokinétines joue donc divers rôles dans le cœur. Plus particulièrement, il a été mis en évidence une balance entre l'action de la voie de signalisation associée au récepteur PKR1 et celle du récepteur PKR2 :

- ✓ **Homéostasie des cellules endothéliales cardiaques : PKR1 versus PKR2**

Le traitement par la PK2 des cellules endothéliales cardiaques induit, via PKR1, la formation de structures en forme de tube apparentées aux vaisseaux sanguins sans pour autant induire l'expression du VEGF (Urayama et al., 2007). De plus dans ces mêmes cellules, le récepteur PKR1 est couplé aux protéines $G_{\alpha 11}$. Son activation permet ainsi la stimulation de la voie de signalisation MAPK/Akt qui initie la prolifération, la migration et l'angiogenèse des cellules endothéliales (Guilini et al., 2010).

A contrario, la surexpression du gène *Pkr2* spécifiquement au niveau des cardiomyocytes provoque de façon paracrine un changement de la structure des cellules endothéliales et une désorganisation des jonctions cellulaires de type zona occludens-1 (ZO-1), impliquant une augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales (fenestration) (Urayama et al., 2009). Par ailleurs, la surexpression du gène *Pkr2* dans les cellules endothéliales, induit quant à elle la fenestration des cellules via un couplage de PKR2 aux protéines $G_{\alpha 12}$ liés aux jonctions cellulaires ZO-1 (Guilini et al., 2010).

- **Néo-vascularisation et rôle cardio-protecteur : PKR1 versus PKR2**

La voie PK2/PKR1 protège les cardiomyocytes des effets de l'hypoxie par l'activation de la voie de signalisation Akt. Un transfert du gène *Pkr1* réduit la mortalité et maintient la fonction du ventricule gauche en stimulant la néo-vascularisation et la survie des cardiomyocytes. De plus, chez les patients insuffisants cardiaques, le niveau d'expression des gènes et protéines de PK2 et PKR1 est considérablement diminué (Urayama et al., 2007). Dans le même sens, la surexpression du gène *Pkr1*, spécifiquement au niveau des cardiomyocytes, provoque une induction de la néo-vascularisation. Ce processus est activé via une régulation positive de la PK2 qui agit de façon paracrine sur les EPDC pour induire leur prolifération et leur différenciation en CML et cellules endothéliales (Urayama et al., 2008).

A l'inverse, la voie de signalisation du récepteur PKR2 a des effets délétères sur la fonction cardiaque. En effet, la surexpression de *Pkr2*, spécifiquement au niveau des cardiomyocytes, entraîne des phénomènes hypertrophiques révélés par l'augmentation de la taille des cardiomyocytes, la surexpression des gènes impliqués dans l'hypertrophie et l'augmentation des dimensions des chambres cardiaques durant les phases de systole et de diastole (Urayama et al., 2009).

- **Accident vasculaire cérébrale**

Un tout autre rôle des prokinétines, notamment de la PK2, a été découvert dans l'ischémie induite par les accidents vasculaires cérébraux (AVC). En effet, dans un modèle animal d'AVC, l'expression de la PK2 est induite dans les zones du cortex atteintes d'ischémie. Par ailleurs, l'injection centrale de la PK2 aggrave la taille de la zone ischémique alors qu'un antagoniste du récepteur de la PK2 provoque une réduction de cette zone et une diminution de l'inflammation engendrée par l'AVC. Cette étude révèle ainsi un rôle délétère de la PK2 dans la propagation de l'ischémie induite par les AVC (Cheng et al., 2012).

5. Rôle des prokinétines dans la pathogenèse de certaines maladies chez l'homme

Le syndrome de Kallman est l'une des pathologies dans laquelle la voie de signalisation des prokinétines est affectée. Il s'agit d'une maladie se décrivant par un trouble de l'odorat du à

un défaut de développement du bulbe olfactif et un hypogonadisme. Des mutations des gènes de la *Pk2* et de *Pkr2* ont récemment été identifiées comme susceptibles d'intervenir dans ce syndrome (Abreu et al., 2008; Canto et al., 2009; Cole et al., 2008; Dode et al., 2006; Leroy et al., 2008; Pitteloud et al., 2007; Sarfati et al., 2010).

Dans la maladie de Hirschsprung, la régulation négative du GDNF/Ret, responsable du développement de la pathologie, pourrait être compensée par la PK2 (Ngan et al., 2008).

Les prokinéticines sont des facteurs impliqués dans des processus cellulaires incluant la prolifération, la migration et la différenciation de divers types cellulaires. Entre autres, il a été montré leur implication dans les phénomènes cellulaires propres aux EPDC, cellules progénitrices essentielles au développement cardiaque. Ainsi, nous décrirons par la suite, les phénomènes clés de l'embryogenèse cardiaque impliquant les EPDC et le développement du myocarde et des vaisseaux coronaires.

Tableau 1. Voie de signalisation des prokinétines : fonctions biologiques et pathologies associées

Système	Fonctions biologiques	Pathologies associées	Référence
Tractus gastro-intestinal	Contraction des CML		Li et al. 2001, Goi et al. 2004, Ngan et al. 2008
	Développement du système nerveux entérique	Maladie de Hirschprung	
	Angiogenèse	Cancer colorectaux	
Ovaire	Angiogenèse	Syndrome ovarien polycystique	
Testicule	Angiogenèse	Cancer des testicules	Wechselberger et al. 1999, Lecouter et al. 2003, Samsom et al. 2004
Prostate	Angiogenèse	Cancer de la prostate	Nagano et al. 2007, Pasquali et al. 2006
Endomètre	Angiogenèse		Battersby et al. 2004, Ngan et al. 2006
Placenta	Différenciation des trophoblastes		Hoffmann et al. 2006
Glandes surrénales	Angiogenèse	Neuroblastome	Ngan et al. 2007, 2008
Bulbe olfactif	Morphogenèse du bulbe olfactif	Syndrome de Kallman	Abreu et al. 2008, Canto et al., 2009, Cole et al., 2008, Dode et al., 2006, Leroy et al., 2008, Pitteloud et al., 2007; Sarfati et al., 2010
Cellules souches hématopoïétiques	Réponse immunitaire	Angiogenèse tumorale	Shojaei et al. 2007, 2008, Kisliouk et al. 2007, Lecouter et al. 2004, Monnier et al. 2008, Dorsch et al. 2005
Ganglions de la racine dorsale	Nociception	Hyperalgésie	Negri et al. 2002, 2006, Giannini et al. 2009
Cœur	Survie des cardiomyocytes	Défaillance cardiaque	Urayama et al. 2007, 2008, 2009
Cerveau	Angiogenèse	Accident vasculaire cérébral	Guilini et al. 2010 Cheng et al. 2012
Système nerveux central	Cycle circadien	Troubles de l'humeur	Chen et al. 2005, Masumoto et al. 2006, Prosser et al. 2007, Hu et al. 2007, Li et al. 2006, Ingves et al. 2010, Kishi et al. 2009, Gardinier et al. 2010, Koyaman et al. 2006, Ng et al. 2005, Puverel et al. 2009

IV. Les cellules progénitrices de l'épicaarde : Origine, organisation et fonction

A. Origine de l'épicaarde : du proépicaarde vers l'épicaarde

1. Les premiers stades de l'embryogenèse cardiaque

Le cœur est le premier organe à se former durant les premiers stades de l'embryogenèse. Son développement comprend la succession de phases complexes mettant en jeu des types cellulaires variés. La première, chez l'embryon de souris, commence au jpc 7.5 et concerne la migration au niveau de la ligne primitive de cardiomyocytes à partir du mésoderme splanchnopleurale qui se déplacent de façon antérolatérale pour donner naissance à deux régions cardiogéniques bilatérales. Des cellules endothéliales, sous-jacentes à ces plaques cardiogéniques se différencient pour former les tubes endocardiques gauches et droits. Au jpc 8.0 ces tubes fusionnent pour donner naissance au tube cardiaque (DeRuiter et al., 1992; Kaufman and Navaratnam, 1981). Celui-ci est constitué d'une couche de cellules myocardiques et d'une couche de cellules endocardiques qui sont séparées par une matrice acellulaire appelée « gelée cardiaque » (Dehaan, 1964; Kaufman and Navaratnam, 1981). Entre le jpc 8.5 et le jpc 10.5, le tube cardiaque subit une courbure vers la droite et se compose ainsi de trois régions distinctes, incluant le bulbe aortique, le ventricule gauche primitif, l'atrium primitif (Cf. figure 11) (Chalice and Viragh, 1974). Par la suite une partie des cellules endocardiques du canal atrio-ventriculaire et du bulbe aortique subissent une transformation épithéliale-mésenchymateuse. Cette dernière implique le détachement des cellules endocardiques et s'accompagne par un changement de la structure du cytosquelette, la dégradation de la lame basale et la migration des cellules mésenchymateuses dérivées de l'endocarde au niveau de la gelée cardiaque. Ce processus permet la formation d'une couche mésenchymateuse (Icardo, 1989; Markwald RR, 1965).

Après ces événements cellulaires, le tube cardiaque est constitué de trois couches, l'une regroupant les cardiomyocytes, l'autre l'épithélium endocardique et la dernière correspondant au mésenchyme sous-endocardique (jpc 9.25). A ce stade de l'embryogenèse cardiaque, une nouvelle source de cellules extracardiaques peuple la surface du cœur pour former une couche de cellules épithéliales dite épicaarde (Viragh and Chalice, 1981).

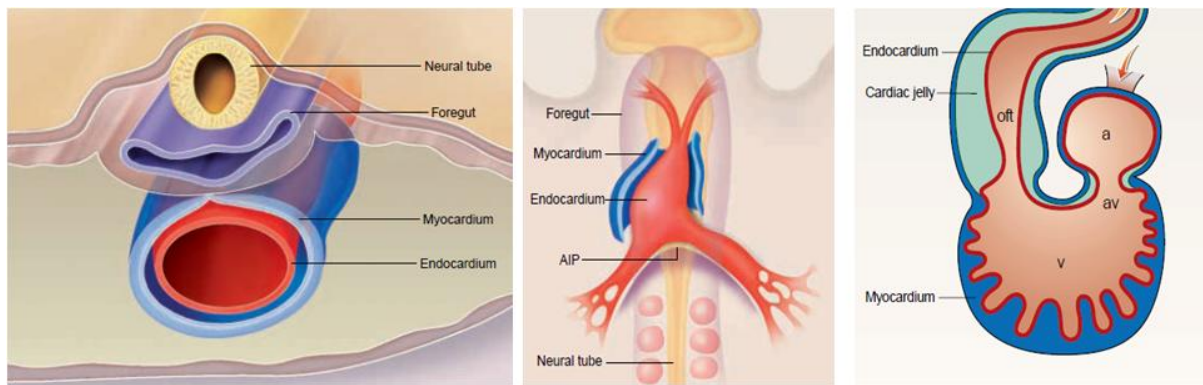


Figure 11. Formation et plicature du tube cardiaque (Fishman and Chien, 1997)

2. Des ébauches pro-épicaudiques à la formation de l'épicaudique

a. Formation du proépicaudique

L'épicaudique est la couche tissulaire recouvrant le cœur et a comme origine une source cellulaire extracardiaque : le proépicaudique. Il a longtemps été pensé que l'épicaudique, appelé autrefois « épimyocarde », n'avait comme unique fonction que la protection du cœur et comme unique origine le myocarde. Kurkiewicz, en 1909, est le premier à avoir émis l'hypothèse que l'épicaudique ne provenait pas du myocarde mais possédait une origine extracardiaque qui correspondait à une source cellulaire de la région du sinus veineux qui après migration donnait lieu à la formation de l'épicaudique chez l'oiseau.

Toujours chez l'oiseau, en 1969 Manasek, par le biais d'une étude plus détaillée, confirme l'hypothèse émise par son prédécesseur Kurkiewicz (Manasek, 1969). Par la suite, grâce à l'utilisation du microscope électronique, Ho et Shimada, décrivent l'épicaudique, chez l'oiseau, comme dérivant d'une source de cellules mésothéliales du sinus veineux (Ho and Shimada, 1978).

Chez la souris, il faut attendre 1973 pour qu'une première étude démontre également une origine extracardiaque de l'épicaudique, plus précisément une source de cellules de la somatopleure du septum transversum (Viragh and Challice, 1973).

Ainsi, le proépicaudique est retrouvé à la surface du septum transversum chez les mammifères et est décrit comme une protusion multicellulaire. Les ébauches du proépicaudique commencent à se former au jpc 8.5 au niveau de la partie gauche et droite du sinus veineux. Les deux

ébauches pro-épicaudiques sont alors constituées de cellules mésothéliales présentant une structure en forme de « doigts » au niveau de leurs pôles apicaux. Entre le jpc 8.5 et le jpc 9.5, les ébauches pro-épicaudiques se développent et migrent au niveau de la ligne médiane de l'embryon pour ne former qu'une seule structure pro-épicaudique. Au jpc 9.5, le proépicaud, possédant un aspect en forme de vésicule, est totalement formé et retrouvé au niveau de la surface péricardique du septum transversum. Entre les jpc 9.5 et 10.5, les agrégats cellulaires du proépicaud sont libérés sous forme de vésicules et migrent au niveau de la surface du myocarde pour donner naissance à l'épicaud (Schulte et al., 2007) (Cf. figure 12). A noter que le proépicaud, à son stade de développement précoce, n'exprime pas les marqueurs des cellules endothéliales différenciées ou de leurs précurseurs, ou encore les marqueurs des fibroblastes et CML (Ratajska, Czarnowska, and Ciszek, 2008).

Figure 12. Proépicaud : localisation et migration au niveau de la surface cardiaque (Mercader, 2009)

b. Marqueurs génétiques du proépicaud

Nous décrivons ci-après neuf facteurs ayant un rôle régulateur dans la formation du proépicaud :

- **WT1 et TBX18**

Dès le jpc 9.5, lors de la fusion des deux ébauches bilatérales, les facteurs de transcription de la tumeur de Wilm-1 (WT1 ou Wilm's Tumor-1) et T-box 18 (TBX18) sont exprimés. Ils sont présents non seulement tout le long du développement du proépicaud mais également pendant et après la formation de l'épicaud (Schulte et al., 2007; Zeng et al., 2011).

- **BMP-2 et BMP-4**

La protéine Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) est un autre facteur de transcription retrouvé au niveau du sinus veineux au jpc 8.5 tandis que le BMP-4 est lui détecté, plus

faiblement, au niveau des deux ébauches pro-épicaudiques. Lors de la formation du pro-épicaud mature, entre les jpc 9.0 et 9.5, les deux facteurs BMP-2 et BMP-4 sont localisés au niveau de la paroi ventrale du sinus veineux avoisinant les vésicules du pro-épicaud (Schulte et al., 2007). Chez l'embryon de poulet, l'inhibition des voies de signalisation, régies par le BMP-2 et le BMP-4, provoque une altération de la formation des protusions du pro-épicaud et de l'attachement des cellules pro-épicaudiques à la surface du cœur (Ishii et al., 2010).

- **NKX2.5 et ISL1**

Les facteurs de transcription NKX2.5 et ISL1 ne sont pas exprimés par le pro-épicaud mais jouent un rôle dans son développement. Ainsi, afin de suivre l'expression des facteurs NKX2.5 ou ISL1, au cours du développement du cœur, des souris qui expriment la recombinaison Cre sous le contrôle du promoteur *Nkx2.5* ou *Isl1* ont été croisées avec des souris R26R (qui contiennent un gène *LacZ* modifié ne pouvant générer une protéine β -Galactosidase active qu'après action de la recombinaison Cre). Il ressort de cette étude que les cellules du pro-épicaud sont marquées par la β -galactosidase démontrant que les précurseurs NKX2.5⁺ et ISL1⁺ contribuent au développement du pro-épicaud. La délétion du gène *Nkx2.5* entraîne un défaut de croissance du pro-épicaud et une réduction de l'expression de *Wt1*. Elle conduit ainsi à l'apparition d'anomalies cardiaques mettant en évidence que le gène *Nkx2.5* est nécessaire au développement du pro-épicaud (Zhou et al., 2008b).

- **GATA-5 et GATA4**

Le facteur de transcription GATA-5 est retrouvé au jpc 9.5 au niveau du septum transversum et des dérivés du pro-épicaud (MacNeill et al., 2000). Cependant, l'ablation totale du gène *Gata5* n'entraîne pas d'anomalies de développement cardiaque. Cela étant principalement dû à une compensation de l'expression de *Gata5* par une surexpression de *Gata4* (Singh et al., 2010). Au contraire, l'inactivation simultanée des gènes *Gata4* en hétérozygote et *Gata5* en homozygotes conduit à une mort embryonnaire au jpc 12.5 due à un défaut du développement cardiaque. La perte des gènes *Gata4* et *Gata5* en double hétérozygotes est à 30% létale et favorise l'apparition d'anomalies structurales cardiaques au jpc 15.5 (Lafont et Nemer, 2011).

- **T-box 5 (TBX5)**

La balance d'expression du facteur TBX5 joue un rôle dans la migration des cellules du proépicarde vers l'épicarde. En effet, la surexpression du gène *Tbx5* dans le proépicarde d'embryon de poule au stade 16-18 de Hamburger et Hamilton et son inhibition sur des explants de proépicarde provoquent le blocage de l'incorporation des cellules du proépicarde au niveau de la surface cardiaque. La régulation négative de TBX5, lors de la migration des cellules du proépicarde vers l'épicarde, agit positivement sur l'expression du facteur TBX20, jouant également un rôle dans la cardiogenèse (Hatcher et al., 2004; Plageman and Yutzey, 2004).

c. Développement de l'épicarde

i. Adhérence et expansion des cellules du proépicarde à la surface du cœur

Nous avons pu voir qu'entre les jpc 9.5 et 10.5, les agrégats cellulaires du proépicarde atteignent la surface du myocarde sous forme de vésicules pour permettre la mise en place de l'épicarde (Viragh and Challice, 1981). Elles rejoignent par la suite la surface dorsale du cœur pour s'attacher et migrer tout le long du cœur en formation par le biais de leur prolifération. A la fin du 11^{ème} jour embryonnaire, le cœur est totalement recouvert par l'épicarde (Ratajska, Czarnowska, and Ciszek, 2008).

Quatre principaux facteurs sont impliqués dans l'adhésion de l'épicarde à la surface du myocarde et dans son expansion : le facteur de transcription epicardin (encore appelé TCF21, capsuline ou POD-1), WT1, VCAM-1 (Vascular Cells Adhesion Molecule-1) et l' α -4-intégrine.

Ainsi, la protéine epicardin est un facteur de transcription de type hélice-boucle-hélice exprimé tout au long du développement de l'épicarde. Les facteurs de transcription à motif boucle-hélice-boucle sont connus pour leurs implications dans la spécification cellulaire, la différenciation et la morphogenèse de différents tissus lors du développement. Il a été démontré que le facteur epicardin est exprimé à partir du jpc 9.5 dans la région comportant les cellules du proépicarde (Hidai et al., 1998; Lu, Richardson, and Olson, 1998). De plus au jpc 10.5, les cellules recouvrant la surface cardiaque expriment également le marqueur epicardin

(Lu, Richardson, and Olson, 1998). L'inactivation du gène *Epicardin* chez la souris entraîne la formation d'anomalies morphologiques de l'épicarde accompagnées de rupture de la vascularisation (Braitsch et al., 2012).

L'ablation du gène *Wt1* chez la souris conduit également à des anomalies développementales de l'épicarde caractérisées principalement par une réduction des cellules mésenchymateuses du sous-épicarde (Moore et al., 1999).

VCAM-1 est exprimé dans le myocarde alors que l' α -4-intégrine l'est dans l'épicarde. Ce profil d'expression démontre une complémentarité entre les 2 facteurs et leurs rôles dans la stabilisation et la migration des cellules du proépicarde au niveau du cœur en formation (Yang, Rayburn, and Hynes, 1995). L'ablation du gène *Vcam-1* ou de l' α -4-intégrine chez la souris conduit à une létalité embryonnaire due au manque de développement de l'épicarde et des coronaires (Kwee et al., 1995; Yang, Rayburn, and Hynes, 1995). Une étude supplémentaire sur la délétion du gène de l' α -4-intégrine révèle son rôle dans l'attachement, l'expansion et le maintien des cellules de l'épicarde (Sengbusch et al., 2002).

ii. Transformation épithéliale-mésenchymateuse des cellules de l'épicarde

Les cellules nouvellement adhérentes et formant l'épicarde sont considérées comme des cellules de type épithéliales au vu de l'expression du marqueur cytokératine (Vrancken Peeters et al., 1995). Elles n'expriment pas les marqueurs des cellules endothéliales ou de leurs précurseurs (CD34, CD45, PECAM-1 ou Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1, récepteurs 1 et 2 du VEGF) (Ratajska, Czarnowska, and Ciszek, 2008). Un groupe de cellules dérivées de l'épicarde migre sous celui-ci pour donner naissance, après transformation épithéliale-mésenchymateuse (EMT ou Epithelial-Mesenchymal Transition) à des cellules mésenchymateuses non différenciées nommées EPDC. Ce phénomène provoque une perte du caractère épithélial des cellules de l'épicarde. Les facteurs de transcription SNAIL et SLUG régulent l'EMT et le développement des attributs mésenchymateux des cellules de l'épicarde. Ils inhibent la molécule d'adhésion intercellulaire, l'E-cadhérine, qui joue un rôle dans le maintien du caractère épithélial des cellules de l'épicarde (Thiery and Sleeman, 2006). Différents facteurs ont un rôle dans l'EMT subit par les cellules de l'épicarde, dont :

- **Le facteur de transcription epicardin**

L'inactivation du gène *Epicardin*, chez la souris, cause un défaut de l'EMT caractérisé par une régulation négative des gènes *Slug* et *Snail* (Acharya et al., 2012).

- **La podoplanine**

La podoplanine est une glycoprotéine exprimée dans les cellules épithéliales et mésothéliales incluant les cellules délimitant la cavité péricardique (Gittenberger-de Groot et al., 2007; Wetterwald et al., 1996). L'inactivation du gène *Podoplanine* chez la souris cause un défaut de développement cardiaque dû à des anomalies de l'expansion de l'épicarde et de l'EMT via une surexpression de l'E-cadhérine (Mahtab et al., 2008).

- **WT1**

L'expression de WT1 n'est décelée qu'au niveau de l'épicarde (Moore et al., 1999; Zhou et al., 2008a) et les cellules WT1⁺ subissent l'EMT pour donner naissance aux cellules mésenchymateuses qui envahissent le myocarde (Zhou et al., 2008a; Zhou et al., 2010). La délétion du gène *Wt1* conduit à une altération du développement cardiaque par une perte de l'EMT des cellules de l'épicarde (Ijpenberg et al., 2007; Martinez-Estrada et al., 2010; Moore et al., 1999).

Deux études indépendantes ont dévoilé un rôle différent de WT1 dans l'EMT : l'équipe de Martinez-Estrada démontre que la délétion du gène *Wt1* conduit à une surexpression du gène de l'E-cadhérine et à une inhibition de l'EMT épocardique par la régulation négative des gènes *Slug* et *Snail* (Martinez-Estrada et al., 2010). L'équipe de Von Gise révèle que la délétion du gène *Wt1* n'entraîne aucun changement sur l'expression de l'E-cadhérine mais conduit à la baisse de l'expression de *Slug* et *Snail* (von Gise et al., 2011). Ces deux études sont différentes par le modèle expérimental employé : l'équipe de Martinez-Estrada, utilise une lignée cellulaire épocardique isolée de cœurs de souris au jpc 11.5 ; l'équipe de Von Gise utilise des cellules épocardiques isolées au jpc 13.5. Il est aisé de penser que l'EMT est un phénomène complexe pouvant être régulé par diverses voies de signalisation et de façon temporelle. En effet, il a été démontré que l'expression du marqueur *epicardin* est confinée à l'épicarde jusqu'au jpc 12.5 et c'est à partir du jpc 13.5 que son expression est retrouvée au niveau du myocarde (Acharya et al., 2012). Ainsi, juste avant l'invasion du myocarde par les EPDC au jpc 11.5, l'équipe de Martinez-Estrada démontre la régulation de l'EMT par la voie

WT1/E-cadhérine/SLUG/SNAIL. Il est possible que cette voie de signalisation soit impliquée dans l'initiation de l'EMT. Par la suite au moment où les EPDC envahissent le myocarde, au jpc 13.5, l'équipe de Von Gise met en avant le rôle des voies WT1/ β -caténine et WT1/ acide rétinoïque dans ce processus.

- **La β -caténine et son contrôle par WT1**

La β -caténine est un facteur essentiel à l'EMT (Thiery and Sleeman, 2006). La délétion du gène β -caténine spécifiquement au niveau de l'épicarde induit une altération de la formation du sous-épicarde, un défaut de l'EMT des cellules de l'épicarde, la réduction des marqueurs mésenchymateux et la l'altération de l'invasion des EPDC au sein du myocarde (Zamora, Manner, and Ruiz-Lozano, 2007).

Concernant le lien WT1/ β -caténine, il a été prouvé que la β -caténine est régulée négativement chez les souris chez lesquelles le gène *Wt1* est inactivée, (Martinez-Estrada et al., 2010). Confirmant ces données, une étude récente a mis en avant que WT1 est régulateur essentiel de la voie des β -caténines (von Gise et al., 2011).

- **L'acide rétinoïque et son contrôle par WT**

Concernant lien entre la voie de l'acide rétinoïque et WT1, il a été montré chez les souris chez lesquelles le gène *Wt1* est inactivée, la réduction de l'expression de l'acide rétinoïque sans doute en partie responsable du phénotype cardiaque observé chez ces souris mutante (von Gise et al., 2011). En effet, cette même étude révèle que le traitement à l'acide rétinoïque des mères gestantes portant la mutation nulle du gène *Wt1*, entre les jpc 10.5 et 13.5, restaure partiellement l'EMT des cellules de l'épicarde (von Gise et al., 2011). Une autre étude met aussi en évidence que WT1 contrôle de façon spatio-temporel le Rétinaldéhyde Déshydrogénase-2 (RALDH2), enzyme impliquée dans la synthèse de l'acide rétinoïque et confinée au niveau de l'épicarde (Moss et al., 1998). Elle met en avant également que le promoteur du gène *Raldh2* possède des sites de liaison correspondant à WT1 démontrant une interaction de la protéine WT1 avec le gène *Raldh2* (Guadix et al., 2011).

- **Les facteurs de croissance**

Les facteurs de croissance FGF (Fibroblast Growth Factor) et PDGF (Platelet Derived Growth Factor) sont également des stimulateurs de l'EMT (Fedorova et al., 2009; Molin et al., 2003; Pennisi and Mikawa, 2009). Ainsi, la délétion du gène codant pour *Pdgfr* au niveau de l'épicarde, induit un défaut de l'EMT des cellules de l'épicarde via la réduction de l'expression des gènes mésenchymateux et la surexpression des gènes maintenant le caractère épithélial (Smith et al., 2011). De la même manière, la perte du gène codant pour le récepteur *Tgfβ1* (*Transforming Growth Factor β1*)/*Alk5*, au niveau de l'épicarde, induit un défaut d'attachement de l'épicarde à la surface du myocarde au jpc 12. Ce phénomène est expliqué par l'augmentation de l'expression membranaire de la jonction cellulaire ZO-1, dont la translocation dans le cytoplasme est caractéristique de l'EMT (Polette et al., 2007) (Sridurongrit et al., 2008). A l'inverse, une étude a également révélé le rôle inhibiteur du TGF-β sur l'EMT des cellules de l'épicarde, en démontrant que le TGF-β3, synthétisé par le myocarde, agit pour inhiber l'EMT des cellules épocardiques et les contenir au niveau de l'épicarde (Morabito et al., 2001).

- **Les érythropoïétines**

Les érythropoïétines, hormone glycoprotéique, sont exprimées uniquement au niveau de l'épicarde et de l'endocarde. L'inactivation du gène *Erythropoïétine*, chez la souris, provoque un défaut de développement de l'épicarde, l'altération de la formation des vaisseaux coronaires et l'amincissement considérable des parois ventriculaires du myocarde (Wu et al., 1999b).

- **Neurofibromine-1**

Il a été récemment démontré l'implication du facteur de la neurofibromine-1 (NF1) dans le développement de l'épicarde. Il est à noter que la protéine NF1 joue un rôle dans la cardiogenèse puisque son inactivation chez la souris induit l'altération de la formation des parois ventriculaires (Brannan et al., 1994) alors que sa surexpression au niveau des cardiomyocytes provoque le développement d'une hypertrophie pathologique suivie d'une défaillance cardiaque (Xu et al., 2009). La délétion du gène *Nf1* chez la souris, spécifiquement au niveau de l'épicarde, conduit à l'induction précoce de l'EMT des cellules épocardiques. Ce phénomène est expliqué par une augmentation de l'expression des gènes mésenchymateux, une réduction des gènes épithéliaux et une réduction des jonctions cellulaires. La protéine

NF1 semble également régulé négativement l'EMT en inhibant l'activation de la voie de signalisation PDFGR α /ERK qui est essentiel à ce processus (Baek and Tallquist, 2012).

- **Les microRNA (miRNA)**

Les miRNA sont des courtes séquences d'ARN double brin synthétisées par l'endonucléase Dicer (Bernstein et al., 2003) et dont l'importance a été montrée dans la cardiogenèse. Ainsi, l'inactivation de Dicer, spécifiquement au niveau des progéniteurs cardiaques, par l'utilisation de la recombinaise Cre liée au promoteur *Nkx2.5*, provoque des anomalies cardiaques caractérisées par une altération du développement de la paroi ventriculaire et par une hémorragie du péricarde (Zhao et al., 2007). L'inactivation de *Dicer*, au niveau de l'épicarde, provoque une altération de l'EMT des cellules de l'épicarde caractérisée par le maintien de l'expression membranaire de la jonction cellulaire ZO-1, par une réduction de l'expression de *Snail* et une augmentation de l'expression de l'*E-cadhérine* (Singh et al., 2011).

iii. Migration des EPDC au sein du myocarde

Au cours de la formation de l'épicarde, les EPDC ayant subi une EMT migrent à travers le sous-épicarde pour envahir le myocarde. Cette invasion du myocarde par les EPDC est une étape clé permettant le bon déroulement de la cardiogenèse. Les phénomènes migratoires des EPDC, au sein du myocarde, ont récemment été décrits par le biais du marquage des cellules WT1⁺, TBX18⁺ et epicardin⁺ composants l'épicarde, à l'aide des croisements utilisant les souris R26R.

Ainsi, une première étude démontre que les cellules WT1⁺ sont confinées à l'épicarde jusqu'au jpc 12.5, moment où elles commencent à être présentes au niveau du septum inter-ventriculaire, du ventricule gauche et droit. Les cellules WT1⁺ sont retrouvées, au jpc 12.5, au niveau de la zone compacte du myocarde et au jpc 13 et 14 au niveau des zones compactes et intermédiaires du myocarde. A partir du jpc 17, ces cellules commencent à peupler la zone trabéculaire du myocarde (Moore et al., 1999; Zeng et al., 2011) (Wessels et al., 2012).

Les cellules TBX18⁺ sont présentes au niveau de l'épicarde à partir du jpc 10.5 et sont retrouvées dans le septum inter-ventriculaire et le ventricule gauche à partir du jpc 11.5 mais également dans le ventricule droit à partir du jpc 14.5 (Zeng et al., 2011).

Concernant les cellules epicardin⁺, elles sont retrouvées dans l'épicaarde jusqu'au jpc 12.5 puis dans le myocarde à partir du jpc 13.5 (Acharya et al., 2012).

Divers facteurs jouent un rôle dans les phénomènes migratoires des EPDC au sein du myocarde, dont :

- **Le facteur epicardin :**

L'inactivation du gène *Epicardin* chez la souris provoque une perte des capacités de migration des cellules de l'épicaarde dans le myocarde (Acharya et al., 2012).

- **Le facteur NFATC1 (Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1)**

L'expression du facteur NFATC1 est cytoplasmique au niveau du proépicaarde et des EPDC alors qu'elle est confinée au niveau du noyau chez les cellules épithéliales formant l'épicaarde. Cette différence de localisation de l'expression du facteur NFATC1 démontre principalement qu'il est actif au niveau des cellules du proépicaarde et des EPDC qui acquièrent des capacités migratoires. La perte du gène *Nfatc1* au niveau de l'épicaarde provoque une létalité embryonnaire entre les jpc 17.5 et 18.5 liée à une réduction de l'entrée des EPDC dans le myocarde. Il semblerait que le contrôle de ce processus, par le facteur NFATC1, se fasse par le biais de l'activation de la voie de signalisation dépendante de la calcineurine permettant la dégradation de la MEC (Combs et al., 2011).

- **Les facteurs de croissance**

La voie de signalisation FGFR1/p44/42 MAPK/STAT1 est nécessaire à l'invasion des EPDC dans le myocarde. Pour le démontrer, une équipe a utilisé des explants cardiaques de caille traités par un ADN codant pour le récepteur *Fgfr1* actif lié à une séquence *LacZ* ou par un ADN comportant la séquence *LacZ* seule. Ainsi, pour les explants cardiaques contrôles, l'étude démontre la présence de cellules β -galactosidase⁺ en forte proportion au niveau de l'épicaarde et du sous-épicaarde alors qu'elles sont en faible proportion dans le myocarde. A contrario, lorsque les cellules sont traitées par un vecteur comportant le récepteur *Fgfr1* actif, le pourcentage de cellules β -galactosidase⁺ présentes dans le myocarde augmente (Pennisi and Mikawa, 2009).

La voie de signalisation PDGFR β /PI3K est également nécessaire pour la migration des EPDC au sein du myocarde (Mellgren et al., 2008). Une récente étude démontre que l'inactivation spatio-temporelle du récepteur *Pdgfr*, au niveau de l'épicaide et au jpc 12.5, induit une altération de la migration des EPDC dans le sous-épicaide (Smith et al., 2011).

Le facteur TGF β est exprimé dans l'épicaide et le myocarde durant la cardiogenèse (Molin et al., 2003; Olivey et al., 2006). L'inactivation de son récepteur *Tgfb β 3*, chez la souris, conduit à la mort des embryons au jpc 14.5, au moment où la vascularisation cardiaque est essentielle à la croissance embryonnaire (Compton et al., 2007).

Une fois présentes dans le sous-épicaide ou dans le myocarde, les EPDC subissent, sous l'effet de divers signaux cellulaires, des différenciations en fibroblastes, CML, cellules endothéliales ou cardiomyocytes. Quelle est donc la contribution des EPDC à la formation des coronaires ainsi qu'à l'architecture du myocarde ?

B. Rôle des EPDC dans l'embryogenèse cardiaque

1. Formation des vaisseaux coronaires

a. Contrôle de la vasculogenèse et de l'artériogenèse cardiaque par l'épicaide

La vasculogenèse est le terme employé pour décrire la formation des premiers vaisseaux sanguins, dit îlots sanguins, à partir de précurseurs de cellules endothéliales. Dans le cœur, elle commence par la formation de structures primitives qui correspondent à des agrégats de cellules endothéliales et d'érythrocytes ne présentant pas de connexion avec la circulation systémique (Hirakow, 1983; Ratajska and Fiejka, 1999; Rongish et al., 1994).

Chez l'oiseau, au stade 23 de Hamburger et Hamilton, les îlots sanguins sont majoritairement situés dans le sous-épicaide (Hiruma and Hirakow, 1989). De plus, le développement de la vascularisation coronarienne coïncide spatialement et temporellement avec le développement de l'épicaide (Viragh et al., 1993; Vrancken Peeters et al., 1997). Ainsi, la contribution que peut avoir les EPDC pour le développement des CML coronariennes et des fibroblastes est généralement acceptée. A contrario, l'origine des cellules endothéliales coronarienne (CEC) est controversée.

Dès lors, l'implication du proépicaarde/épicaarde dans l'initiation de la vasculogénèse cardiaque a été maintes fois démontrée. Ainsi, en 2006, l'équipe de Tomanek constate que les cellules dérivées du proépicaarde donnent effectivement naissance aux îlots sanguins observés dans le sous-épicaarde, confirmant ainsi le rôle des EPDC dans l'induction de la vasculogénèse cardiaque (Tomanek et al., 2006). De plus, plusieurs autres études ont avancé le fait que les EPDC seraient capables de se différencier en cellules endothéliales (Manner, 1999; Munoz-Chapuli et al., 2002; Perez-Pomares et al., 2002a). Ajoutons que le double marquage des EPDC à l'aide d'anticorps anti-QH1 (marqueur de cellules endothéliales) et anti-cytokératine, met en évidence que ces deux derniers sont exprimés par les précurseurs des CEC. Cette théorie a été confirmée dans plusieurs espèces animales. En effet, chez la roussette, la totalité des cellules du sous-épicaarde provient de l'épicaarde et les bourgeons vasculaires se développent avant la migration des angioblastes de source extracardiaque (Ramon Muñoz-Chápuli, 1996).

Un nouveau concept supportant le rôle des EPDC dans la génération des cellules endothéliales a récemment été établi. En effet, il semblerait que le proépicaarde soit formé de structures distinctes caractérisées par l'expression de marqueurs spécifiques : les marqueurs Scleraxis (SCX) et Semaphorine 3D (SEMA3D) qui ne sont pas retrouvés dans les cellules du proépicaarde exprimant les marqueurs TBX18 et WT1. Néanmoins, une partie des cellules TBX18⁺ et WT1⁺ expriment les marqueurs SCX et SEMA3D. Les cellules SCX⁺ et SEMA3D⁺ sont retrouvés dans le proépicaarde à partir du jpc 9.0 et dans l'épicaarde et le sous-épicaarde au jpc 11.5. Elles contribuent au développement des CEC (Katz et al., 2012).

Enfin des modèles génétiques ont également mis en évidence le rôle des EPDC dans la vasculogénèse cardiaque :

- L'inactivation des gènes *Vcam-1*, *l'α-4-intégrine*, *Wt1* et de *l'Erythropoïétine* provoque une altération du développement du réseau coronarien (Kwee et al., 1995; Moore et al., 1999; Wu et al., 1999b; Yang, Rayburn, and Hynes, 1995).
- L'inactivation des récepteurs *Fgfr1* et *Fgfr2* spécifiquement dans le myocarde provoque une malformation des vaisseaux coronariens (Lavine et al., 2006). Il est important de noter que les membres du FGF-1,2,4,9,6,20 sont exprimés essentiellement dans l'épicaarde (Lavine et al., 2005; Morabito et al., 2001; Pennisi, Ballard, and Mikawa, 2003; Pennisi and Mikawa, 2005; Sugi et al., 2003).
- L'inactivation du récepteur *Pdgfrβ* induit un défaut de développement des plexus coronariens au jpc 14.5 qui sera compensé au jpc 17.5 (Mellgren et al., 2008).

- La perte du gène *Raldh2*, confiné au niveau de l'épicaarde, induit des anomalies du réseau coronaire caractérisées par une réduction des marqueurs de cellules endothéliales dérivées des veines coronaires et des hémangioblastes/progéniteurs cardiaques Sca1⁺ (Lin et al., 2010).
- La délétion de la voie du RXR α (Retinoid X Receptor- α) dans les cellules dérivées de l'épicaarde, cause une altération de l'attachement de l'épicaarde à la surface du myocarde, un défaut de développement du sous-épicaarde, et une atteinte des artères coronaires se caractérisant par une perte des branchements des coronaires (Merki et al., 2005).
- La suppression de la voie de signalisation NOTCH au niveau de l'épicaarde provoque une réduction des plexus vasculaires coronariens au jpc 13.5 (del Monte et al., 2011).

D'autres hypothèses concernant l'origine des CEC ont également été émises. Ainsi, l'une d'elle supporte le fait que les CEC dériveraient d'angioblastes provenant du septum transversum, zone mésenchymateuse au sein de laquelle se développe le foie. Ainsi, une équipe a voulu mettre en évidence que les CEC proviennent de cette structure en utilisant des greffes croisées caille/poulet. En conséquence, des pièces d'ébauches dérivant de l'épicaarde ou du foie ont été transplantées dans la cavité du péricarde de poulet. Cette étude confirme que la formation des îlots sanguins débute après le développement de l'épicaarde. Cependant, elle réfute l'implication totale de l'épicaarde dans le développement de l'endothélium coronaire puisque les chimères comprenant les transplants de l'épicaarde ne donnent pas lieu à la formation de cellules endothéliales alors que les greffes hépatiques le permettent. Dès lors, cette étude montre le rôle que joue le septum transversum de l'embryon dans la vasculogénèse coronaire (Poelmann et al., 1993).

Une autre hypothèse soutient que les CEC trouveraient leur origine dans le pôle veineux cardiaque. Ce dernier est actuellement considéré comme donnant naissance aux veines coronaires. L'étude soutenant cette hypothèse affirme que les cellules veineuses formées subiraient des différenciations en CEC ou CML composant les artères et capillaires coronariens. Cette même étude utilise un marqueur de cellules endothéliales, la cadhérine de l'endothélium vasculaire (VE-cadhérine), pour tracer le devenir des cellules endothéliales provenant du pôle veineux (Red-Horse et al., 2010). Cependant, il s'agit là d'un marqueur commun aux cellules endothéliales et cette étude ne permet pas d'affirmer que les CEC

proviendraient majoritairement des dédifférenciations des cellules endothéliales du pôle veineux.

Somme toute, les îlots sanguins du sous-épicaire sont les précurseurs des vaisseaux coronariens. Après leur formation, le réseau sanguin s'étend par le processus d'angiogenèse. Il s'agit de la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux préexistants. Les îlots sanguins subissent donc un allongement pour atteindre les sinus de Valsalva (dilatation de la racine de l'artère aortique) et établir une connexion avec la lumière aortique (Bogers et al., 1989; Waldo, Willner, and Kirby, 1990). A partir de là, les plexus vasculaires bourgeonnent pour permettre la vascularisation de la totalité du cœur. Le ventricule gauche est le premier à être envahi par les vaisseaux sanguins, puis le ventricule droit et l'apex qui est la dernière partie du cœur à être vascularisée (Kattan, Dettman, and Bristow, 2004; Rychter et al., 1975; Vrancken Peeters et al., 1997).

La maturation et le remodelage des artères coronaires sont appelés artériogenèse. Cette dernière permet l'insertion des CML au niveau des artères coronaires. Les EPDC sont la principale source de CML. Ainsi, les premières études ayant montré l'implication de l'épicaire et des EPDC dans le développement des artères coronaires furent menées dans les années 1990, grâce aux marquages du proépicaire à l'aide d'un traceur rétroviral. Ces études ont mis en évidence le fait que les CML et CEC formant les artères coronaires ainsi que les fibroblastes périvasculaires, étaient marquées et provenaient dès lors du proépicaire (Mikawa and Fischman, 1992; Mikawa and Gourdie, 1996). L'équipe de Dettman, en 1998, confirme ces résultats en injectant des cellules de l'épicaire marquées au niveau de cœurs, lors de l'embryogenèse, au moment où les cellules du proépicaire s'attachent à la surface cardiaque. Il ressort ainsi de cette expérience que les cellules marquées s'intègrent à l'épicaire et contribuent au développement des artères coronaires par le biais de leurs différenciations en CML, péricytes et fibroblastes périvasculaires (Dettman et al., 1998).

De plus, divers modèles génétiques ont également démontré le rôle des EPDC dans l'artériogenèse cardiaque (Compton et al., 2007; del Monte et al., 2011; Lavine et al., 2006; Mellgren et al., 2008; Merki et al., 2005; Pennisi and Mikawa, 2009; Singh et al., 2011; Sridurongrit et al., 2008). Plus particulièrement, la délétion de *Dicer* et de la β -caténine, chez la souris spécifiquement au niveau de l'épicaire, conduit, respectivement, à la mort embryonnaire périnatale et au jpc 15.5. Ces souris mutantes développent un plexus vasculaire coronarien normal. Cependant les EPDC sont incapables de se différencier en CML,

provoquant un défaut de recrutement des CML au niveau des artères coronaires (Singh et al., 2011; Zamora, Manner, and Ruiz-Lozano, 2007). Par ailleurs, l'inactivation du récepteur *Pdgfr β* , spécifiquement au niveau de l'épicarde, induit la réduction du nombre de CML recouvrant les artères coronaires (Mellgren et al., 2008). Enfin, l'inactivation spécifique du récepteur *Tgfr β 1/Alk5* au niveau de l'épicarde entraîne également un défaut de développement des CML couvrant les artères coronaires et la formation de coronaires anormaux (Sridurongrit et al., 2008).

b. Contrôle de la vasculogenèse et de l'artériogenèse cardiaque par le myocarde

Diverses voies de signalisation sont impliquées dans le contrôle de la vasculogenèse et de l'artériogenèse par le myocarde et sont récapitulées dans le tableau 2.

Tableau 2. Voie de signalisation du myocarde ayant un rôle dans la vasculogénèse et l'artériogénèse induite par les EPDC

Signalisation	Expression	Modèle d'étude	Phénotype	Référence
Hedgehog		Inactivation au niveau des cardiomyocytes (promoteur MHC)	Réduction du sous-épicaire et de la densité des plexus coronaires	(Lavine et al., 2008)
PDGFR α et β	Epicaire	Inactivation du <i>Pdgf</i> dans tout l'organisme de souris	Hémorragies cardiaques, absence de péricytes et des CML	(Hellstrom et al., 1999; Leveen et al., 1994; Lindahl et al., 1997; Orr-Urtreger et al., 1992; Shinbrot, Peters, and Williams, 1994; Takakura et al., 1997)
Thymosine-β4	Myocarde (agit dans l'épicaire)	Inactivation de la β -caténine niveau des cardiomyocytes (promoteur <i>Nkx2.5</i> et <i>Mlc</i>)	Altération du développement des coronaires principalement caractérisée par la réduction de l'expression du gène <i>αSma</i>	(Smart et al., 2007)
Angiopoïétine	Angiopoïétine 1 : myocarde Tie2 : (récepteur de l'angiopoïétine) épicaire	Surexpression de l' <i>Ang1</i> au niveau des cardiomyocytes (promoteur <i>Mlc</i>)	Anomalie de développement de l'épicaire et des plexus coronaires	(Suri et al., 1996; Ward et al., 2004)
Prokinétines	Epicaire Myocarde	Surexpression de <i>Pkr1</i> au niveau des cardiomyocytes (Promoteur <i>Mhc</i>)	Activation de la prolifération et de la différenciation des EPDC en CEC et CML	(Urayama et al., 2007; Urayama et al., 2008)
GATA4	Myocarde	Surexpression au niveau des cardiomyocytes (Promoteur <i>Mhc</i>) Inhibition au niveau des cardiomyocytes (Promoteur <i>Mhc</i>)	Augmentation du réseau capillaire coronarien et la contractilité en dépendant Réduction du réseau coronarien et l'angiogénèse induite par l'hypertension	(Heineke et al., 2007)
FOG-2		Inactivation totale du gène <i>Fog-2</i>	Absence du réseau vasculaire coronarien	(Tevosian et al., 2000)

2. Rôle de l'épicaide dans l'expansion et l'architecture du myocarde durant l'embryogenèse

De nombreuses études ont également démontré le rôle que joue l'épicaide dans la formation du myocarde. Chez l'oiseau et les mammifères, les premiers stades de développement du myocarde coïncident avec les étapes d'invasion du myocarde par les EPDC (Moore et al., 1999; Vrancken Peeters et al., 1999).

Ainsi, l'ablation chirurgicale du proépicaide cause irrémédiablement des malformations cardiaques incluant la tétralogie de Fallot et l'absence de la zone membraneuse du septum inter-ventriculaire (Manner, Schlueter, and Brand, 2005).

D'autres études portant sur la délétion de gènes, montrent également le rôle de l'épicaide dans la morphogenèse du myocarde (Combs et al., 2011; del Monte et al., 2011; Lin et al., 2010; Mahtab et al., 2008; Merki et al., 2005; Singh et al., 2011; Tevosian et al., 2000; Watt et al., 2004; Yang, Rayburn, and Hynes, 1995). Ainsi, les anomalies cardiaques observées lors de l'inactivation du gène *Wt1* sont principalement dues à une défaillance cardiaque induite par une hypoplasie ventriculaire. De façon plus précise, cette mutation cause l'absence de développement de la zone compacte du myocarde et l'amincissement de la paroi musculaire. En prenant en considération le fait que WT1 soit exprimée essentiellement au niveau de l'épicaide, ces données démontrent le rôle crucial des EPDC dans la compaction et le développement du myocarde (Kreidberg et al., 1993). Le marquage des cellules exprimant WT1 met également en évidence la contribution des EPDC au développement du myocarde (Zhou et al., 2008a). La voie de signalisation de l'acide rétinoïque, via son action paracrine sur les EPDC, est pour sa part considérée comme régissant la morphogenèse cardiaque. En effet, les souris déficientes en acide rétinoïque, présentent un défaut de développement de la zone compacte du myocarde (Gruber et al., 1996; Jenkins, Hutson, and Kubalak, 2005; Kastner et al., 1994; Merki et al., 2005; Sucov et al., 1994). Des études *in vitro*, démontrent que le traitement des EPDC par l'acide rétinoïque induit la prolifération des cardiomyocytes par l'activation des voies de signalisation PI3K et ERK (Chen et al., 2002). La voie de signalisation des FGF essentiellement libérée par l'épicaide agit au niveau des récepteurs FGFR1 et 2 exprimés dans le myocarde. L'activation de ces récepteurs provoque aussi la prolifération des cardiomyocytes (Corda et al., 1997; Lavine et al., 2005; Pennisi, Ballard, and Mikawa, 2003).

Les fibroblastes interstitiels sont d'autres composants importants dans le développement du cœur. Différentes études ont montré la capacité des EPDC à se différencier en fibroblastes (Dettman et al., 1998; Gittenberger-de Groot et al., 1998; Lie-Venema et al., 2005; Manner, 1999).

Ainsi, la délétion du récepteur *Pdgfra* seul ou en combinaison avec celle du récepteur *Pdgfrβ*, au niveau de l'épicaarde, conduit à la réduction du nombre de fibroblastes et de l'expression des gènes qui leur sont spécifiques tels que le gène *Col1a1*. Ces anomalies sont accompagnées d'une réduction de la sécrétion de la MEC par les fibroblastes cardiaques (Smith et al., 2011). Une autre étude récente a également démontré que la délétion du gène codant pour le facteur epicardin entraîne l'altération de la génération des fibroblastes cardiaques. Cette altération est caractérisée par la régulation négative du récepteur PDGFRα, la réduction des composants de la MEC et des gènes spécifiques aux fibroblastes (Acharya et al., 2012). Une communication myocarde-épicaarde par le biais de la voie de signalisation FGFR2b/FGF10 a également été identifiée comme indispensable au mouvement des fibroblastes au sein du myocarde (Vega-Hernandez et al., 2011).

D'autres travaux menés sur l'embryon d'oiseau soutiennent également le fait que les EPDC seraient aptes à donner naissance aux fibres de Purkinje. Chez l'embryon de poulet, une partie du développement des fibres de Purkinje se fait en association avec l'artériogénèse des coronaires (Gourdie et al., 2003; Hyer et al., 1999). La formation des fibres de Purkinje a également été attachée à la présence d'EPDC dans les zones sous-endocardiques (Gittenberger-de Groot et al., 1998). Dès lors, l'ablation du proépicaarde chez l'embryon de caille, entraîne une hypoplasie des fibres de Purkinje (Eralp et al., 2006). L'endothéline-1, facteur favorisant le développement des fibres de Purkinje (Hall et al., 2004; Patel and Kos, 2005; Takebayashi-Suzuki et al., 2000), est synthétisé par les EPDC, confirmant ainsi le rôle probable de l'épicaarde dans la formation des fibres de Purkinje (Eid et al., 1994).

Nous avons décrit ici le rôle des EPDC dans l'embryogénèse cardiaque, nous décririons plus loin dans la partie « cellules souches » leur rôle chez l'adulte.

Le tableau 3 et la figure 13 récapitulent les événements cellulaires et moléculaires indispensables à la formation de l'épicaarde, des vaisseaux coronaires et de la morphogénèse cardiaque.

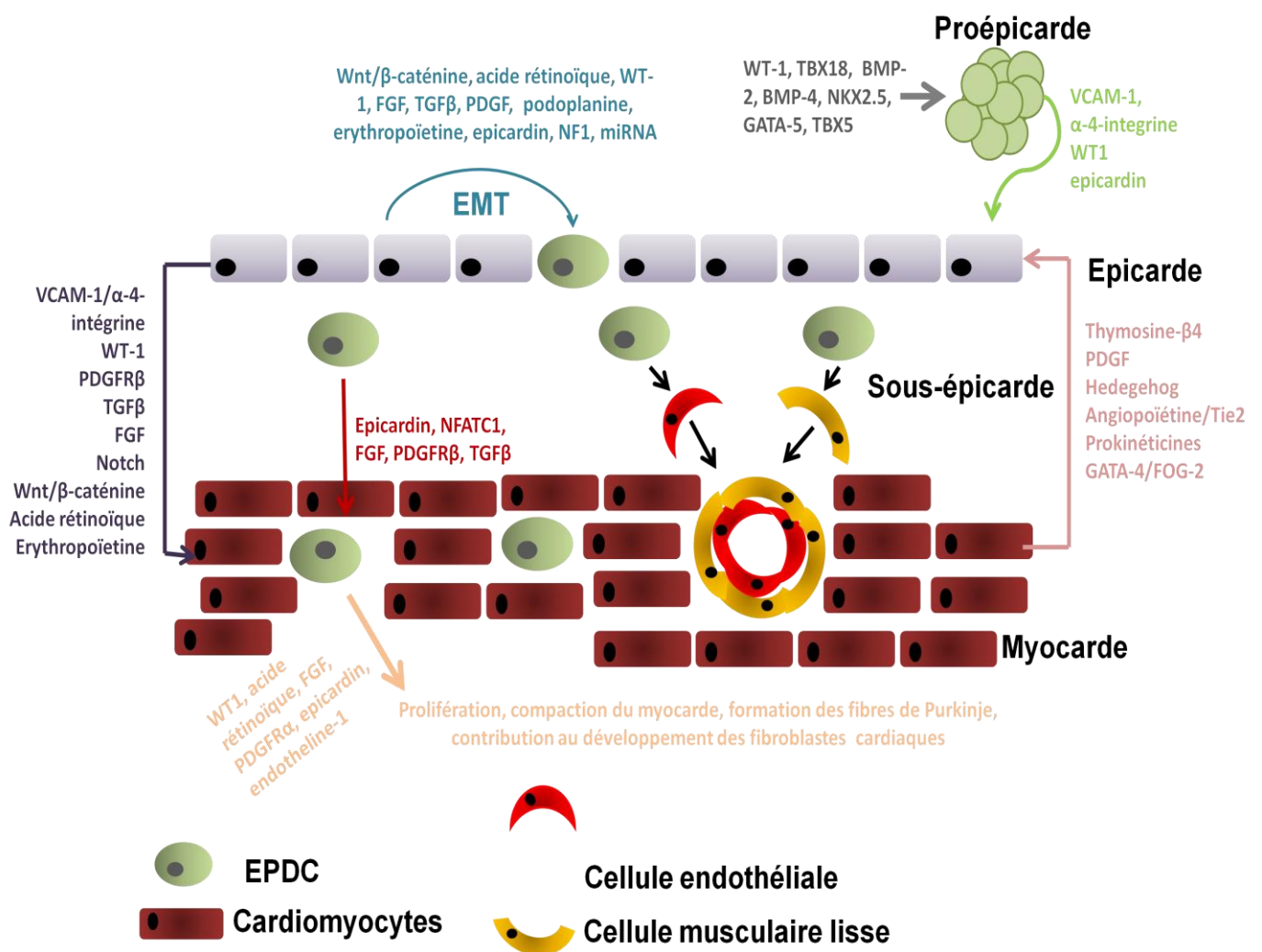


Figure 13. Développement de l'épicaide : implication dans la vascularisation cardiaque et l'architecture du myocarde.

Tableau 3. Facteurs impliqués dans les différents stades de développement cardiaque

Stade de développement	Facteurs clés	Référence
Proépicarde	WT1	Schulte <i>et al.</i> 2007, Zeng <i>et al.</i> 2010, Zhou <i>et al.</i> 2008b
	TBX18	Schulte <i>et al.</i> 2007, Zeng <i>et al.</i> 2010, Moore <i>et al.</i> 1999
	BMP-2	Schulte <i>et al.</i> 2007
	NKX2.5	Zhou <i>et al.</i> 2008b
	GATA-5	MacNeill <i>et al.</i> 2010, Shingh <i>et al.</i> 2010, Laforest <i>et al.</i> 2011
	TBX5	Hatcher <i>et al.</i> 2004, Plageman <i>et al.</i> 2004
Adhésion et expansion des cellules du proépicarde à la surface du cœur	VCAM-1	Yang <i>et al.</i> , Kwee <i>et al.</i> 1995
	α -4 intégrine	Yang <i>et al.</i> 1995, Sengbusch <i>et al.</i> 2002
	Epicardin	Lu <i>et al.</i> 1998, Braitsch <i>et al.</i> 2012
	WT1	Moore <i>et al.</i> 1999
Transformation épithéliale-mésenchymateuse des cellules de l'épicarde	Epicardin	Acharya <i>et al.</i> 2006
	Wnt/ β -caténine	Thierry <i>et al.</i> 2006, Zamora <i>et al.</i> 2007
	WT1	Moore <i>et al.</i> 1999, Zhou <i>et al.</i> 2008a, Ijpenberg <i>et al.</i> 2007, Martinez-Estrada <i>et al.</i> 2010, Zhou <i>et al.</i> 2010, Von Gise <i>et al.</i> 2011
	FGF, PDGF	Fedorova <i>et al.</i> 2009, Molin <i>et al.</i> 2003, Morabito <i>et al.</i> 2001, Smith <i>et al.</i> 2011
	Podoplanine	Mahtab <i>et al.</i> 2008
	Erythropoïétine	Wu <i>et al.</i> 1999
	NF1	Baek <i>et al.</i> 2012
	mi-RNA	Singh <i>et al.</i> 2011
	VCAM-1/ α -4-intégrine	Kwee <i>et al.</i> 1995, Yang <i>et al.</i> 1995
	WT-1	Moore <i>et al.</i> 1999
Contrôle moléculaire de la formation des coronaires par l'épicarde	TGF β	Molin <i>et al.</i> 2003, Olivey <i>et al.</i> 2006, Compton <i>et al.</i> 2007, Sridurongrit <i>et al.</i> 2008
	FGF	Lavine <i>et al.</i> 2005, Morabito <i>et al.</i> 2001, Pennisi <i>et al.</i> 2003, Pennisi <i>et al.</i> 2005, Sugi <i>et al.</i> 2003
	Wnt/ β -caténine	Zamora <i>et al.</i> 2007
	Acide rétinoïque	Merki <i>et al.</i> 2005, Moss <i>et al.</i> 1998, Lin <i>et al.</i> 2010
	Erythropoïétine	Wu <i>et al.</i> 1999
	Notch	Del Monte <i>et al.</i> 2011
	Hedgehog	Lavine <i>et al.</i> 2006, Lavine <i>et al.</i> 2008
	Thymosine- β 4	Smart <i>et al.</i> 2007
Contrôle moléculaire de la formation des coronaires par le myocarde	PDGF	Orr-Urtreger <i>et al.</i> 1992, Shinbrot <i>et al.</i> 1994, Takakura <i>et al.</i> 1997, Lu <i>et al.</i> 2001, Mellgren <i>et al.</i> 2008, Tomanek <i>et al.</i> 2008, Hellstrom <i>et al.</i> 1999, Leeven <i>et al.</i> 1994, Lindhal <i>et al.</i> 1994
	FGF	Lavine <i>et al.</i> 2005, Morabito <i>et al.</i> 2001, Pennisi <i>et al.</i> 2003, 2005, Sugi <i>et al.</i> 2003
	Ang1/Tie2	Suri <i>et al.</i> 1996, Ward <i>et al.</i> 2004
	Prokinétines	Urayama <i>et al.</i> 2007, 2008
	GATA4	Heineke <i>et al.</i> 2007, Tevosian <i>et al.</i> 2008

3. EPDC : une lignée dérivant des précurseurs cardiaques

Les EPDC sont principalement caractérisées par l'expression de WT1 (Zhou et al., 2008a) et de TBX18 (Cai et al., 2008). Elles ne contribuent pas à la formation des quatre chambres cardiaques mais possèdent une forte plasticité. En effet, sous l'action de traitements appropriés, *in vitro*, les cellules TBX18⁺ sont capables de générer des CML et des cardiomyocytes (Cai et al., 2008).

Il a également été démontré dans les tissus fœtaux humains que le facteur de transcription TBX5 est essentiellement exprimé au niveau des tissus cardiaques incluant le myocarde, l'épicaire et les vaisseaux coronaires. Comme nous l'avons vu précédemment, la régulation négative de TBX5 joue un rôle dans l'activité des EPDC. Ainsi, l'expression de TBX5 n'est pas retrouvée au niveau du mésenchyme sous-épicaire et des EPDC mais principalement au niveau de l'épicaire et de ses dérivés incluant les coronaires et le myocarde (Hatcher et al., 2004).

A noter également que l'équipe de Zhou a observé une contribution des cellules souches NKX2.5⁺/ISL-1⁺ à la formation des cellules du proépicaire WT1⁺ (Zhou et al., 2008a; Zhou et al., 2008b). De plus la même étude démontre que les cellules progénitrices cardiaques expriment à la fois les marqueurs WT1 et NKX2.5 (Zhou et al., 2008a).

Par ailleurs, une sous-population de cellules c-Kit⁺ a été détectée au sein de l'épicaire (Beltrami et al., 2003). De la même manière, une fraction très faible de cette sous-population exprime en plus les facteurs NKX2.5 et GATA4, laissant présager ainsi une contribution de ces cellules à la formation des cardiomyocytes. Cependant, il n'a pas été démontré clairement que ces cellules dérivent de l'épicaire (Limana et al., 2007).

La figure 14 récapitule la hiérarchie des cellules progénitrices cardiaques et leur devenir.

Nous avons décrit le rôle des EPDC qui expriment le facteur epicardin⁺ dans le développement cardiaque. Ce facteur est également exprimé dans le système rénal et semble jouer un rôle dans l'embryogenèse rénal. Nous décrirons dans le prochain chapitre les similitudes entre le développement du système cardiaque et rénal.

Figure 14. Hiérarchie cellulaire des cellules progénitrices cardiaques et leur plasticité (Sturzu and Wu, 2011)

V. Epicardin: un marqueur commun de développement entre le cœur et le rein

A. Lien évolutif entre le développement de l'épicarde et des glomérules rénaux

Le rôle des cellules epicardin⁺ dans l'embryogenèse cardiaque est d'une évidence frappante et très peu d'études mettent la lumière sur leurs implications dans l'embryogenèse rénale. Une étude récente portant sur le marquage des cellules exprimant le facteur epicardin dans le rein révèle qu'elles sont retrouvées dès le jpc 10.5 principalement au niveau des glomérules. De façon intéressante, une autre étude a postulé un lien évolutif entre les glomérules du rein et l'épicarde tapissant le cœur.

Cette étude est basée sur l'analyse du développement de l'épicarde chez deux espèces qui occupent des positions phylogénétiques clés chez les vertébrés : la lamproie (agnathe) et la roussette (gnathosome) (Pombal et al., 2008).

L'épicarde de la lamproie se développe entre le jour post fertilisation (jpf) 17 et 23 à partir d'une excroissance de la cavité coelomique située entre le pronephros et l'intestin. A partir du jpf 17, des vésicules provenant de la partie droite de cette excroissance s'attachent à la partie dorsale du ventricule cardiaque et se propagent tout le long de la surface ventriculaire. Entre les jpf 20 et 23, l'excroissance de la cavité coelomique est attachée à la surface cardiaque et les ventricules et atrium sont totalement recouverts par l'épicarde. A partir du jpf 26, il n'y a plus de contact entre la surface cardiaque et l'excroissance de la cavité coelomique qui contribuent plus tard au développement du glomérule externe du pronephros. Ce dernier se compose d'un réseau capillaire, de cellules mésangiales et de podocytes et joue le rôle de système excrétoire primitif et disparaît à l'âge adulte (Kluge, 1990).

A contrario, chez la roussette, le proépicarde est bien présent et forme un organe pair dont la structure droite libère des vésicules flottantes à la surface du cœur. Au stade plus tardif de l'embryogenèse, plus aucun lien n'est observé entre le proépicarde et le cœur. Le proépicarde se situe alors dans le septum transversum et il semblerait que ces cellules deviennent apoptotiques.

Ainsi, les auteurs proposent que le proépicaide dérive des cellules progénitrices du glomérule externe du pronephros et donc que les cellules progénitrices de l'épicaide et les cellules progénitrices rénales proviennent de la même structure lors du développement. De plus, ils avancent que la différence de localisation du glomérule externe du pronephros des agnathes et du proépicaide des gnathosomes s'explique par un arrangement différent des embryons de gnathosomes. En effet, chez ces dernier le pronephros disparaît, le foie s'élargit, il y a incorporation de l'aire veineuse dans le tractus cardiaque et rotation du cœur (Cf. figure 15) (Pombal et al., 2008).

Figure 15. Comparaison de la disposition anatomique des glomérules externes du pronephros des agnathes et du proépicaide des gnathostome (Pombal et al., 2008).

B. Facteurs communs entre le développement de l'épicaide et du rein

Il est important de noter également que l'épicaide et le rein, lors du développement ou en période postnatale, partagent des facteurs communs. Avant de discuter des facteurs communs au cœur et au rein, nous décrirons brièvement les événements ayant lieu lors de l'embryogenèse rénale.

Le rein définitif chez les mammifères, dit métanephros, provient de deux structures embryonnaires dérivant du mésoderme intermédiaire, du sinus uro-génital et du blastème métanéphrogène (Saxen and Sariola, 1987). Ce dernier donne lieu à la génération des glomérules, des tubules et de l'anse de Henlé. Le développement du métanephros se fait essentiellement par le biais d'interactions épithéliales-mésenchymateuses (Birchmeier and Birchmeier, 1993; Saxen and Thesleff, 1992; Thesleff et al., 1995). En effet, d'importantes communications entre le sinus uro-génital et le blastème métanéphrogène permettent la génération des constituants rénaux incluant les glomérules, les tubules et les voies urinaires hautes (Grobstein, 1955; Saxen and Sariola, 1987).

1. Premier facteur : WT1

WT1, facteur essentiel à la formation de l'épicaire et à l'activité des cellules progénitrices de l'épicaire (Moore et al., 1999), est également retrouvé, chez l'embryon de poule, dans le mesonephros qui correspond à une structure rénale transitoire. De plus, le profil d'expression de WT1 dans le proépicaire et le mesonephros est similaire puisque les deux structures expriment fortement WT1 en bordure de la cavité coelomique alors qu'ils l'expriment plus faiblement au niveau du mésenchyme (Pombal et al., 2008).

Dès lors, la délétion du gène *Wt1* chez la souris cause une absence de développement du rein et un défaut de développement de l'épicaire (Kreidberg et al., 1993; Moore et al., 1999; Wagner et al., 2005). Pareillement, chez l'homme, il semblerait que WT1 joue un rôle essentiel dans l'embryogenèse cardiaque et rénale. En effet, WT1 est exprimée chez les fœtus humains dans les glomérules, les régions sous-capsulaires rénales et les zones actives où a lieu la glomérulogenèse (Fanni et al., 2011). De plus, une corrélation a été établie entre la réduction de l'expression de WT1 dans le mésothélium hépatique et le développement de l'agénésie rénale et des malformations cardiaques chez les fœtus humains âgés entre 17 et 23 jours de gestation (Loo et al., 2012; Loo, Pereira, and Ramm, 2012).

2. Deuxième facteur : TBX18

Un autre facteur important commun au cœur et au rein est le facteur de transcription TBX18 qui est exprimé par les cellules du proépicaire, par les cellules de l'épicaire à partir du jpc 9.5, par les cellules du mésenchyme métanéphrogène entre les jpc 11.5 et 12.5 et par les cellules stromales et CML dérivées des voies urinaires basses à partir du jpc 12.5 (Airik et al., 2006; Wang et al., 2009; Zeng et al., 2011). De plus, les cellules exprimant TBX18 contribuent à la fois au développement du cœur et du rein.

En effet, les cellules TBX18⁺ provenant de l'épicaire donnent lieu à la génération de fibroblastes cardiaques et de CML, deux importants composants de la cardiogenèse (Cai et al., 2008). Par ailleurs, les cellules TBX18⁺ NKX2.5⁻ jouent également un rôle dans la morphogenèse de la corne sinusale, futur sinus coronaire (Christoffels et al., 2006).

De la même manière dans le rein, les cellules TBX18⁺ contribuent au développement des CML des voies urinaires basses. En effet, l'inactivation du gène *Tbx18* chez la souris conduit à l'apparition d'urétéro-hydronephrose (dilatation des calices et du bassin) due à une altération de la différenciation des cellules mésenchymateuses de l'uretère en CML (Airik et al., 2006; Nie et al., 2010; Paces-Fessy et al., 2012).

3. Troisième facteur : epicardin

Le troisième facteur commun au cœur et au rein est le facteur epicardin. En effet, nous avons vu précédemment que ce facteur est exprimé par les cellules de l'épicaarde et joue un rôle essentiel dans le développement du cœur. Par ailleurs, le facteur de transcription epicardin est exprimé dans deux types de lignées cellulaires rénales provenant du mésoderme (Quaggin et al., 1999; Quaggin, Vanden Heuvel, and Igarashi, 1998).

Dans les premiers stades de l'embryogenèse rénale, l'expression du facteur epicardin est retrouvée dans les glomérules au niveau des cellules mésangiales et endothéliales (Acharya et al., 2011) et par les précurseurs des CML et les CML elles mêmes de l'uretère (Quaggin et al., 1999). Plus tard lors du développement, une étude a révélé que le facteur epicardin est également exprimé au niveau des podocytes (Acharya et al., 2011; Quaggin, Vanden Heuvel, and Igarashi, 1998). Lors du développement normal du rein, les podocytes dérivent des cellules interstitielles primaires retrouvées au niveau du cortex et des régions médullaires (Alcorn, Maric, and McCausland, 1999; Cui, Schwartz, and Quaggin, 2003; Maric, Ryan, and Alcorn, 1997). Ces cellules expriment la tenascine, composant de la MEC et se différencient pour envahir la zone médullaire rénale (Alcorn, Maric, and McCausland, 1999; Hatini et al., 1996). Elles expriment également le facteur epicardin et leurs différenciations donnent lieu à la génération des cellules interstitielles interstitielles et des péricytes (Cui, Schwartz, and Quaggin, 2003).

Dès lors, l'inactivation du gène *Epicardin* chez la souris entraîne un défaut de développement de la zone médullaire rénale ainsi qu'une réduction de l'expression de l' α -actine des CML. De plus la délétion du facteur epicardin a démontré son implication dans le développement des capillaires interstitiels. A noter également que le facteur epicardin joue un rôle indispensable dans la formation des glomérules puisque son inactivation est à l'origine d'un arrêt de la glomérulogenèse au stade du dédoublement capillaire (Cui, Schwartz, and Quaggin, 2003). Une autre étude a également démontré le rôle du facteur de transcription epicardin dans le développement rénal puisque sa surexpression induit la prolifération de myofibroblastes. Ces derniers, durant l'embryogenèse rénale, prolifèrent, migrent et sécrètent des facteurs de croissance qui contrôlent le développement des cellules épithéliales, les phénomènes de différenciation ainsi que la morphogenèse de branchement (Plotkin and Mudunuri, 2008).

Nous avons décrits dans les deux parties précédentes le rôle des cellules epicardin⁺ dans le développement cardiaque et rénal. Au vu de leurs capacités de différenciation, ces cellules sont considérées comme des cellules souches. Ces dernières représentent un champ de recherche prometteur pour la médecine régénérative. Dans la partie suivante, nous aborderons les différents types de cellules souches existantes ainsi que leur utilisation en thérapie cardiaque et rénale.

VI. Cellules souches et régénération cardiaque et rénale

A. Les cellules souches

Durant la dernière décennie, la recherche sur les cellules souches a révolutionné le monde des thérapeutiques pour faire émerger une nouvelle médecine dite régénérative. Les cellules souches sont des cellules immatures caractérisées par leur capacité d'auto-renouvellement leur permettant de proliférer tout le long de leur vie et leur plasticité correspondant à leur pouvoir de différenciation (Hall and Watt, 1989; Smith, 2006). Elles sont classées traditionnellement selon leur capacité de différenciation en cellules souches embryonnaires (CSE), cellules souches fœtales (CSF), cellules souches adultes (CSA) ou cellules souches pluripotentes induites (iPS) (Cf. figure 16).

Les CSE sont des cellules souches pluripotentes capables de générer les cellules provenant de l'ectoderme, de l'endoderme et du mésoderme, hormis les annexes embryonnaires. Elles dérivent de la masse cellulaire interne du blastocyte et peuvent donner naissance à toutes les cellules de l'organisme (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson et al., 1998). Plusieurs travaux ont démontré que les CSE humaines ont la capacité de se différencier en cellules mésenchymateuse (Barberi et al., 2005; de Peppo et al., 2010), ostéoblastes (Ahn et al., 2006; Kuznetsov, Cherman, and Robey, 2011), chondrocytes (Hwang, Polak, and Mantalaris, 2008; Oldershaw et al., 2010), cellules endothéliales (James et al., 2010), cellules cardiaques (Yang et al., 2008) et cellules neuronales (Lee et al., 2007). Ces caractéristiques font des CSE, une source thérapeutique attractive pour la médecine régénérative. Cependant leur utilisation reste limitée, étant donné que leur capacité de différenciation est à peine contrôlée et qu'elles peuvent donner lieu, lors de différenciation incontrôlée, au développement de tératome et de tératocarcinome (Wu, Boyd, and Wood, 2007).

Les CSF sont déjà engagées dans les voies de différenciation et gardent leur capacité d'auto-renouvellement, elles possèdent donc une plasticité plus limitée que les CSE. Ce sont des cellules souches pouvant être isolées à partir du sang et des parois du cordon ombilical ou encore à partir des tissus fœtaux (O'Donoghue and Fisk, 2004). C'est le cas des cellules progénitrices neuronales caractérisées pour la première fois dans les fœtus de rat et de souris. Elles ont une capacité de différenciation limitée puisqu'elles peuvent se différencier en trois populations neuronales distinctes incluant les astrocytes, les neurones et les oligodendrocytes (Kennea and Mehmet, 2002).

Les CSA résident dans les tissus de l'adulte et jouent un rôle crucial dans la régénération tissulaire. Elles sont, dans le meilleur des cas, oligopotentes ou unipotentes. Leur intérêt majeur est d'ordre bioéthique puisque l'utilisation des CSE ou CSF est restreinte. A noter également que leurs pouvoirs tumorigène et immunogène sont mieux contrôlés. Le problème majeur de ce type cellulaire réside dans sa capacité de prolifération, puisqu'elle reste limitée, ainsi que dans l'accessibilité de leur niche d'organe. Ainsi, il est facile d'isoler des cellules souches provenant du tissu adipeux, du sang ou de la moelle osseuse alors qu'il demeure plus contraignant de les extraire du cœur ou du rein.

Les iPS proviennent de la reprogrammation génétique d'une cellule différenciée adulte en cellule souche pluripotente (Takahashi and Yamanaka, 2006).

En plus des cellules souches, on distingue les progéniteurs et précurseurs. Les progéniteurs se caractérisent par la coexistence des antigènes de « caractère-souche » avec les facteurs de transcription des cellules différenciées (CML, cellules endothéliales, cardiomyocytes...). Les précurseurs se définissent par la co-expression des protéines spécialisées avec les épitopes de « caractère-souche » (Urbanek et al., 2006).

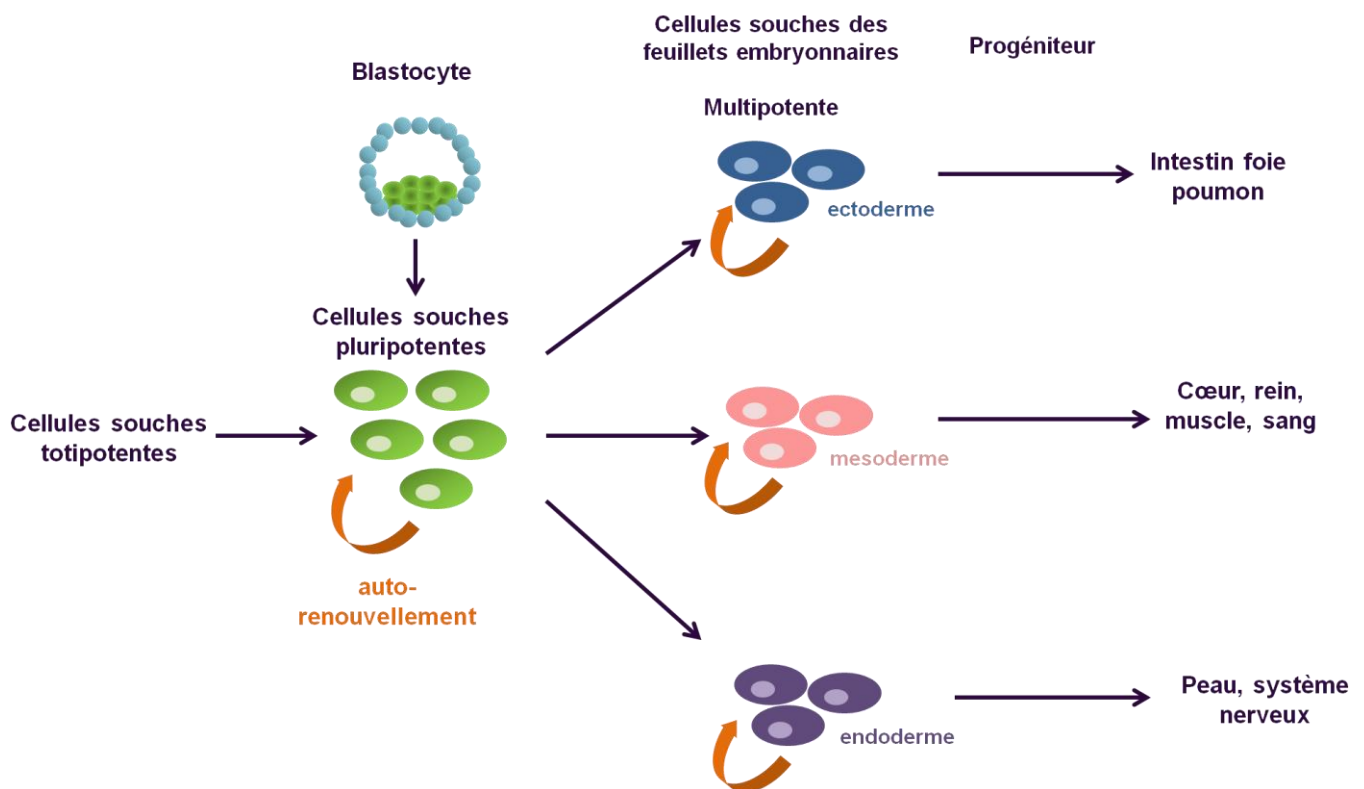


Figure 16. Hiérarchie et plasticité des cellules souches

Les CSA jouent donc un rôle dans le renouvellement tissulaire. Néanmoins il est à distinguer deux types d'organes : les tissus à renouvellement rapide et les tissus quiescents à renouvellement lent. Les tissus à renouvellement rapide comprennent l'intestin, la peau ou encore le sang. Dans ce cadre là, il a été mis en évidence la présence de cellules souches actives qui remplaceraient les cellules résidentes mortes tout au long de la vie. Les tissus à renouvellement plus lent comprennent également des cellules souches qui ne sont activées que lorsque le tissu est lésé.

B. La régénération cardiaque et la thérapie cellulaire

1. Médecine régénérative cardiaque : fondements et intérêts thérapeutiques

Conceptuellement les tissus formant le cœur sont considérés comme quiescents et se caractérisent ainsi par une capacité régénérative limitée et inadéquate à la compensation de la

perte des cardiomyocytes lors d'infarctus. Selon ce paradigme, le nombre de cardiomyocytes est établi dès la naissance et cette population cellulaire est théoriquement irremplaçable durant le cycle de vie de l'individu. Dès lors, les cardiomyocytes, à l'âge adulte, selon le contexte dans lequel ils se trouvent, subissent essentiellement des phénomènes d'hypertrophie ou de mort cellulaire. Il reste donc difficile au cœur de pallier à la perte de cardiomyocytes. Le seul moyen d'y remédier pour le cœur résident dans le remplacement des myocytes cardiaques par du tissu fibreux.

Une étude confirme cette notion et démontre grâce à l'intégration de carbone 14 que le turnover des cardiomyocytes est d'environ de 1% à 25 ans et 0.45% à l'âge de 75 ans (Bergmann et al., 2009). Néanmoins, la capacité proliférative des cardiomyocytes lors d'infarctus est beaucoup plus grande. En effet elle est de 4% en bordure de la zone infarctée et de 1% dans des zones plus éloignées (Beltrami et al., 2001).

L'implication des cellules souches dans le turnover des cardiomyocytes a été expérimentée chez une souris dont l'expression de la GFP (Green Fluorescent Protein) est induite par l'injection de tamoxifène dans les cardiomyocytes matures seulement. Cette étude suggère que les cellules souches joueraient un rôle dans le remplacement des cardiomyocytes lors de l'infarctus. En effet, les auteurs révèlent que près de 15% et 5% des cardiomyocytes qui n'expriment pas la GFP sont retrouvés respectivement en bordure de la zone infarctée et plus éloignés. Cette étude prouve que lors de l'infarctus du myocarde, des cardiomyocytes néoformés envahissent la zone lésée. De plus, ce remplacement ne peut être détecté en situation normale (Hsieh et al., 2007). Ces études démontrent le rôle des cardiomyocytes néoformés dans les processus de réparation tissulaire et il serait intéressant de connaître les phénomènes régulant ces processus. Le microenvironnement pathologique qui se développe lors d'infarctus du myocarde en fait partie. Il inclue l'inflammation et le remodelage cardiaque qui sont des phénomènes essentiels à la réparation tissulaire (Jiang and Liao, 2010). Le microenvironnement inflammatoire joue donc un rôle dans la survie et la fonction des cellules souches. Ainsi, le facteur SDF-1 (Stromal Derived Factor-1) qui se lie au RCPG dit CXCR4 est connue pour régir l'implantation des cellules souches au niveau de la zone infarctée ou de la zone en bordure du tissu ischémique (Penn, 2009; Zaruba and Franz, 2010). Le chimiokine SDF-1 joue également un rôle dans la chemoattraction des diverses cellules inflammatoires qui expriment le récepteur CXCR4 (Corcione et al., 2000; Kantele, Kurk, and Jutila, 2000; Kucia et al., 2004; Li et al., 2007; Nagase et al., 2001). Par ailleurs, il a été démontré que la sévérité de l'inflammation est corrélée au recrutement des cellules souches au niveau de la zone lésée. Ainsi, un modèle de souris de cardiomyopathie inflammatoire révèle

que l'implantation des cellules souches au niveau des zones infarctées est facilitée lorsque le processus d'inflammation est maximal améliorant ainsi la fonction cardiaque (Malek et al., 2006). Par ailleurs, la surexpression du facteur SDF-1 seul est incapable d'induire l'implantation des cellules souches dans des tissus sains (Abbott et al., 2004; Penn, 2010). La thérapie cellulaire cardiaque précédée d'un prétraitement des cellules souches au TNF α améliore également leur implantation au niveau des zones lésées (Kim et al., 2009b). A noter également que de nombreuses études ont permis de démontrer que l'environnement hostile, lors d'ischémie du myocarde, est le déterminant majeur régulant la détermination cellulaire et la fonction des cellules souches cardiaques (Kania, Blyszczuk, and Eriksson, 2009).

Ainsi les cellules souches cardiaques peuvent présenter un espoir thérapeutique permettant de révolutionner la médecine régénérative et de développer des traitements pour les pathologies cardiaques ischémiques. Cependant, leur action est limitée et insuffisante au sein du tissu cardiaque endommagé (Murry et al., 2004). Cette observation a été mise en relation avec l'environnement « pathologique » dans lequel les cellules souches doivent agir (Endo et al., 2007; Kania, Blyszczuk, and Eriksson, 2009). Nous avons donc vu que le microenvironnement lors de pathologie est décisif quant à l'activité des cellules progénitrices et des phénomènes de réparation tissulaire. Quel serait l'intérêt alors d'utiliser en thérapeutique ces dites cellules souches ?

La transplantation de cellules souches permettrait d'induire la réparation du tissu cardiaque lésé. Elle doit stimuler le remplacement du tissu contractile par des cardiomyocytes fonctionnels pouvant de ce fait établir une connectivité électrique avec les cardiomyocytes natifs. Les cellules souches peuvent participer à la réparation du tissu cardiaque via différents phénomènes (Cf. figure 17) (Gnecchi 2008) : la néo-vascularisation, la différenciation en cardiomyocytes, la libération de facteurs paracrines agissant de façon positive sur plusieurs processus dont la cardiomyogenèse et la néo-vascularisation.

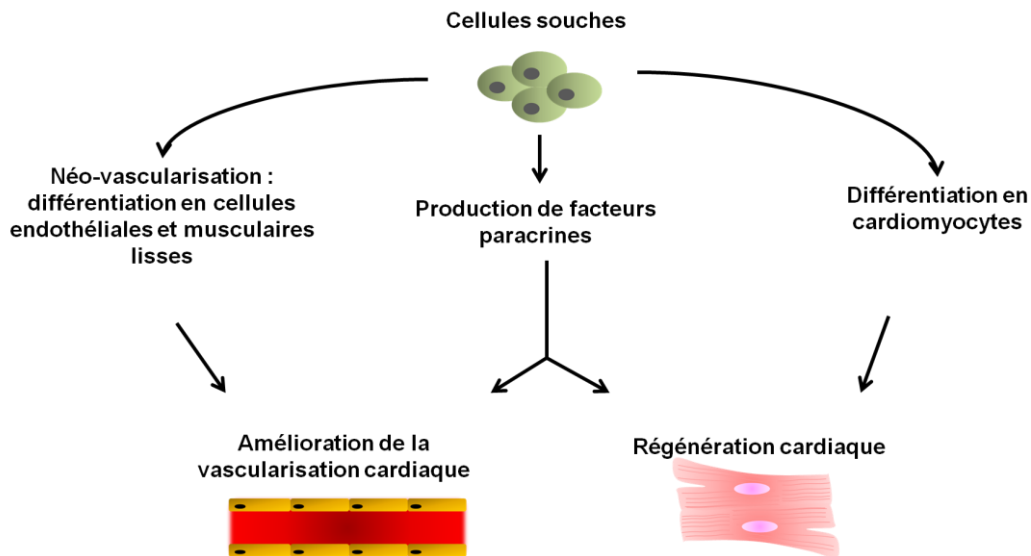


Figure 17. Mécanismes d'action des cellules souches lors de la régénération cardiaque.

La découverte des propriétés d'auto-renouvellement et de plasticité des cellules souches a conduit à un fort intérêt dans l'étude de leur potentielle utilisation en médecine régénérative. Ces dernières années, les efforts se sont concentrés sur la découverte des sources de cellules souches les plus fiables. Chaque population cellulaire possède ses avantages et ses inconvénients. La prochaine partie portera donc sur les différents types cellulaires utilisés actuellement dans la médecine régénérative cardiaque. Plus particulièrement, nous traiterons des cellules souches cardiaques et de l'emploi des EPDC dans la thérapie cellulaire de l'ischémie du myocarde.

2. Les cellules candidates

De nombreuses études portant sur la régénération du myocarde par le biais de l'injection de cellules souches ont été menées. Ainsi, les cellules les plus généralement utilisées regroupent les cellules progénitrices cardiaques exogènes et endogènes.

a. Les cellules souches exogènes au cœur

Les cellules progénitrices cardiaques exogènes regroupent les CSE et les cellules souches de la moelle osseuse.

Plusieurs études ont mis en évidence que les CSE étaient capables de donner naissance à des cellules possédant les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles identiques au cardiomyocytes (He et al., 2003; Kehat et al., 2001; Nury, Neri, and Puceat, 2009; Puceat, 2008). Cependant le frein à l'utilisation des CSE en thérapeutique reste la formation de tératome et de tératocarcinome.

La moelle osseuse riche, en cellules souches autologues, fut la première source à être utilisé par les chercheurs. Elle comprend les cellules souches hématopoïétiques (CSH), les cellules souches mésenchymateuses (CSM) et les progéniteurs endothéliaux circulant (EPC ou Endothelial Progenitor Cells).

Plusieurs études ont ainsi démontré la capacité des CSH à se différencier en cardiomyocytes (Belema Bedada et al., 2005; Flaherty et al., 2008; Koyanagi et al., 2007; Yeh et al., 2003). Dès lors, l'injection de CSH s'est vue être efficace chez des modèles de souris atteintes d'infarctus du myocarde (Kajstura et al., 2005; Orlic et al., 2001a; Orlic et al., 2001b) tandis qu'elle a connu ses limites lors de l'utilisation chez des patients insuffisants cardiaques (Erbs et al., 2005; Hendrikx et al., 2006; Kang et al., 2006).

Les EPC sont utilisées principalement dans le but de stimuler la néo-vascularisation au niveau des zones ischémiques par le biais de phénomènes d'implantation et d'incorporation à la micro-vascularisation (Asahara et al., 1997; Shi et al., 1998). Elles ont été identifiées pour leur capacité à acquérir les propriétés des cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo*. Par conséquent, l'injection d'EPC au niveau du myocarde infarci induit l'amélioration de la fonction ventriculaire gauche et l'atténuation de la fibrose (Jujo, Li, and Losordo, 2008; Kawamoto et al., 2003; Kocher et al., 2001). Cependant l'ischémie cardiaque, le diabète, l'hypercholestérolémie et l'hypertension sont associés à une réduction du taux d'EPC circulant (Imanishi et al., 2005; Vasa et al., 2001) ce qui limite leur utilisation en thérapeutique.

Enfin, les CSM sont capables d'améliorer la fonction contractile du cœur et de réduire la cicatrice fibreuse post-ischémique (Abdel-Latif et al., 2007; Miyahara et al., 2006). Ces effets bénéfiques se font par le biais de plusieurs mécanismes incluant : la plasticité de ces cellules souches, leur fusion avec les cellules résidentes et enfin leur activité paracrine. Cette dernière est le phénomène le plus accepté pour expliquer les effets anti-fibrotiques, anti-apoptotiques, pro-angiogéniques et anti-inflammatoires des CSM (Mazhari and Hare, 2007; Mishra, 2008; Ohnishi et al., 2007). Là encore, l'utilisation des CSM en thérapeutique reste limitée puisque

leur plasticité est large et qu'il a été montré qu'elles étaient capables de se différencier en ostéoblastes au sein du ventricule (Breitbach et al., 2007; Yoon et al., 2004).

b. Les cellules progénitrices cardiaques endogènes

La découverte des cellules progénitrices cardiaques endogènes (CPC) a révolutionné le concept de la thérapie cellulaire dans le domaine cardiovasculaire. En effet, elles représentent un espoir thérapeutique par le fait qu'elles soient autologues et qu'elles soient déjà engagées dans les voies de différenciation des lignées cellulaires cardiaques (Gonzales and Pedrazzini, 2009). A noter également que les CPC ont été découvertes dans les tissus cardiaques de nombreuses espèces de mammifères dont les rongeurs et l'homme (Messina et al., 2004; Urbanek et al., 2006). Elles sont classifiées selon leurs propriétés et les marqueurs qu'elles expriment en surface. Ainsi on distingue, les cellules c-Kit⁺, Sca-1⁺, ISL-1⁺, et les EPDC.

Le facteur c-Kit correspondant à un récepteur de type tyrosine kinase spécifique aux cellules souches fut la première fois utilisé pour isoler les CSH (Lyman and Jacobsen, 1998). Une étude menée en 2003 par Beltrami, a été la première à démontrer l'existence de CPC c-Kit⁺ et Lin⁻ (facteur correspondant aux lignées cellulaires sanguines) dans le cœur excluant une quelconque origine hématopoïétique. Beltrami et son équipe ont observé également que les CPC c-Kit⁺ possédaient un fort potentiel de différenciation en lignée cellulaire cardiaque leur conférant ainsi la possibilité de régénérer le tissu cardiaque lors d'infarctus du myocarde (Beltrami et al., 2003). Les CPC c-Kit⁺ expriment les facteurs de transcription cardiaque tels que GATA4, MEF-2C et NKX2.5. Après leur différenciation *in vitro* elles expriment également les marqueurs des cardiomyocytes matures incluant la MHC, l' α -actinine cardiaque, la desmine et la connexine 43 (Bearzi et al., 2007; Beltrami et al., 2003). Malgré cela, les cardiomyocytes provenant de la différenciation des CPC c-Kit⁺ restent immatures d'un point de vue structural.

L'équipe de Oh a également isolé d'autres CPC caractérisées par l'antigène-1 des cellules souches (Sca-1), membre de la famille des Ly-6 et important marqueur des cellules souches (Oh et al., 2004; Oh et al., 2003). Comme les CPC c-Kit⁺, les CPC Sca-1⁺ expriment différents marqueurs cardiaques dont GATA4 et MEF2. Elles se différencient en cardiomyocytes contractiles après un traitement aux 5-azacytidine (Matsuura et al., 2004; Oh et al., 2003) ou à l'ocytocine (Matsuura et al., 2004). Leur injection *in vivo* a également

démontré des effets bénéfiques puisqu'elles permettent l'amélioration de la fraction d'éjection ventriculaire post-ischémique en induisant la néo-vascularisation et la régénération des myocytes cardiaques par le biais de la libération de facteurs paracrines (Wang et al., 2006b).

Laugwitz fut le premier à décrire la population de CPC $ISL-1^+$ $Sca-1^-$ $c-Kit^-$. Ce groupe cellulaire est également capable de former des cardiomyocytes matures et expriment les facteurs NKX2.5 et GATA4 (Laugwitz et al., 2005). Les CPC $ISL-1^+$ comprennent deux populations distinctes : les CPC $ISL-1^+/VEGFR2^+$ capables de donner naissance à des cellules endothéliales et les CPC $ISL-1^+/VEGFR2^-$ qui peuvent former les lignées de cellules cardiaques et les CML (Moretti et al., 2006). Le problème majeur des CPC $ISL-1^+$ réside dans le fait que leur nombre est réduit considérablement après la naissance.

c. L'épicarde : source idéale de cellules souches pour la thérapie cellulaire ?

Il a été démontré maintes fois l'implication de l'épicarde dans la régénération cardiaque en situation pathologique : les marqueurs embryonnaires de l'épicarde tels que TBX18, WT1 ou RALDH2 sont exprimés uniquement lors d'un dommage tissulaire cardiaque (Gonzalez-Rosa et al., 2011; Lepilina et al., 2006; Schnabel et al., 2011). WT1 est ré exprimé dans les CEC et CML des artères coronaires présentes en bordure de la zone infarctée chez des modèles de rat atteints d'infarctus du myocarde (Wagner et al., 2002). Le devenir des cellules de l'épicarde a été tracé à l'aide de la recombinaison Cre-ERT inducible par l'injection de tamoxifène. Ainsi, l'infarctus du myocarde provoque l'induction des marqueurs de l'épicarde et l'EMT des cellules épicrodiques provoquant l'épaississement de l'épicarde. Les EPDC adultes ne migrent pas au niveau du myocarde, ne se différencient pas en CEC ou myocytes cardiaques mais génèrent des CML, fibroblastes et péricytes. Elles sécrètent également des facteurs pro-angiogéniques jouant un rôle dans l'angiogenèse post-infarctus (Zhou et al., 2011). Chez le poisson zèbre, l'épicarde est capable d'induire la réparation du myocarde ischémique en envahissant les sites lésés et par initiation de la néo-vascularisation (Lepilina et al., 2006).

L'importance de l'épicarde dans la régénération cardiaque, via des processus de néo-vascularisation, a été établie chez le poisson zèbre et les rongeurs (Kikuchi et al., 2011a; Kikuchi et al., 2010; Kim et al., 2010) :

- Le FGF17b est surexprimé au sein du myocarde afin de recruter les cellules souches provenant de l'épicaide et agit sur les récepteurs FGFR2 et 4 situés dans l'épicaide (Lepilina et al., 2006). Le blocage des processus de migration des cellules progénitrices de l'épicaide par la surexpression du dominant négatif du récepteur des FGF inhibe complètement la régénération tissulaire du cœur (Lepilina et al., 2006) ;
- Le PDGF β sécrété par les thrombocytes est un autre facteur de croissance impliqué dans la régénération cardiaque après un dommage tissulaire via son action sur les récepteur PDGFR β situé au niveau de l'épicaide (Kim et al., 2010) ;
- Les gènes *Aldh1* et *Aldh2* codant pour l'enzyme RALDH2 sont exprimés par l'épicaide en réponse à un dommage tissulaire toujours chez le zebrafish et la souris (Kikuchi et al., 2011b) (Limana et al., 2010) ;
- Wnt1 est exprimé dans l'épicaide et dans les fibroblastes cardiaques lors de l'ischémie aigue du myocarde : la délétion de Wnt1 empêche la réparation du myocarde et entraine la réduction de la fonction cardiaque (Duan et al., 2012) ;
- La thymosine- β 4 permet la prolifération et la migration des cellules vasculaires, l'épaississement de l'épicaide, la néo-vascularisation du cœur et améliore la fonction cardiaque (Bock-Marquette et al., 2009; Smart et al., 2007). Le traitement par la thymosine- β 4 des souris insuffisantes cardiaques favorise la migration des cellules progénitrices de l'épicaide au sein du myocarde et leur transdifférenciation en cardiomyocytes fonctionnels (Smart et al., 2011).

L'injection d'EPDC dérivés de tissu humain, chez une souris atteinte d'infarctus, entraine l'amélioration de la fonction cardiaque ainsi que l'atténuation du remodelage cardiaque (Winter et al., 2007). A noter que les EPDC dérivées de l'homme, *in vitro*, peuvent subir une EMT et dans le même temps se différencier en CML (van Tuyn et al., 2007).

C. Régénération rénale et insuffisance rénale

Le rein possède également des cellules souches endogènes capables d'induire des phénomènes de régénération lors de dommages tissulaires (Duffield and Bonventre, 2005; Lin, Moran, and Igarashi, 2005).

Une première étude a démontré la présence de cellules souches adultes au niveau des tubules contournés proximaux. Le potentiel prolifératif de ces cellules augmente lors d'ischémie

(Maeshima, Yamashita, and Nojima, 2003). Chez l'homme, il a été également observé la présence de cellules souches au niveau de la capsule de Bowman (Sagrinati et al., 2006). Ces cellules sont appelées « Adult Parietal Epithelial Multipotent Progenitors » (APEMP). Leur injection par voie intraveineuse, chez la souris atteinte d'insuffisance rénale aigüe, permet la réparation du tissu endommagé par la régénération des segments du néphron proximal et distal et par la réduction de la nécrose. A noter qu'elles ne peuvent agir positivement sur la réparation tissulaire que lorsqu'elles sont injectées quelques heures après l'induction de l'insuffisance rénale (Sagrinati et al., 2006). Par ailleurs, il a été mis en évidence la présence d'APEMP dans les reins fœtaux humains. Leur nombre est considérablement réduit lors du développement et elles sont considérées comme les précurseurs des cellules tubulaires et des podocytes. Elles possèdent également une capacité régénérative beaucoup plus élevée que les APEMP dérivées des tissus adultes (Lazzeri et al., 2007).

D. Les freins à la thérapie cellulaire

Les cellules souches cardiaques et rénales sont donc une source thérapeutique attractive pour le traitement des pathologies ischémiques. Néanmoins, les deux principaux freins à la thérapie cellulaire sont :

- La mise au point des protocoles d'obtention des cellules souches d'un point de vue de l'homogénéité cellulaire et de la quantité des cellules cultivées ;
- L'établissement de la meilleure voie d'administration.

Ainsi, les populations de cellules souches provenant de mêmes organes peuvent être divisées en sous-population en fonction des marqueurs qu'elles expriment à leur surface. De ce fait, les études doivent se focaliser sur les sous-types de populations cellulaires, dans une même famille de cellules souches, afin de mieux maîtriser leurs propriétés de prolifération et de différenciation. Par ailleurs, il s'avère important de déterminer la « quantité » de cellules à injecter pour une pathologie donnée. En ce sens, les études doivent permettre d'établir les moyens par lesquelles il est possible de cultiver une quantité importante de cellules à des fins thérapeutiques. De plus, il faudrait également concentrer les recherches sur l'optimisation du taux de survie des cellules injectées. Finalement, les voies d'injections doivent également être optimisées. Il en existe deux principales dont la voie intraveineuse et la voie dans le

parenchyme de l'organe (par exemple intra-cardiaque). Cette dernière permettrait d'intégrer directement les cellules souches au sein du tissu endommagé.

PARTIE 2 : OBJECTIFS

Les maladies cardiovasculaires sont l'une des principales causes de mortalité dans le monde. De plus le système rénal est le premier à être touché lors de pathologies cardiaques. De ce fait, l'identification de nouvelles molécules susceptibles d'intervenir dans la réparation myocardique ou du tissu rénal ainsi que dans la croissance des vaisseaux sanguins représenterait une avancée considérable en thérapeutique.

Actuellement, les plus grandes cibles utilisées en thérapeutique sont les RCPG qui représentent une composante essentielle à la physiologie cardiaque et rénale. Cependant, peu d'études ont mis en avant, que ce soit dans le cœur ou le rein, le rôle des RCPG dans l'activité des cellules souches, la communication cellulaire et la néo-vascularisation. Plus particulièrement, dans le cœur, la communication cellulaire, jouerait un rôle indispensable dans le contrôle de la régénération cardiaque.

Dès lors, la voie de signalisation des prokinéticines, agissant par le biais de l'activation de RCPG, a déjà été révélée comme indispensable lors de l'infarctus du myocarde chez la souris. En ce sens qu'elle induit la protection des cardiomyocytes et l'induction de la néo-vascularisation du tissu cardiaque ischémique (Urayama et al., 2007; Urayama et al., 2008). A noter que le couple PK2/PKR1 est réduit chez les patients insuffisants cardiaques en stade terminal ce qui fait du système des prokinéticines un candidat idéal pour le traitement des maladies cardiovasculaires (Urayama et al., 2007).

Par ailleurs, la stimulation de la croissance des vaisseaux sanguins peut être initiée par le biais de cellules souches. Dans le cœur, l'épicarde apparaît être la source idéale de cellules souches dans le traitement des maladies cardiaques ischémiques. En effet, les EPDC jouent un rôle crucial dans la vasculogenèse cardiaque et dans la morphogenèse du cœur lors de la naissance. Plus particulièrement, l'activation de la voie de signalisation du récepteur PKR1, via l'action de son ligand la PK2, permet la stimulation des EPDC. Ainsi, elle agit sur la prolifération et la différenciation de ces dernières, en CML et cellules endothéliales, pour amplifier les phénomènes de vascularisation du myocarde (Urayama et al., 2008). Il est important de préciser que de nombreuses études expérimentales et cliniques, sur la transplantation de cellules souches au sein du myocarde lésé, ont donné des résultats prometteurs.

Mon projet de Doctorat devait répondre à deux principales questions :

- 1) Quel est le rôle de la voie de signalisation du récepteur PKR1 dans la fonction cardiaque et rénale ?
- 2) Quelle est la connexion cellulaire dépendante de la voie de signalisation PKR1 entre le cœur et le rein ?

Les objectifs suivants ont été définis :

- 1) Etudier le phénotype de deux souris mutantes portant :
 - une mutation systémique nulle du récepteur PKR1 par l'utilisation du système recombinaise Cre lié au promoteur CMV ;
 - une mutation nulle du récepteur PKR1 spécifique à l'épicarde par l'utilisation du système recombinaise Cre lié au promoteur GATA-5.
- 2) Caractériser le rôle potentiel de la voie de signalisation PKR1 dans l'activité des cellules progénitrices endogènes et dans les communications cellulaires cardiaques et rénales

PARTIE 3 : MATERIEL ET METHODE

I. Culture cellulaire

A. Culture d'une population hétérogène de cellules rénales cultivées à partir d'explants de reins néonataux

1. Isolation des cellules et induction de la prolifération

Les cellules rénales sont cultivées en population hétérogène après extraction des reins de souris néonatales. Les reins sont découpés en explant d'une taille inférieure à 1mm³, rincés au PBS et déposés sur une chambre de culture 8 puits, recouverts de 0,1% de gélatine, durant 4 jours dans du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) contenant du Glutamax, 4,5g/L de glucose, 15% FCS (Fetal Calf Serum), Pénicilline, Streptomycine. Après 4 jours de culture, les explants adhérents à la surface des puits et les cellules migrent en dehors de l'explant.

La prolifération est alors testée en synchronisant les cellules durant 12 heures dans du DMEM contenant du Glutamax, 4,5g/L de glucose, Pénicilline, Streptomycine. Après 12 heures, les cellules sont traitées avec ou sans PK2 5nM et 10nM pendant 24 heures. Les cellules sont ensuite fixées à l'aide de formaldéhyde 3.7% (Sigma Aldrich) durant 1 heure à 4°C puis les co-immunofluorescences indirectes sont effectuées.

2. Co-immunofluorescence indirecte

Les cellules fixées sont saturées à l'aide d'une solution de tampon de phosphate salin (PBS ou Phosphate Buffered-Saline) contenant 10% de sérum d'âne (Sigma Aldrich) et 0.05% de triton-X durant 1 heure à température ambiante suivie d'un lavage au PBS. Les cellules sont ensuite incubées à l'aide d'une solution de PBS contenant 1% de sérum d'âne, 0.05% de triton-X, 1/250 d'anticorps primaire de lapin anti epicardin (anti-Tcf21, abcam) et de chèvre anti Ki67 (Santa Cruz) durant la nuit à 4°C. Après l'incubation sur la nuit, les lames sont lavées au PBS puis incubées avec les anticorps secondaires anti lapin couplés au fluorophore Alexa 555 et anti chèvre couplés au fluorophore Alexa 488 (Invitrogen). Les lames sont ensuite montées grâce au milieu de montage Vectashield (Vector Laboratories) contenant du 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Les photos sont prises à l'aide d'un microscope en

fluorescence Leica DM 4000. L'acquisition des images s'est faite à l'aide du logiciel Leica Application Software Advanced Fluorescence (LAS AF). La quantification s'est faite par le comptage du nombre de cellules epicardin⁺ ou ki67⁺ normalisé par rapport au nombre de noyaux marqué au DAPI.

B. Culture d'une population homogène de cellules epicardin⁺ isolées à partir de tissus rénal et cardiaque

Le facteur epicardin est un facteur de transcription de type boucle-hélice-boucle. Il a été récemment démontré que la protéine BETA2/NeuroD, de la famille des facteurs de transcription de type boucle-hélice-boucle, nécessite les héparanes sulfates de protéoglycanes pour son attachement à la membrane (Noguchi et al., 2007). La protéine BETA2/NeuroD étant un facteur de transcription, cette étude démontre que cette protéine subit un trafic cellulaire. Ainsi, l'epicardin, faisant partie de la même famille de protéine, est exprimée au niveau cytoplasmique et nucléaire (Plotkin and Mudunuri, 2008). Nous avons voulu démontrer l'expression du facteur epicardin à la membrane des cellules epicardin⁺.

1. Isolation des cellules epicardin⁺

a. Biotynylation de l'anticorps

Les cellules epicardin⁺ des cœurs et reins de souris néonatales sont isolées en utilisant l'anticorps anti-POD-1 ou epicardin de Santa Cruz (sc-15006) qui reconnaît la partie N-terminale de la protéine epicardin. Cette anticorps est biotynilé par l'utilisation du kit « DSB-X Biotin Protein labeling » d'Invitrogen. L'anticorps est incubé durant 2 heures dans une solution contenant 1M de bicarbonate de sodium et de biotine succinimidyl ester DSB-X. Il est ensuite placé dans une membrane à dialyse avec une limite d'exclusion de 12kDa-14kDa. Le tout est incubé dans une solution de PBS durant 6 heures. Le lavage est renouvelé 3 fois. L'anticorps est aliquoté et conservé à -20°C.

b. Isolation des cellules

Les cœurs et reins sont extraits des souris néonatales puis découpés dans une solution enzymatique (116mM de chlorure de sodium (NaCl), 5.4mM de chlorure de potassium (KCl), 1mM de sodium dihydrogène phosphate (NaH_2PO_4), 0.8mM de sulfate de magnésium (MgSO_4), 5.5mM glucose, 20mM d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique ou HEPES) contenant 0.5mg/ml de collagénase de type V et 1mg/ml de pancréatine.

Le tissu est digéré durant 45 minutes à 37°C puis 20ml de DMEM contenant du Glutamax, 4,5g/L de glucose, 15% FCS, Pénicilline, Streptomycine sont ajoutés. Les cellules sont filtrées à travers un tamis cellulaire de 70µm de diamètre et centrifugées durant 5 minutes à 1900 rotation par minute (RPM).

Le culot cellulaire est suspendu dans 1 ml de tampon d'isolation (2% d'albumine de sérum bovin (BSA), 2mM d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA)) et un volume adéquat d'anticorps anti-epicardin couplé à la biotine est ajouté (1µg pour 10^6 cellules). Les cellules sont placées à 4°C pendant 20 minutes. Elles sont ensuite lavées à l'aide de 2ml de tampon d'isolation puis centrifugées.

Le culot est suspendu dans 1ml de tampon d'isolation et 85µl de dynabeads (Invitrogen) sont ajoutés pour permettre la sélection des cellules epicardin⁺. Après 30 minutes sous agitation, les cellules sont placées sur un aimant et les cellules aspécifiques sont éliminées. Un volume de 1ml de tampon de libération (Invitrogen) est ajouté et les cellules sont incubées 20 minutes à température ambiante sous agitation (Cf. figure 18 pour une schématisation du protocole).

Les cellules epicardin⁺ sont ensuite récupérées et cultivées sur des plaques contenant 6 ou puits, recouverts de 1% de gélatine, dans du DMEM contenant du Glutamax, 4,5g/L de glucose, 15% FCS, Pénicilline, Streptomycine durant 72 heures.

Les cellules rénales sont cultivées par la suite dans du DMEM contenant du Glutamax, 4,5g/L de glucose, 10% FCS, Pénicilline, Streptomycine.

Les cellules cardiaques sont cultivées dans du DMEM contenant du Glutamax, 4,5g/L de glucose, 15% FCS, Pénicilline, Streptomycine.

Les cellules sont cultivées jusqu'à confluence puis trypsinées pour les expériences de caractérisation et de différenciation.

2. Caractérisation de l'expression du facteur epicardin sur une population de cellules progénitrices rénales

a. Analyse par western blot

• Protocol expérimental

Après confluence, les cellules sont détachées à l'aide de 0.5% trypsine-EDTA (Invitrogen) pendant 5 minutes puis centrifugées à 1300 RPM durant 5 minutes. Les cellules sont suspendues dans 400µl de PBS froid puis à nouveau centrifugées et suspendues dans les tampons d'extraction :

- Cytoplasmique : 0.1% digitonin, 100mM NaCl, 300mM Sucrose, 10mM d'acide pipérazine- N, N' bis (2- éthane- sulfonique) ou PIPES pH6.8, 3mM de chlorure de magnésium (MgCl₂), 5mM EDTA, 2mM de sodium orthovanadate (Na₃VO₄), 50µM ammonium molybdate, inhibiteur de protéase ;
- Membranaire : 0.5% Triton-X-100, 100mM NaCl, 300mM sucrose, 10mM PIPES pH7.4, 3mM MgCl₂, 3mM EDTA, 2mM Na₃VO₄, 50µM ammonium molybdate, inhibiteur de protéase ;
- Nucléaire : 1% Tween-40, 100mM NaCl, 0.5% Sodium dodécyl sulfate (SDS), 10mM PIPES pH7.4, 1mM MgCl₂, 2mM Na₃VO₄, 50µM ammonium molybdate, inhibiteur de protéase ;

Pour les fractions membranaires et cytoplasmiques, les cellules sont incubées 5 minutes à 4°C puis centrifugées à 400g et 5000g, respectivement, durant 10 minutes. Le surnageant contenant les protéines est récupéré.

Pour la fraction nucléaire, les cellules sont homogénéisées dans la glace à l'aide d'une seringue 23G puis centrifugées à 7000g durant 10 minutes. Le surnageant contenant les protéines est récupéré. Les protéines sont utilisées par la suite pour l'analyse par western blot.

Après leur extraction, les protéines sont dénaturées dans un tampon de Laemmli 2xSDS à 100°C pendant 3 minutes. Un gel de séparation contenant 12% de polyacrilamide est préparé, coulé et polymérisé à température ambiante (acrylamide 12%, tris-chlorure d'hydrogène (HCl) pH8.8, dH₂O, SDS 20%, APS 10%, Temed). Le gel de concentration

(acrylamide, tris-Hcl pH6.8, SDS 20%, sodium persulfate (APS) 10%, Temed) est ensuite préparé, coulé puis polymérisé à température ambiante. Un volume adéquat de protéine est déposé puis le tout est migré à 80V pendant 30 minutes afin de permettre une entrée homogène de chaque échantillon dans le gel de séparation. La migration sur le gel de séparation se fait pendant 3 heures à 100V. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane polyvinylidene fluoride (PVDF), pendant 1 heure sous agitation à 4°C à 100V. La membrane est rincée avec du PBS additionné de 0.5% de Tween (PBS-T) puis saturée avec 50mL de tampon de saturation pendant 1 heure. La membrane est finalement incubée toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire de chèvre anti-epicardin (anti-TCF21, Santa Cruz). Le lendemain, la membrane est lavée avec du PBS-T puis incubée avec l'anticorps secondaire anti chèvre couplé à la peroxydase de raifort (Horse Radish peroxydase). La révélation se fait à l'aide d'une réaction de chemiluminescence grâce au kit « Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate » par exposition des membranes de PVDF sur des films photographiques.

- **Résultats obtenus**

L'analyse par Western blot des échantillons membranaires, cytoplasmiques et nucléaires extraits à partir des cellules epicardin⁺ a permis de confirmer la présence de la protéine epicardin à la fois sur la membrane cellulaire, la fraction cytoplasmique et nucléaire (Cf. figure 18). Elle confirme une précédente étude qui avait démontré l'expression de la protéine epicardin au niveau cytoplasmique et nucléaire (Plotkin and Mudunuri, 2008).

- b. **Analyse par immunofluorescence**

- **Protocol expérimental**

Les cellules ont été cultivées, directement après leur isolation sur une boîte de pétrie munie d'un fond en verre de 0.17µm d'épaisseur, recouverte de 1% de gélatine. Les cellules sont cultivées durant 72 heures dans du DMEM contenant du Glutamax, 4.5g/l de glucose, 15% FCS, Pénicilline, Streptomycine. Après 72 heures, le milieu est retiré et l'immunofluorescence est pratiquée sur cellules vivantes : Les cellules sont

- 1) saturées à l'aide d'une solution de PBS contenant 10% de BSA (Bovine Serum Albumine, Sigma Aldrich) pendant 1 heure à température ambiante ;
- 2) lavées et incubées avec l'anticorps primaire de chèvre anti-epicardin (anti-POD1, Santa Cruz reconnaît la partie N-terminale de la protéine) contenu dans une solution de PBS + 1% de BSA durant 1 heure à température ambiante ;
- 3) sont lavées et incubées avec la solution d'anticorps secondaires, contenant l'anticorps secondaire anti chèvre couplé à l'Alexa 488 et 1% BSA dans du PBS, durant 1 heure à température ambiante et dans le noir.

Les cellules sont ensuite analysées par microscopie confocale de type Leica SP5 à scanner résonnant. L'acquisition des images s'est faite à l'aide du LAS AF.

- **Résultats obtenus**

L'analyse par microscopie confocale, révèle l'expression du facteur de transcription epicardin à la surface des cellules epicardin⁺ (Cf. figure 18). Elle confirme les résultats obtenus par western blot qui a également démontré l'expression membranaire de la protéine epicardin.

c. **Analyse par FACS de la pureté de la population de cellules epicardin⁺ isolées des cœurs et reins de souris néonatales**

- **Protocol expérimental**

Les cellules sont détachées à l'aide de 0.05% trypsine-EDTA (Invitrogen) puis préparées pour l'analyse par FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) :

- Marquage extracellulaire : les cellules sont centrifugées à 1900 RPM pendant 5 minutes puis suspendues dans 200µl de PBS. Un volume adéquat d'anticorps de chèvre anti-epicardin (anti-POD1, Santa Cruz) est ajouté (0.5µg pour 10⁶ cellules) puis les cellules sont incubées 1 heure à 4°C. Elles sont lavées à l'aide de PBS, centrifugées et suspendues dans 200µl de PBS. Les anticorps anti-CD117-PE (c-Kit, Caltag Laboratories) et anti chèvre couplé à l'Alexa 488 (Invitrogen) sont ajoutés. Les cellules sont incubées 1 heure à 4°C dans le noir puis analysées par FACS et par le logiciel BD Cell Quest Pro (Becton-Dickinson Biosciences, Le Pont De Claix, France) ;

- Marquage intracellulaire : les cellules sont centrifugées 1900 RPM durant 5 minutes puis suspendues dans 200µl de formaldéhyde 1% et incubées 20 minutes à température ambiante. Elles sont lavées avec un tampon de marquage (2% BSA, 0.2% d'azide de sodium ou NaN₃) puis centrifugées. Le culot cellulaire est suspendu dans 200µl de tampon de perméabilisation (2% BSA, 0.2% NaN₃, 0.1% Saponine). Les anticorps chèvre anti-epicardin (anti-POD1, Santa Cruz) ou lapin anti WT-1 (Santa Cruz) sont ajoutés et les cellules sont incubées 1 heure à 4°C. Elles sont ensuite lavées avec le tampon de perméabilisation, centrifugées puis suspendues dans le même tampon. Les anticorps secondaire anti-chèvre ou anti-lapin couplés à l'Alexa 488 sont ajoutés. Les cellules sont incubées 1 heure à 4°C dans le noir. Elles sont ensuite lavées et analysées par FACS et par le logiciel BD Cell Quest Pro (Becton-Dickinson Biosciences, Le Pont De Claix, France).

- **Résultats obtenus**

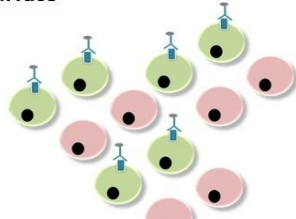
L'analyse par FACS a, dans un premier temps, permis de confirmer l'expression du facteur epicardin sur la membrane des cellules epicardin⁺. En effets, le marquage extracellulaire, n'utilisant pas de détergent, a mis en évidence que le pourcentage de cellules epicardin⁺ cardiaques et rénales était de l'ordre de 60.80% (±4.52%) et 48.06% (±4.98%), respectivement, après isolation par la méthode des billes immunomagnétiques (Cf. figure 18). Ces résultats confirment ce que nous avons révélé précédemment : l'expression de la protéine epicardin à la membrane cellulaire.

Par ailleurs, ce même marquage a démontré la présence d'une sous-population de cellules epicardin⁺ exprimant le facteur c-Kit. En effet, 2.05% (±0.19%) et 2.61% (±0.78%) des cellules epicardin⁺ rénales et cardiaques, respectivement, exprimaient le facteur c-Kit (Cf. figure 18).

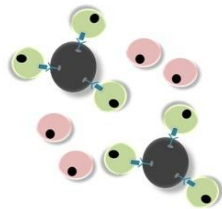
Afin de tester la pureté de la population cellulaire étudiée nous avons effectué un marquage intracellulaire à l'aide de détergent. Le marquage intracellulaire des cellules epicardin⁺ cardiaques a démontré que 97.38% (±0.14%) des cellules exprimaient le marqueur epicardin alors que 95.19% (±0.30%) exprimaient le marqueur WT1. Concernant les cellules epicardin⁺ rénales, 96.12% (±0.26%) et 93.72 % (±0.54%) exprimaient les facteurs epicardin et WT1, respectivement (Cf. figure 18). Ces résultats ont permis de valider cette méthode d'extraction des cellules epicardin⁺.

A

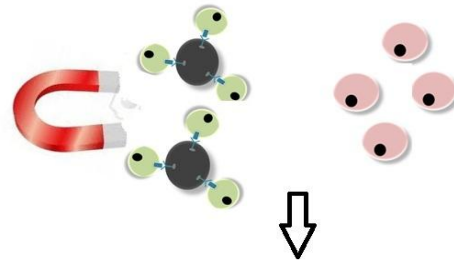
1. Incubation du produit issu de la digestion tissulaire avec les anticorps anti-epicardin biotinylés qui se lient aux protéines en surface



2. Ajout des billes immunomagnétiques qui se lient à l'anticorps biotinylé

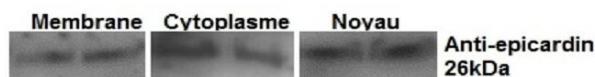


3. Séparation des cellules epicardin+ des autres cellules à l'aide d'un aimant, Libération à l'aide d'un tampon et culture

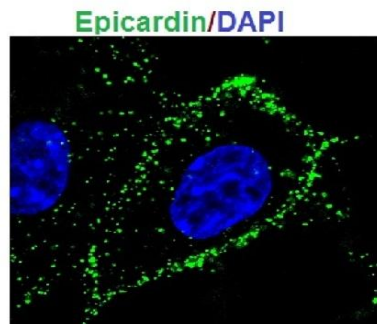


Caracérisation et étude de l'activité

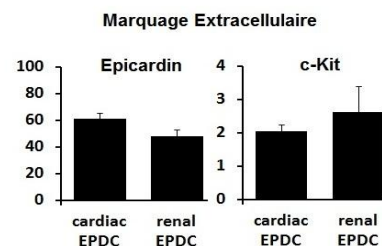
B



C



D



E

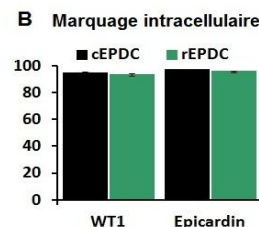


Figure 18. Protocole d'isolation des cellules epicardin⁺ et caractérisation

A) Protocole d'isolation ; B) Analyse de l'expression protéique du facteur de transcription epicardin par western blot sur des fractions membranaires, cytoplasmiques et nucléaires extraites de cellules epicardin⁺ ; C) Détection du facteur epicardin sur des cellules progénitrices vivantes par immunofluorescence indirecte puis analyse en microscopie confocale ; D et E) Analyse par FACS du pourcentage de cellules epicardin⁺, c-Kit⁺ et WT1⁺. Marquage extracellulaire (D) et intracellulaire (E) des cellules epicardin⁺ après isolation par les billes immunomagnétiques.

d. **Analyse de l'expression génique par PCR semi-quantitative**

- **Extraction des ARN sur les échantillons cellulaires**

La purification des ARN totaux à partir des échantillons cellulaires est effectuée par ajout de 1ml de tampon de lyse contenant du thiocyanate de guanidine. Le lysat cellulaire est incubé 5 minutes à température ambiante puis transféré dans des tubes eppendorfs. Un volume de 50µL de BAN est ajouté puis les lysats sont centrifugés pendant 15 minutes à 12000 RPM. La phase aqueuse est récupérée et lavée à l'aide de 500µl d'isopropanol. Le tout est incubé 10 minutes à température ambiante puis centrifugé 10 minutes à 12000 RPM à 4°C. Le culot d'ARN est récupéré et lavé à l'aide d'éthanol 80% contenu dans de l'eau traitée au diethyl pyrocarbonate (DEPC). Le tout est centrifugé 5 minutes à 7500 G. Le surnageant est éliminé, l'ARN est séché à l'air libre et dissout dans un volume adéquat d'eau traitée au DEPC.

La concentration des ARN après extraction est estimée en mesurant l'absorbance optique à 260nm ($1 A_{260} =$ concentration de 40µg/L). La formule $40\mu\text{g/ml} \times A_{260} \times \text{facteur de dilution}$ est utilisée pour le calcul de chaque concentration. Le profil des ARN est visualisé par électrophorèse sur un gel d'agarose 2.5% contenant du bromure d'éthidium. Deux bandes d'ARN ribosomales 25s et 18s sont identifiées à 3.3Kb et 1.6Kb, respectivement.

- **Retrotranscription des ARN**

Avant la rétro transcription, chaque échantillon d'ARN est traité par une endonucléase pour éliminer toute contamination par l'ADN génomique. On utilise le Kit « Dnase I RNase Free » de Fermentas. L'activité enzymatique est dépendante de la présence d'ions calcium, Mg^{2+} , Mn^{2+} . Le mélange, ARN 5µg, tampon 10x 2.5µL ; DEPC H_2O qsp 25µL, Dnase I (2U/µg) 2.5µL, est incubé à 37°C pendant 30 minutes. L'arrêt de la réaction est fait grâce à l'ajout de 2.5µL EDTA à 25mM à 65°C.

La rétro transcription est ensuite réalisée en utilisant le kit « Superscript II reverse transcriptase (RT) » (Invitrogen, 200U/µl). Les échantillons d'ARN traités auxquels sont ajoutés les Oligo-dT et les désoxynucléotide triphosphate (dNTP) sont incubés 5 minutes à 65°C. Les échantillons sont transférés rapidement dans la glace puis 4µl de tampon + 2µl de Dithiothreitol (DTT) sont ajoutés. Le tout est incubé à 42°C pendant 2 heures. Un volume de

1µL de RT est ensuite additionné au mélange précédent. Le tout est laissé 50 minutes à 42°C suivi d'une étape de 15 minutes à 72°C.

- **PCR semi quantitative**

La réaction en chaîne de la polymérase (Polymerase Chain Reaction, PCR) assure une amplification exponentielle et sélective d'un fragment d'ADN. A 2µL de la réaction de matrice sont ajoutés 23 µL du mélange suivant : 2.5 µL de tampon de la Taq acide désoxyribonucléotide (ADN) polymérase 10X contenant du MgCl₂ (Fermentas); 0.25µL d'un mélange de dNTP (10 mM chacun) ; 0,1µg/ µL pour chacune des deux amorces 5' et 3' utilisées (Sigma Aldrich) ; 0.25µl de l'enzyme Taq ADN polymérase (Fermentas). La réaction est complétée à 23µL avec de l'eau milliQ autoclavée. La réaction est effectuée dans des conditions différentes selon les séquences des oligonucléotides utilisées (Cf. tableau 4). Une première étape de dénaturation du double brin d'ADN à 94°C, pendant 5 min ; un cycle de 3 étapes répétés 30 à 45 fois selon la nature de la matrice à amplifier : dénaturation 30 secondes à 1 minute ; 94°C hybridation amorce-matrice de 30 secondes à 1minute à une température dépendante de la température d'hybridation (T_m ou T_m - 4°C); élongation de l'amplicon (1 min pour une synthèse de 1000 pb environ) à 72°C. La réaction s'achève par une élongation finale de 10 minutes à 72°C. Les produits PCR sont séparés sur un gel d'agarose 2 % (p/v) - tris acétate EDTA (TAE) 0,5X.

Tableau 4. Séquences des oligonucléotides utilisés pour l'analyse de l'expression des gènes des cellules epicardin⁺

Gène		Séquence 5' – 3'
GAPDH	Foward	5' TCGGGCCGGTGCTGAGTA
	Reverse	5' CCACAGTCTTCTGGGTGGCAGTG
SMAD1	Foward	5' CGTCCAACAATAAGAACCGCTT
	Reverse	5' CACGGATGAAATAGGATTGTGG
EPICARDIN	Foward	5' TGCTGAGCAAGGCCTTCTCC
	Reverse	5' TGGCGGTCACCACTTCCTT
GATA-5	Foward	5' CGACGTAGCCCCTTCGTGG
	Reverse	5' GCCACAGTGGTGTAGACAG
c-Myc	Foward	5' CTCCTCGAGCTGTTTGAAGGC
	Reverse	5' TGAAGGTCTCGTCGTCAGGATC
FOXD1	Foward	5' CTGGTGAAGCCTCCCTACTC
	Reverse	5' GCCGTTGTGGAACATGTCTG
Tbx5	Foward	5' CGCAGGGCCAGGGCACACCA
	Reverse	5' GCCAGAGACACCATTCTTCAC

- **Résultats obtenus**

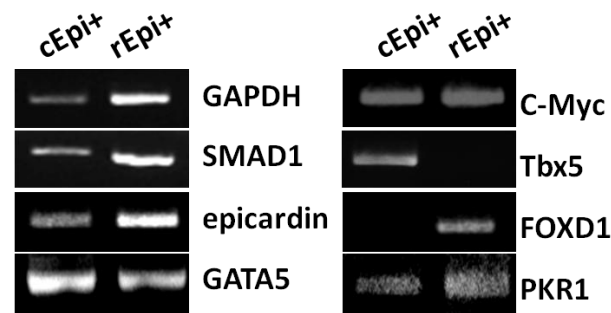


Figure 19 Analyse de l'expression génique des gènes *Gapdh*, *Smad*, *Epicardin*, *Gata5*, *c-myc*, *Foxd1*, *Tbx5*, *Pkr1* sur des échantillons de cellules epicardin⁺ cardiaques (cEpi⁺) et rénales (rEpi⁺).

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ; *SMAD1* : Mothers against decapentaplegic homolog 1 ; *FOXD1* : forkhead box D1.

3. Protocol de différenciation

a. Vasculogénèse

Les cellules sont détachées puis mises en culture dans une chambre de culture 8 puits, recouverte de 1% de gélatine, à une densité de 10⁴ cellules par puits, dans du DMEM contenant du Glutamax, 4.5g/l de glucose, 10% FCS, Pénicilline, Streptomycine pendant 72 heures. Après 72 heures, le DMEM contenant du Glutamax, 4.5g/l de glucose, 2% FCS (cellules cardiaques) ou sans FCS (cellules rénales), Pénicilline, Streptomycine est renouvelé. Les cellules sont traitées avec ou sans PK2 5nM et 10nM pendant 24 heures (à l'exception de la différenciation en cellules endothéliales des cellules epicardin⁺ cardiaques qui est maintenue pendant 72 heures). Les cellules sont ensuite fixées à l'aide de formaldéhyde 3.7% (Sigma Aldrich) et sont utilisées pour une immunofluorescence indirecte.

L'immunofluorescence indirecte standard ciblant les cellules endothéliales a déjà été décrite précédemment. L'anticorps primaire employé est un lapin anti récepteur 2 du VEGF (VEGFR2, Abcam) et l'anticorps secondaire employé est un anti lapin couplé à l'Alexa 488 ou 555.

Pour les anticorps monoclonaux de souris anti α -SMA ciblant les CML, il a été nécessaire de saturer les immunoglobulines de souris endogènes avec le kit d'immunodétection Vector® Mouse-on-Mouse. Les cellules fixées sont incubées pendant 1 heure dans la solution M.O.M.™ Mouse Ig Blocking Reagent (0.1% triton-X, 1/100 Mouse IgG blocking reagent). Les cellules sont lavées au PBS puis incubées pendant 5 minutes dans la solution de travail M.O.M.™ Diluent (0.1% triton-X, 1/20 MOM protein concentrate) L'excès de M.O.M.™ Diluent est enlevé des lames contenant les cellules puis l'anticorps primaire mouse anti α -SMA (Sigma Aldrich) est dilué dans le M.O.M.™ Diluent à une concentration appropriée. L'anticorps primaire est incubé sur la nuit à 4°C. Les cellules sont lavées à l'aide de PBS puis incubées avec la solution de M.O.M.™ Biotinylated Anti-Mouse IgG Reagent durant 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont lavées au PBS et incubées à l'aide d'avidine fluorescéine DCS (kit M.O.M.™) pendant 15 minutes. Les lames sont ensuite lavées puis montées grâce au milieu de montage Vectashield (Vector Laboratories) contenant du DAPI.

Les photos sont prises à l'aide d'un microscope en fluorescence Leica DM 4000. L'acquisition des images s'est faite à l'aide du logiciel LAS AF. La quantification s'est faite par le comptage du nombre de cellules endothéliales VEGFR2⁺ ou du nombre de CML α -SMA⁺ normalisé par rapport au nombre de noyau DAPI.

b. Adipogenèse

Les cellules sont détachées puis mises en culture dans une chambre de culture 8 puits, recouverts de 1% de gélatine à une densité de 2×10^4 cellules dans du DMEM contenant du Glutamax, 4.5g/l de glucose, 10% FCS, Pénicilline, Streptomycine, pendant 72 heures. Quatre conditions sont utilisées :

- Une condition contrôle sans aucun traitement ;
- Une condition PK2 avec un traitement de 5nM à la PK2 la veille du jour 4 et 10 d'induction d'adipogenèse ;
- Une condition MIX où la différenciation est induite au jour 4 par un traitement contenant 0.25 μ M dexamethasone ou DMX ; 0.5mM isobuthylxanthine ou IBMX et

10µg/mL d'insuline pendant 48h. Au jour 6, le milieu est changé et 10µg/ml d'insuline sont ajoutés. Au jour 8, le milieu est changé et les cellules sont cultivées pendant 2 jours sans traitement. Les mêmes traitements sont effectués dans l'ordre au Jour 10, Jour 12 et 14 ;

- Une condition PK2⁺MIX qui est identique à la condition MIX à la différence que les cellules subissent des prétraitements à la PK2 la veille des traitements au DMX, IBMX et insuline soit les jours 3 et 9.

Après la fin de la différenciation, les cellules sont fixées au formaldéhyde 3.7% (Sigma Aldrich) puis marquées à l'oil red (0.5mg/mL d'oil red dans 100% d'isopropanol puis dilution de la solution stock pour obtenir une solution à 60% isopropanol). L'acquisition des images s'est faite à l'aide d'un microscope inversé équipé d'un objectif 40x. La quantification s'est faite par le comptage du nombre de cellules contenant des gouttes lipidiques colorées à l'oil red normalisé par rapport au noyau DAPI.

c. Cardiomyogenèse

Les cellules epicardin⁺ cardiaques sont détachées à l'aide de 0.05% trypsine-EDTA (Invitrogen) puis mises en culture dans des chambres de cultures 8 puits recouvertes de 1% de gélatine dans du DMEM contenant du Glutamax, 4.5g/l de glucose, 15% FCS, Pénicilline, Streptomycine. Les cellules sont cultivées 72 heures jusqu'à adhésion complète et le milieu de différenciation contenant 10mM Glycérophosphate (Sigma Aldrich), 50µg/ml Acide Ascorbique (Sigma Aldrich), 1µM de DMX (Sigma Aldrich) est ajouté. Il sera nommé CM.

Trois conditions ont été utilisées :

- CM comprenant le milieu de différenciation
- CM + PK2 : comprenant le milieu de différenciation + 10nM de PK2
- CM+FGF : comprenant le milieu de différenciation + 25ng/ml de FGF-2
- CM+PK2+FGF : comprenant le milieu de différenciation + 10nM PK2 + 25ng/ml de FGF-2

Le milieu est changé toutes les 48 heures durant 30 jours. Après les 30 jours de culture, les contractions cellulaires sont recherchées et mesurées par un vidéo microscope Leica DM

IRE2 inversé en contraste de phase équipé d'un objectif 20x, et d'une chambre d'acquisition et de contrôleurs de température. L'acquisition des images s'est faite par le logiciel MetaMorph d'Universal Imaging, toutes les 10 millisecondes pour un total de 400 à 800 frames. Les mesures de contraction ont été faites à l'état basal ou avec un traitement à la dobutamine 1 μ M. Après acquisition des images, le temps de contraction est ramené en battements par minute grâce au logiciel imageJ.

Après la mesure des contractions, les cellules sont fixées à l'aide de formaldéhyde 3.7% (Sigma Aldrich). Par la suite, la présence des filaments α -actine cardiaques ont été détectés à l'aide d'une immunofluorescence indirecte standard décrite précédemment. L'anticorps primaire utilisé est un souris anti α -actine cardiaque et l'anticorps secondaire est un anti souris couplé à l'Alexa 555. Les photos sont prises à l'aide d'un microscope en fluorescence Leica DM 4000. L'acquisition des images s'est faite à l'aide du logiciel LAS AF.

II. Travail in vivo

A. Génération des souris PKR1^{-/-}

La génération des souris hétérozygotes contenant des sites LoxP localisés entre les sites 5' et 3' de l'exon II de l'ADN génomique du GPR73 (PKR1) a été effectuée à l'Institut Clinique de la Souris (Illkirch). L'ADN génomique du gène codant pour PKR1 (GPR73) a été obtenu du Dr. Hetzog (Australie). Pour générer les souris KO conditionnel, une stratégie a été élaborée afin d'introduire différentes séquences : les sites loxP et la cassette de résistance à la néomycine. Cette dernière code pour une enzyme qui inactive la néomycine et ses dérivés qui sont létales pour les cellules animales, ce qui permet une sélection positive des cellules traitées à la néomycine. Un plasmide pneo-frt-GPR73-stepfi est généré en clonant le gène *Gpr73* sur un vecteur de ciblage. Afin d'obtenir une inactivation conditionnelle du gène *Gpr73* les CSE sont électroporées de vecteur de ciblage contenant les sites LoxP localisés au niveau de l'intron en amont de l'exon II et le deuxième site LoxP lié à la cassette néomycine est localisé au niveau de l'intron en aval de l'exon II. Les colonies résistantes à 350 μ g/ml de Geneticine sont déterminées par southern blot. Les mâles chimériques dérivés des cellules embryonnaires cibles transmettent l'allèle GPR73 flanqué à leur lignée germinale GPR73^{L3/+}. Pour obtenir une invalidation du gène *Pkr1*, ces souris ont été croisées avec des souris transgénique

exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur cytomégalo virus (CMV). Ce croisement a donné lieu à la génération d'une souris mutante hétérozygote $GPR73^{L+/-}$. Ces dernières ont été inter-croisées pour permettre l'invalidation du gène *Gpr73* de façon homozygote donnant lieu à la génération de souris $GPR73^{L-/-}$. Les souris ont été génotypées par PCR à l'aide de primer spécifique (Cf. Tableau 5). L'expression de PKR1 est ensuite contrôlé par l'extraction des ARN des cœurs WT et $PKR1^{-/-}$, leur retrotranscription et l'analyse par RT-PCR (Cf. figure 20).

Tableau 5. Séquences des oligonucléotides utilisés pour le génotypage des souris $PKR1^{-/-}$

Gène		Séquence 5'-3'
PKR1	Foward	5' TCTGGGTGAGAATACCACCAG
	Reverse	5' GAGACGGTACGCCAAGTAGTT
973	Foward	5' GTGTTACACAGGGATTGGGGTTTAG
828	Reverse	5' GGGTGTGAGGTGGGATTAAGTCAC
826	Foward	5' GACTGGACATCTAGTGGTTAGTCAGG

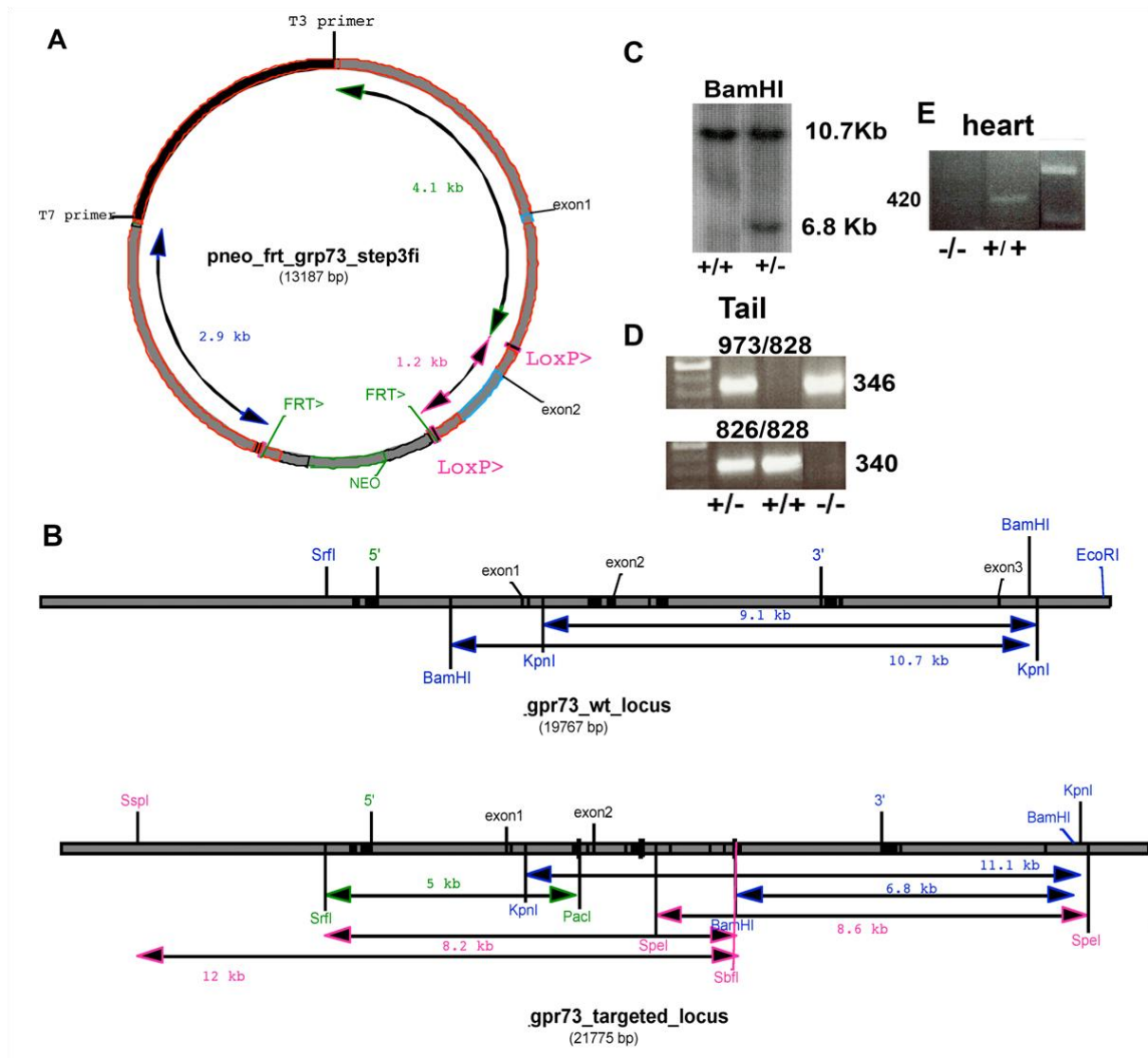


Figure 20. Génération des souris $PKR1^{-/-}$.

A) Vecteur de ciblage comportant l'exon II du gène GPR73 flanqué des sites LoxP. B,C) La recombinaison homologue du vecteur d'inactivation dans les CSE est mise en évidence par Southern Blotting (C) en clivant leur ADN génomique par l'enzyme BamHI. Cette digestion génère un fragment de 6.8 Kb correspondant à l'allèle muté et un fragment de 10.7Kb qui correspond à l'allèle sauvage. D) Génotypage des queues de souris avec les oligonucléotides cités ci-dessus spécifiques pour les souris Wild Type (WT) (826/828) et $PKR1^{-/-}$ (973/828). E) RT-PCR des ARN extrait de cœurs WT et $PKR1^{-/-}$ démontrant la délétion de $PKR1$ dans les cœurs $PKR1^{-/-}$ (Urayama et al., 2008)

B. Génération des souris epi-PKR1^{-/-}

La génération des souris homozygotes dite GPR73^{L2/L2} contenant des sites LoxP localisés entre les sites 5' et 3' de l'exon II de l'ADN génomique du GPR73 (PKR1) a été effectuée à l'Institut Clinique de la Souris (Illkirch). Pour obtenir une invalidation du gène spécifiquement au niveau de l'épicarde, les souris GPR73^{L2/L2} ont été croisées avec une lignée de souris exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur GATA-5 (provenant du Dr. Ruiz-Lozano). Les génotypes obtenus ont été les suivants : 50% GATA5-Cre⁺/GPR73^{L2/+} et 50% GATA5-Cre⁻/GPR73^{L2/-}. Les souris GATA5-Cre⁺/GPR73^{L2/+} sont à nouveau croisées avec la lignée GPR73^{L2/L2} et les génotypes obtenus dans la même proportion sont GATA5-Cre⁺/GPR73^{L2/+}; GATA5-Cre⁻/GPR73^{L2/+}; GATA5-Cre⁺/GPR73^{L2/L2}; GATA5-Cre⁻/GPR73^{L2/L2}. Les souris GATA5-Cre⁺/GPR73^{L2/L2} sont à nouveau croisées avec la lignée GPR73^{L2/L2} et deux génotypes aux mêmes proportions sont obtenus : GATA5-Cre⁺/GPR73^{L2/L2}; GATA5-Cre⁻/GPR73^{L2/L2}. La première correspondant au génotype mutant et appelée epi-PKR1^{-/-} et la seconde comme souris sauvage appelé WT. Les génotypes sont caractérisés à l'aide de primer spécifique reconnaissant les sites floxés ainsi que l'expression de la Recombinase Cre (Cf. Tableau 6 et figure 21).

Tableau 6. Séquences d'oligonucléotides utilisés pour le génotypage des souris epi-PKR1^{-/-}

Gène		Séquence 5'-3'
Cre	Foward	5' ATCTTCCAGCAGGCGCACCATTGCCCCTGT
	Reverse	5' TGACGGTGGGAGAATGTTAATCCATATTGG
828	Reverse	5' GGGTGTGAGGTGGGATTAAGTCAC
826	Foward	5' GACTGGACATCTAGTGGTTAGTCAGG



Figure 21. Génotypage des souris WT et epi-PKR1^{-/-}.

Cre correspond aux bandes de la Recombinase Cre ; 826/828 correspond aux allèles du gène codant Gpr73 floxés ; L2 : présence des allèles flanqués en homozygote ^{+/+}, hétérozygote ^{+/-} ou non flanqué ^{+/+}.

C. Coloration des tissus

1. Coupes des tissus avant coloration

a. Coupes paraffines

Les cœurs et reins sont extraits des souris néonatales (après décapitation) et de 24 semaines (après dislocation cervicale) puis sont fixés dans du liquide de Bouins sous agitation à température ambiante ; déshydratés dans des bains d'alcool de degré croissant (70°C à absolue) ; infiltrés par de l'Histosol et inclus dans la paraffine. Des coupes longitudinales de 5μM d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome.

b. Cryocoupes

Les cœurs ou reins sont extraits des souris néonatales (après décapitation) ou de 24 semaines (après dislocation cervicale) et inclus dans une matrice de soutien (Shandon Cryomatrix,

ThermoFisher) puis congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C. Des coupes longitudinales ou transversales de 5µM d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un cryostat à une température de -20°C.

2. Coloration au trichrome de Mallory

Les colorations au trichrome de Mallory sont effectuées au service d'histologie de l'IGBMC.

3. Coloration à l'oil red

Les cryocoupes de 5µm sont fixées à l'aide de formaldéhyde 3.7% (Sigma Aldrich) durant 30 minutes puis rincées 3 fois 1 minutes à l'eau distillé. Les coupes sont ensuite colorées à l'aide d'une solution de triethyl phosphat 36% (Sigma Aldrich) contenant 0.5% d'oil red (Sigma Aldrich) durant 30 minutes. Les lames sont rincées à l'eau distillée puis contre colorées à l'hématoxyline (1/100) durant 5 minutes. Elles sont ensuite montées entre lame et lamelle à l'aide d'un milieu de montage aqueux. Les photos sont prises au microscope droit Leica DM 2500 B équipé d'un objectif à immersion 100x. L'acquisition des images est faite à l'aide du logiciel LAS AF.

Les gouttelettes lipidiques sont quantifiées à l'aide du logiciel imageJ. L'image 32bits est convertie en noir et blanc, le threshold de chaque image est ajusté et le nombre de spot est quantifié automatiquement

4. Coloration au « Succinate Déshydrogénase » (SDH)

Les lames de 5µm sont séchées et trempées dans une solution de travail (0.2M potassium hydrogénophosphate (KH₂PO₄), 0.2M de sodium hydrogénophosphate (Na₂HPO₄), 0.2M de sodium succinate, 10mg/ml de Nitro blue Tétrazodium, pH 7.35) à 37°C durant 10 minutes puis lavées à l'eau distillé. Les lames sont ensuite déshydratées dans des bains d'alcool croissant (95°-95°-100°) puis d'Histosol. Les lames sont montées à l'aide d'un milieu de

montage aqueux. Les photos sont prises au microscope droit Leica DM 2500 B équipé d'un objectif à immersion de 100x. L'acquisition des images est faite à l'aide du logiciel LAS AF.

Par la suite, l'intensité de couleur est analysée à l'aide du logiciel imageJ par la mesure de la « mean gray value » qui est normalisée par le biais d'une photo de référence d'un champs n'incluant pas le tissu coloré afin de soustraire tout bruit de fond.

5. Analyse en coupe par microscopie électronique

Les cœurs et reins sont extraits des souris néonatales (après décapitation) ou de 24 semaines (après dislocation cervicale) puis fixés par immersion au glutaraldehyde. Les tissus sont ensuite préparés (post-fixés au tetroxide d'osmium et inclus dans une résine epoxy) et analysés à l'IGBMC par le service de microscopie électronique.

D. Analyses fonctionnelles

1. Electrocardiogramme (ECG)

Les animaux de 24 semaines sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane. Les ECG sont réalisés par l'utilisation d'un électrocardiographe ECG-9620 (Nihon Kohden). L'enregistrement de l'activité cardiaque est détecté par des électrodes piquées en sous-cutané.

2. Echocardiographie

Les analyses échocardiographiques sont effectuées afin de mesurer les fonctions diastolique et systolique à 24 semaines. Les mesures sont réalisées à l'aide d'un échographe Sonos 5500 et d'une sonde échographique à haute fréquence 15MHz. Les images sont enregistrées en mode M et en mode 2D.

3. Cage métabolique

Les animaux de 24 semaines sont placés dans les cages à métabolisme durant 48 heures afin de les habituer. Le jour lors duquel doit commencer le recueil de l'urine et la mesure des divers paramètres (diurèse des 24h, prise d'eau et de nourriture), les composants des cages sont remplacés par de nouveaux composants siliconés, afin de permettre l'écoulement total de l'urine. Les recueils d'urine (ml), de prise de nourriture (g) et d'eau (ml) se font après 24 heures en cage à métabolisme.

L'urine est centrifugé puis conservé à -20°C jusqu'au date des analyses urinaires prévues.

4. Analyse urinaire et sanguine

Les analyses des urines se font sur les échantillons récoltés lors de la mise en cage métabolique des souris de 24 semaines.

Pour les prélèvements sanguins, les souris ont subi une injection intra-péritonéale de pentobarbital (0.1mg/g). Après endormissement total des souris, le sang est prélevé à l'aide d'une seringue 23G hépariné par ponction cardiaque. Le sang est recueilli dans des tubes eppendorfs héparinés pour analyses.

L'institut clinique de la souris (Illkirch) a été en charge de l'analyse des échantillons urinaires et sanguins.

5. Ligature de l'artère coronaire gauche descendante

Les souris sont endormies à l'aide d'isoflurane 4% (Forène, Abott) puis l'intubation oro-trachéale est réalisée. La pression partielle en isoflurane est ramenée à 1.5%. Les animaux sont ventilés grâce à un respirateur tout le long de l'opération. La paroi thoracique est épilée, désinfecté et la peau et les muscles sont incisés de façon à pouvoir effectuer une thoracotomie. Après dégagement du cœur, la ligature de l'artère coronaire gauche

descendante s'effectue à l'aide d'un fil non résorbable : le ventricule gauche n'est alors plus irrigué. La mortalité des souris est contrôlée durant 56 jours.

E. Extraction des lipides par la méthode Folch

Les cœurs et reins des souris néonatales et de 24 semaines sont extraits puis immerger dans un mélange de chloroforme : méthanol (2 :1) puis les tissus sont homogénéisés à l'aide d'un potter. Le mélange obtenu doit se constituer uniquement d'une phase dans le cas contraire le même mélange de solvant est ajouté jusqu'à obtention d'une seule phase. L'homogénat est incubé durant 20 minutes à température ambiante puis centrifugé pour éliminer les agrégats tissulaires. Le surnageant est récupéré et mélangé à un volume de 0.2x d'une solution de sérum physiologique (0.9% NaCl). Le mélange est centrifugé à 2000 RPM pour séparer la phase aqueuse de la phase organique. La phase supérieure est récupérée et évaporée à l'aide d'un ballon évaporateur. Les lipides secs sont ensuite pesés pour quantifier les lipides cardiaques ou rénaux.

F. Isolation des cardiomyocytes

1. Extraction des cardiomyocytes

Les cœurs sont isolés à partir de souris néonatales et de 24 semaines. Les ventricules sont sectionnés et placés dans une solution tampon (116mM NaCl, 5.4mM KCl, 1mM NaH₂PO₄, 0.8mM MgSO₄, 5.5mM glucose, 20mM HEPES) contenant 0.5mg/ml de collagénase de type V et 1mg/ml de pancréatinine. Les tissus sont incubés pendant 30 minutes, centrifugés et le culot tissulaire est à nouveau placé dans la solution de digestion enzymatique (étape répétée 2 fois). Les surnageant récoltés sont placés dans un milieu contenant 20% FCS et centrifugés à 1900 RPM durant 5 minutes. Le culot cellulaire est suspendu dans du milieu contenant 20% de FCS et les cellules sont placées dans une plaque 6 puits pendant 2 heures afin de séparer les cardiomyocytes des autres types cellulaires.

2. Mesure de la contractilité

Les cardiomyocytes néonataux sont placés, directement après leur isolation, dans une chambre de culture 8 puits recouverte de 1% de gélatine et cultivés durant 5 jours dans du DMEM contenant du Glutamax, 4,5g/l de glucose, 15% FCS, Pénicilline, Streptomycine, jusqu'à apparition des contractions. Les contractions sont mesurées par un vidéo microscope Leica DM IRE2 inversé en contraste de phase équipé d'un objectif 20x, et d'une chambre d'acquisition et de contrôleurs de T°. L'acquisition des images s'est faite par le biais du logiciel MetaMorph d'Universal Imaging, toutes les 10 millisecondes pour un total de 400 à 800 frames. Les mesures de contraction ont été faites à l'état basal ou avec un traitement à la dobutamine allant de 0.1µM à 1µM. Après acquisition des images les temps de contraction est ramené en battements par minute grâce au logiciel imageJ

3. Mesure de la taille

Pour les cardiomyocytes extraits des cœurs de souris de 24 semaines, les images sont acquises à l'aide d'un microscope de type inversé équipé d'un objectif 40x. L'acquisition des images s'est faite à l'aide du logiciel LAS AF. L'aire des cardiomyocytes a été mesurée par l'utilisation du logiciel imageJ en pixel.

4. Milieu conditionné

Les cellules epicardin⁺ cardiaques sont isolées à partir des cœurs néonataux des souris WT et epi-PKR1^{-/-} après génotypage. Les cellules sont cultivées jusqu'à confluence puis le milieu est changé toutes les 24 heures. Les cardiomyocytes sont isolés, selon le protocole page, puis mis en culture dans une chambre de culture 8 puits recouverts de 1% de gélatine dans du milieu conditionné provenant des cellules epicardin⁺ WT et epi-PKR1^{-/-}. Le milieu est changé après adhésion complète des cardiomyocytes puis toutes les 24 heures jusqu'à contractilité (généralement 5 jours). La mesure des contractions s'est faite selon le protocole décrit précédemment.

G. Milieu conditionné/H5V

Les cellules endothéliales cardiaques H5V sont détachées à l'aide de 0.05% de trypsine-EDTA (Invitrogen) puis cultivées dans des plaques 12 puits dans du milieu conditionné provenant de cellules epicardin⁺ cardiaques. Les cellules sont cultivées de 24 heures à 48 heures (la densité initiale correspond à 10⁴ cellules par puits). Le contrôle utilisé est le DMEM contenant du Glutamax, 4.5g/l de glucose, 15% FCS, Pénicilline Streptomycine. La prolifération cellulaire est mesurée par comptage manuel après détachement des cellules à la trypsine-EDTA.

H. Extraction des glomérules

Les glomérules sont extraits à partir des reins de souris néonatales (après décapitation) et de souris de 24 semaines (après dislocation cervicale). La méthode se base sur la taille du glomérule de l'ordre de 73µm chez la souris. Les reins sont digérés à l'aide d'une solution enzymatique (116mM NaCl, 5.4mM KCl, 1mM NaH₂PO₄, 0.8mM MgSO₄, 5.5mM glucose, 20mM HEPES) contenant 0.5mg/ml de collagénase de type V et 1mg/ml de pancréatine durant 15 minutes à 37°C afin de ne pas dissocier les glomérules. Le tissu digéré est filtré à l'aide d'un premier filtre de 250µm puis 150µm afin d'éliminer les débris large. Le tissu digéré restant est ensuite filtré à l'aide d'un filtre de 70µm afin d'éliminer les petits débris (cellules...). Les glomérules sont récupérés sur le filtre de 70µm.

1. Taille des glomérules à 24 semaines

Après leur récupération sur le filtre de 70µm, les photos de glomérules, isolés des reins à l'âge de 24 semaines, sont prises à l'aide d'un microscope inversé équipé d'un objectif 40x. L'acquisition des images s'est faite pas le logiciel LAS AF. La mesure de la taille des glomérules s'est faite à l'aide du logiciel imageJ en pixel.

2. Isolation des cellules endothéliales glomérulaires

Les glomérules, isolées des reins de souris nouveau-nées, sont récupérés sur des filtres de 70µm puis mis en culture dans du DMEM contenant du 4.5g/L glucose, 20% FCS, acides aminés non essentiel, 2mM glutamine, 10µg/ml héparine, 100µg/ml facteur de croissance des cellules endothéliales, sur une boîte de pétrie recouverte de 1% de gélatine durant 72 heures. Le milieu est changé toutes les 48 heures jusqu'à confluence. Après confluence, les cellules sont détachées à l'aide d'une solution contenant 0.05% de trypsine-EDTA (Invitrogen). Les cellules sont centrifugées à 1900 RPM durant 5 minutes. Le culot cellulaire est suspendu dans un tampon d'isolation contenant 0.5% BSA et 2mM EDTA. Un volume d'anticorps anti VEGFR2 lié à la biotine (eBioscience biotin anti-mouse Flk-1) correspondant à 0.5mg/ml est ajouté aux cellules qui sont incubés 20 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées à l'aide de 2ml de tampon d'isolation puis centrifugées. Le culot est suspendu dans 1ml de tampon d'isolation et 85µl de dynabeads (Invitrogen) sont ajoutés pour permettre la sélection des cellules endothéliales FLK1⁺. Après 30 minutes sous agitation, les cellules sont placées sur un aimant et les cellules aspécifiques sont éliminées. Un volume de 1ml de tampon de libération (Invitrogen) est ajouté et les cellules sont incubées 20 minutes à température ambiante sous agitation. Les cellules endothéliales glomérulaires FLK1⁺ sont ensuite récupérées et cultivées sur une plaque 24 puits dans du DMEM contenant du 4.5g/L glucose, 20% FCS, acides aminés non essentiel, 2mM glutamine, 10µg/ml héparine, 100µg/ml facteur de croissance des cellules endothéliales sur une boîte de pétrie recouvert de 1% de gélatine durant 72 heures. Le milieu est ensuite changé toutes les 48 heures jusqu'à confluence.

Les cellules sont ensuite détachées à l'aide de 0.05% de trypsine-EDTA (Invitrogen) puis cultivées dans des plaques 96 puits dans du milieu conditionné provenant de cellules epicardin rénales. Les cellules sont cultivées de 24h heures à 48 heures (la densité initiale correspond à 10³ cellules par puits). Le contrôle utilisé est le DMEM contenant du Glutamax, 4.5g/l de glucose, 15% FCS, Pénicilline Streptomycine. La prolifération cellulaire est mesurée par comptage manuelle après détachement des cellules à la trypsine-EDTA.

I. Traitement au BrdU et immunofluorescence

Les souris nouveau-nées ont reçu une injection intra-péritonéale de BrdU de l'ordre de 50mg/kg. Puis ont été sacrifiées après 6 heures. Les reins et cœurs sont extraits puis inclus dans une matrice de soutien (Shandom Cryomatrix, Thermo Fischer Scientific), congelés par immersion dans l'azote liquide et conservé à -80°C. Des coupes longitudinales de 5µm sont réalisées à l'aide d'un cryostat. Pour révéler les cellules ayant intégré le BrdU, les coupes sont réhydratées au PBS puis fixées à l'aide d'une solution d'éthanol 100% contenant 50mM de glycine à pH 2 durant 45 minutes à température ambiante. Les coupes sont dénaturées à l'aide de HCl 2M durant 10 minutes. Pour rééquilibrer leur pH, les coupes sont trempées 10 minutes dans une solution de PBS. Les coupes sont ensuite incubées avec un tampon de blocage durant 10 minutes. Pour l'immunofluorescence directe, les coupes sont incubées avec l'anticorps anti-BrdU couplé à la fluorescéine (Roche) à 37°C dans le noir. Les lames sont ensuite lavées puis montées grâce à du milieu de montage Vectashield (Vector Laboratories) contenant du DAPI. Pour la co-immunofluorescence les coupes sont d'abord incubées avec un anticorps primaire anti dystrophine, PECAM-1, podocin (Santa Cruz) ou α -SMA (Sigma Aldrich), epicardin (abcam) durant 1 heure à 37°C. Les coupes sont ensuite lavées puis incubées avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 594 ou 555 et avec l'anticorps anti-BrdU couplé à la fluorescéine durant 45 minutes à 37°C dans le noir. Les lames sont ensuite lavées puis montées grâce à du milieu de montage Vectashield (Vector Laboratories) contenant du DAPI.

Les photos sont prises à l'aide d'un microscope à fluorescence Leica DM 4000 équipé d'objectifs à immersion 63x et 100x. La quantification de la prolifération est effectuée par le comptage du nombre de cellules BrdU⁺ (vert).

J. Analyse de l'apoptose par la méthode dite TUNNEL

Des cryocoupes de 5µm ont été utilisées. Les coupes sont fixées dans une solution de formaldéhyde 1% pH 7.4 pendant 10 minutes à température ambiante puis post-fixées dans une solution d'éthanol : acide acétique (1 : 2) pendant 15 minutes à -20°C. Les coupes sont lavées au PBS et équilibrées à l'aide d'un tampon d'équilibration (Millipore, TUNEL

Apoptosis Detection Kit) durant 10 secondes à température ambiante. Une solution working strength TdT enzyme contenant 70 % de tampon de réaction et 30% d'enzyme Terminal deoxynucleotidyl Transferase est ajoutée. Après une incubation d'1 heure à 37°C, la réaction est arrêtée à l'aide d'un tampon Stop durant 10 minutes à température ambiante. Les coupes sont lavées puis incubées à l'aide d'anti-dioxygénin conjugué à l'Avidin-FITC. Les lames sont ensuite lavées puis montées grâce à du milieu de montage Vectashield (Vector Laboratories) contenant du DAPI.

Les photos sont prises à l'aide d'un microscope à fluorescence Leica DM 4000 équipé d'objectifs à immersion 63x et 100x. La quantification de l'apoptose est effectuée par le comptage du nombre de cellules TUNNEL⁺ normalisé par rapport au nombre de cellules DAPI⁺

K. Extraction de protéines

L'extraction des protéines se fait dans la glace. Les cœurs ou reins sont prélevés et broyés au potter dans 1mL de tampon de lyse (50mM tris HCL, 1mM EDTA pH8.0, 100mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP-40, 1mM Na₃VO₄, inhibiteurs de protéases). L'homogénat est transféré dans un tube Eppendorf de 1.5mL et homogénéisé avec une aiguille 23G dans la glace, puis l'échantillon est placé à 4°C, pendant 1 heure. Cette étape est suivie d'une centrifugation à 4°C pendant 10 minutes à 13000G. Les protéines sont conservées à -80°C.

La concentration protéique est estimée par dosage colorimétrique à l'aide du kit BCA protein assay (Pierce). Le principe repose sur la réduction des ions Cu²⁺ en Cu⁺ par les protéines en milieu alcalin. Une gamme étalon de l'échantillon standard (2000µg/mL) de 0 à 1mg/mL avec une dilution en cascade (0, 5, 10, 50, 125, 150, 250, 500, 1000µg) est réalisée dans le tampon de lyse. L'échantillon est ensuite dilué au 1/50^{ème}. Le réactif BCA est préparé en mélangeant 50 parts de réactif A pour 1 part de réactif B. Un volume de 1ml de réactif BCA est ajouté au volume final de la gamme étalon et des échantillons. Chaque échantillon est vortexé puis incubé dans un bain marie à 37°C pendant 30 minutes. La quantification est ensuite réalisée à 562nm.

Les protéines sont par la suite utilisées pour l'analyse par western blot décrite précédemment.

Les anticorps primaires utilisés sont des anti Troponine, PKR2 (Santa Cruz) anti HIF1 α (Abcam), anti Akt, anti pAkt (Cell Signaling). La quantification est effectuée à l'aide du logiciel ImageJ. L'intensité de chaque bande et le bruit de fond associé aux bandes sont mesurés. L'expression des protéines est calculée par le ratio ($\text{Intensité}_{\text{protéine cible}} / \text{Intensité}_{\text{protéine de référence (GAPDH)}}$).

L. Immunofluorescence

Les cryocoupes de 5 μ m fixées à l'aide de formaldéhyde 3.7% (Sigma Aldrich) puis lavées au PBS et les protéines sont mises en évidence par une immunofluorescence indirecte.

Les anticorps primaires utilisés sont : anti PECAM-1, troponine-C, PKR2, podocin, NAPI, WT1, dystrophine, PKR2, epicardin, N-cadherine, vimentine (Santa Cruz), LC3, epicardin, VEGFR2 (abcam) caspase-3 (Millipore).

Pour les anticorps monoclonaux de souris il a été nécessaire de saturer les immunoglobulines de souris endogènes avec le kit d'immunodétection Vector® Mouse-on-Mouse. Les anticorps primaires utilisés sont : anti α -SMA et PKR1.

Les deux protocoles ont été décrits précédemment.

Les photos sont prises à l'aide d'un microscope en fluorescence Leica DM 4000 ou confocale Leica SP5 à scanner résonnant. L'acquisition des images s'est faite à l'aide du logiciel LAS AF.

M. Analyse de l'expression des gènes par PCR semi quantitative et PCR quantitative

- **Extraction des ARNm et génération des ADNc**

La purification des ARN totaux à partir des cœurs de souris est faite par lyse du tissu dans 1mL tampon de lyse contenant du thiocyanate de guanidine auquel sont ajouté 50 μ L de BAN. Pour la suite du protocole concernant l'extraction des ARN et la génération des ADNc, Cf. le protocole décrit précédemment.

- **Mesure de l'expression des gènes par PCR semi quantitative**

Les séquences d'oligonucléotides sont indiquées dans le tableau 7.

La quantification de l'expression génique est effectuée à l'aide du logiciel ImageJ. L'intensité de chaque bande et le bruit de fond associé aux bandes sont mesurés. L'expression des gènes est calculée par le ratio ($\text{Intensité}_{\text{gène cible}} / \text{Intensité}_{\text{gène de référence (GAPDH)}} \times 100$).

Tableau 7. Séquences d'oligonucléotides utilisés pour l'analyse de l'expression génique par RT-PCR

Gène		Séquence
Col1a1	Foward	TGTCCCAACCCCAAGAC
	Reverse	TCGGTGTCCCTTCATTCC
Col1a2	Foward	GAACGGTCCACGATTGCATG
	Reverse	CCTGCAGGACCCGTTTGACC
PLB	Foward	TCTCCCTACTTTTGCCTTCCTG
	Reverse	TCTCACAAAGCTGTTCTCAGC
Serca2a	Foward	CAATACTGGAGTAACCGC
	Reverse	AACTTCTCTGGAGAGGC
RyR	Foward	GAATCAGTGAGTTACTGGGCATGG
	Reverse	CTGGTCTGAGTTCTCCAAAAGC
FGF2	Foward	CAACTCCAAGCAGAAGAGAGA
	Reverse	TGCCAGTTCGTTTCAGTG
PDGF-B	Foward	TGCCAGTTCGTTTCAGTG
	Reverse	ATCGCCGAGTGCAAGACGCG
FGF2	Foward	GCCATTGCCATTGACAGGTA
	Reverse	TGGTGAAGTAGGCAGCTGGA
VEGF	Foward	CTTCCTACAGCACAGCAGATGTGAA
	Reverse	TGGTGACATGGTTAATCGGTCTTTC
BAR	Foward	TCGCTACCAGAGTTTGCTGA
	Reverse	GGCACGTAGAAGGAGACGAC
NCX	Foward	TGAGAGGGACCAAGATGATGAGGAA
	Reverse	TGACCCAAGACAAGCAATTGAAGAA
HIF1a	Foward	TACAAGGCAGCAGAAACCTAC
	Reverse	TGTGCAATTGTGGCTACC

- **Mesure de l'expression génique par PCR quantitative (PCRq)**

La quantification de l'amplicon est basée sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent (le SYBR GREEN) pour lequel l'émission de fluorescence sera directement proportionnelle à l'amplification du produit PCR. Le Sybr Green® est un fluorophore capable de se lier spécifiquement à l'ADN double brin, le colorant ne devenant fluorescent que s'il se lie à l'ADN. L'amplification du produit PCR est suivie en mesurant la fluorescence de la gamme d'émission du Sybr Green® avec une intensité maximale à 550nm.

La quantification comprend une phase exponentielle pendant laquelle le produit PCR est amplifié et qui est fonction du nombre de copies initiales du fragment amplifié. Seule la phase exponentielle est représentative du nombre de copies initiales, ainsi la PCRq permet de mesurer un cycle seuil de fluorescence ou « threshold cycle » (Ct) à partir duquel la fluorescence devient détectable. La valeur Ct est le paramètre utilisé pour quantifier l'échantillon, il est directement proportionnel au nombre de copie de l'ADN amplifié présent au départ. Le Sybr Green® permet également de mesurer une courbe de fusion qui détermine la température de fusion ou Tm de chaque ADN double brin. Les courbes de fusions permettent d'évaluer la spécificité des réactions d'amplification. Le mélange utilisé : Supermix de Biorad Sybr Green® : Supermix sample 1,25ml (10mM KCl, 40mM Tris HCl pH 8,4 ; 0,4mM dNTP ; ITaq Polymerase 50U/ml ; MgCl2 6mM ; Sybr Green® ; 20mM fluorescéine ; stabilisateurs). Pour chaque PCRq le mélange suivant est préparé dans une plaque 96 puits : sybr green ® 1x 12,5µl ; oligonucléotide (table 1) 1µM 5µl ; DEPC-H2O 7µl ; DNA 0,5µl (Vf =25µl). Le programme d'amplification a consisté en 1 cycle à 95°C de 60s suivi par 40 cycles à 95°C 15s et 60°C 1min.

Les gènes de références utilisés sont ceux de la *β-actine*, *36b4*, et *Gapdh*. La quantification se fait dans par normalisation du gène cible : $\Delta Ct = Ct(\text{gène cible}) - Ct(\text{gène de référence})$; ensuite on normalise un test (TG, cellules traité ou infecté par l'adénovirus) par rapport à un standard (NTG, cellules non traitées...) : $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{test}) - \Delta Ct(\text{standard})$; finalement on mesure les variations d'expression des gènes pour chaque échantillon : $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Une expression comprise entre 0.8 et 1.2 est considérée comme stable.

Tableau 8. Séquences d'oligonucléotides utilisés pour la PCRq

Gène		séquence
36b4	Foward	AGATTTCGGGATATGCTGTTGG
	Reverse	AAAGCCTGGAAGAAGGAGGTC
βactin	Foward	GAGACCTTCAACACCC
	Reverse	GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC
Col1a1	Foward	GCCAAGAAGACATCCCTGAAG
	Reverse	TGTGGCAGATACAGATCAAGC
Col1a2	Foward	CACCCCAGCGAAGAACTCATA
	Reverse	GCCACCATTGATAGTCTCTCC
Col1a3	Foward	TTTGTGCAAAGTGGAACTG
	Reverse	TGGACTGCTGTGCCAAAATA
PPARα	Foward	ACGATGCTGTCCTCTTGATG
	Reverse	GTGTGATAGCCATTGCCGT
PPARγ	Foward	AGGCCGAGAAGGAGAAGCTGTTG
	Reverse	TGGCCACCTCTTTGCTCTGCTC
CEBPα	Foward	CAAGAACAGCAACGAGTACCG
	Reverse	GTCCTGGTCAACCTCCAGCAC
αMHC	Foward	GAGATTTCTCCAACCCAG
	Reverse	TCTGACTTTCGGAGGTACT
ANF	Foward	CCTGTGTACAGTGCGGTGTC
	Reverse	CCTGCTTCCTCAGTCTGCTC
GATA4	Foward	TCTCACTATGGGCACAGCAG
	Reverse	GCGATGTCTGAGTGACAGGA
BNP	Foward	AAGTCCTAGCCAGTCTCCAGA
	Reverse	GAGCTGTCTCTGGGCCATTTC
βMHC	Foward	CTACAGGCCTGGGCTTACCT
	Reverse	TCTCCTTCTCAGACTTCCGC

PARTIE 4 : RESULTAT

I. Rôle de la voie de signalisation PKR1 dans la fonction cardiaque et rénale

Les études précédentes, menées au sein de notre équipe de recherche, ont permis de mettre en évidence l'implication de la voie de signalisation PK2/PKR1 dans les défaillances cardiaques. Ainsi, lors de ces investigations, il a été constaté une importante réduction de son expression chez les patients insuffisants cardiaques.

Nous avons également observé que chez un modèle de souris atteint d'un infarctus du myocarde, le transfert du gène *Pkr1* au sein du myocarde lésé entraîne une élévation du taux de survie des souris insuffisantes cardiaques et une amélioration de leur fonction ventriculaire gauche. Aussi, les effets bénéfiques du transfert de gène *Pkr1*, lors de l'infarctus, sont principalement reliés à l'amplification de l'angiogenèse et à la protection des cardiomyocytes contre l'hypoxie.

Etonnement, la surexpression du gène *Pkr1*, spécifiquement au niveau des cardiomyocytes, n'entraîne pas d'effets délétères sur la morphologie et la fonction cardiaque. En effet, elle stimule la vasculogenèse et se traduit par l'augmentation du réseau capillaire. Le mécanisme mettant en jeu la stimulation de la vascularisation cardiaque concerne une relation étroite entre l'épicaire et le myocarde. Assurément, la surexpression du récepteur *Pkr1*, au niveau des cardiomyocytes, induit une surélévation de l'expression de son ligand, la PK2. Cette dernière agit en conséquence positivement sur les EPDC pour induire leur prolifération et leur différenciation en CML et cellules endothéliales, deux composants majeurs des capillaires et artères coronaires.

Le premier volet de mon projet de Doctorat avait pour objectif de répondre à la question suivante : Quel est le rôle de la voie de signalisation PKR1 dans la fonction cardiaque et rénale ?

Pour se faire, nous avons généré des souris mutantes, dites $PKR1^{-/-}$, chez lesquelles le gène *Pkr1* a été inactivée de façon systémique. Mes travaux de recherche ont ainsi permis, pour la première fois, de démontrer le rôle essentiel de la voie de signalisation PKR1 dans la morphologie du cœur et du rein et dans leur fonction.

A. Confirmation de l'absence du gène codant pour *Pkr1* dans les souris *PKR1*^{-/-}

Afin d'étudier le rôle de PKR1 dans la morphologie et dans les fonctions cardiaque et rénale, nous avons généré des souris chez lesquelles le gène codant pour *Pkr1* a été inactivé de façon généralisée. Pour cela, des souris contenant l'exon 2 de *Pkr1* flanqué de site LoxP, ont été générées. Ces souris ont été croisées avec des souris transgéniques exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur CMV. Cette stratégie nous a permis d'inactiver le gène *Pkr1* dans l'ensemble des tissus.

L'expression de PKR1 chez ces souris mutantes dites *PKR1*^{-/-} a été contrôlée au niveau de l'expression transcriptionnelle et protéique. Ainsi, nous avons démontré que cette stratégie a permis d'inactiver l'expression de PKR1 dans le cœur et le rein. L'ablation de *Pkr1* n'a pas eu d'impact sur l'expression de *Pkr2* (Cf. figure 22).

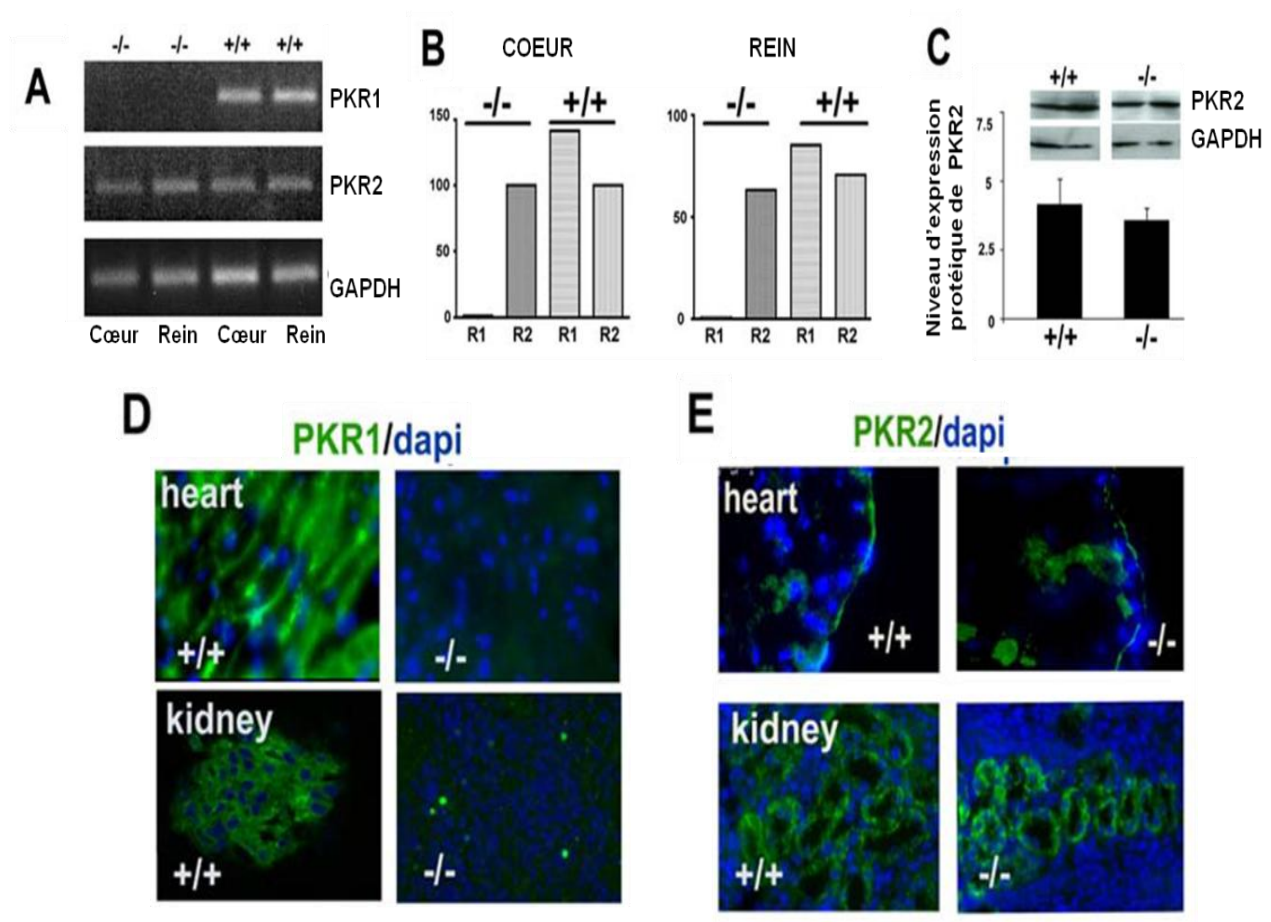


Figure 22. Analyse de l'expression de PKR1 et PKR2 chez les souris *PKR1*^{-/-}

A) Analyse de l'expression génique des récepteurs PKR1 et PKR2 des cœurs et reins dérivés de souris WT (+/+) et PKR1^{-/-}. B) Histogramme représentant le niveau de l'expression transcriptionnelle de Pkr1 et Pkr2 dans les cœurs et reins des souris WT et PKR1^{-/-}. Gapdh est utilisé comme gène de référence. (n=4). C) Histogramme et analyse par western blot démontrant que le niveau d'expression protéique de PKR2 est inchangé chez la souris PKR1^{-/-} (n=4, p>0.05). D) Immunofluorescence indirecte sur les cryocoupes de cœurs et reins révélant que l'expression protéique de PKR2 n'est pas modifiée (n=4, p>0.05). E) Immunofluorescence indirecte sur des cryocoupes de tissus cardiaques et rénaux décelant l'inactivation de PKR1 chez les souris PKR1^{-/-}.

B. Analyse du phénotype cardiaque des souris PKR1^{-/-}

La totalité des expériences, sauf indication contraire, sont pratiquées à l'âge de 24 semaines.

1. Analyses morphologique, histologique et fonctionnelle des cœurs

a. Défauts de la morphologie et de l'histologie du cœur

Des études, menées au sein de notre équipe de recherche, ont permis de démontrer la présence de PKR1 dans les tissus cardiaques. De plus, une première étude, a établi que la voie de signalisation PKR1 joue un rôle dans la néo-vascularisation du cœur (Urayama et al., 2007; Urayama et al., 2008).

Dans cette étude, nous avons souhaité mettre en avant le rôle exact de PKR1 dans la morphologie et la fonction du cœur. Ainsi, la génération des souris PKR1^{-/-} a permis de répondre à cette interrogation.

En effet, les souris PKR1^{-/-} ont développé à l'âge adulte, une cardiomyopathie dilatée mise en évidence par la présence d'une cardiomégalie (Cf. figure 23A) et d'une dilatation des chambres ventriculaires (Cf. figure 23B).

Par ailleurs, une coloration au trichrome de Mallory a permis de révéler le développement d'une fibrose interstitielle dans le myocarde des souris $PKR1^{-/-}$ (Cf. figure 23B). Le développement de la fibrose interstitielle est aussi confirmé par l'analyse de l'expression des gènes relatifs au *Collagène 1a* qui se sont retrouvés augmentés dans les cœurs de nos modèles de souris dites $PKR1^{-/-}$ (Cf. figure 23D).

Enfin, une coloration au bleu de toluidine, sur coupes semi fines, a permis de déceler la présence d'une désorganisation cellulaire dans le myocarde dérivé des souris $PKR1^{-/-}$ (Cf. figure 23D). A noter que le niveau protéique de la Troponine C cardiaque est également considérablement réduit (Cf. figure 23E).

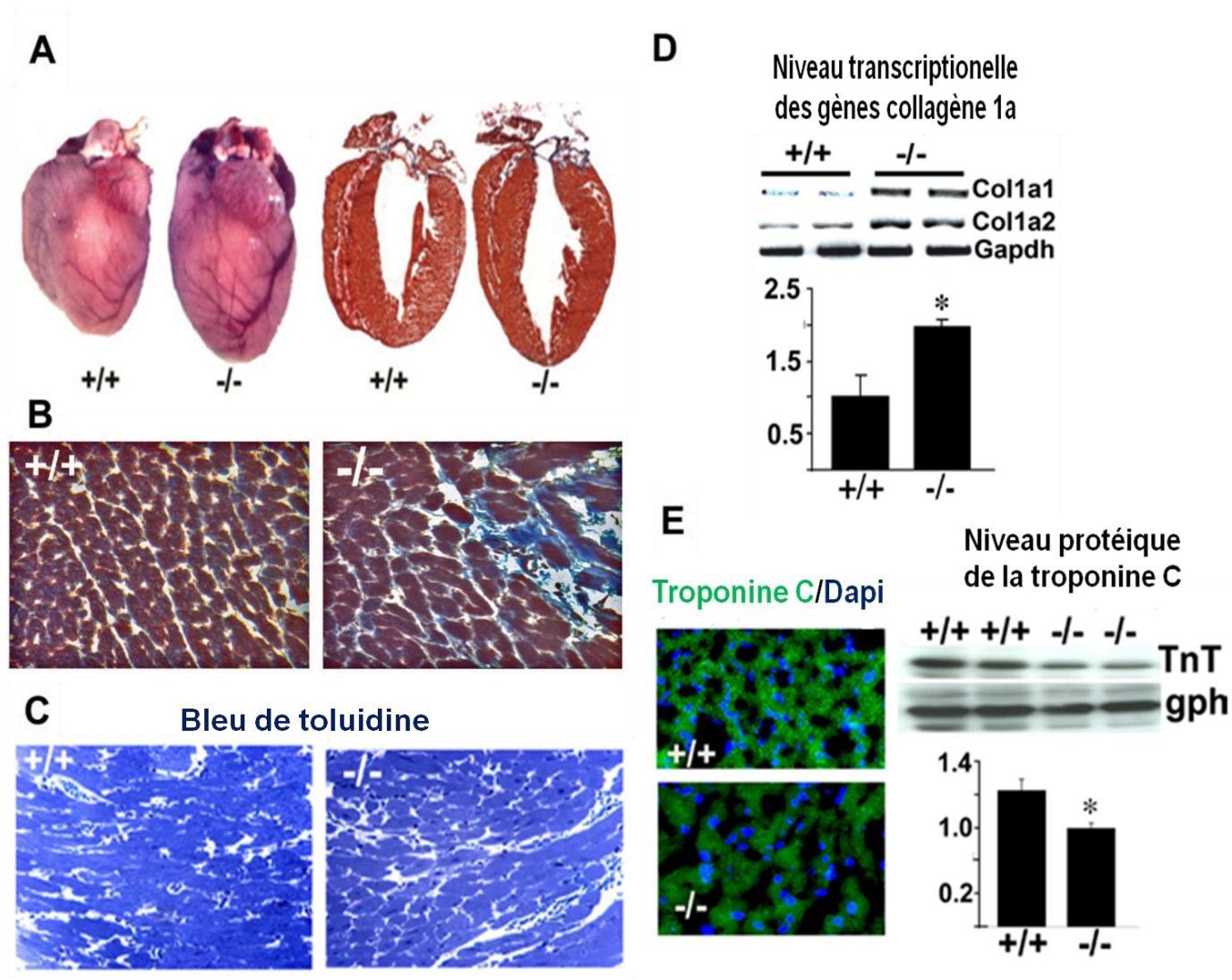


Figure 23. Analyse morphologique et histologique des cœurs WT et $PKR1^{-/-}$

A) Analyse morphologique et histologique par coloration au trichrome de Mallory sur cryocoupes de cœurs. B) Coloration au trichrome de Mallory révélant la présence d'une fibrose interstitielle au sein du myocarde dérivé des souris $PKR1^{-/-}$ (bleu) non décelable chez les souris WT (+/+). C) Coupes semi fines colorées au bleu de toluidine révélant la présence d'une désorganisation cellulaire des tissus cardiaques dérivés des souris $PKR1^{-/-}$. D) Analyse de l'expression génique montrant la surexpression des gènes relatifs au Collagène 1a (*Colla1* et *Colla2*) dans les cœurs de souris $PKR1^{-/-}$ (n=4, $p<0.05$). E) La troponine C a été détectée par immunofluorescence indirecte avec des anticorps anti-Troponine C spécifique et observée en microscopie à fluorescence. Le niveau d'expression protéique a également été analysé par western blot. L'histogramme représente l'expression de la troponine C (TnT) normalisée par l'expression de la GADPH (*gph*) (n=4, $p<0.05$).

b. Développement de dysfonctions cardiaques

Une autre analyse concernant la fonction cardiaque par échocardiographie, a permis de révéler une réduction de la masse ventriculaire gauche chez les souris $PKR1^{-/-}$ (Cf. figure 24A). Le ratio du poids du cœur mouillé sur le poids total est également augmenté (6.1 ± 0.01 mg/g chez les souris $PKR1^{-/-}$ et 5.3 ± 0.01 mg/g chez les souris WT, n=6, $p>0.05$).

Un examen de la morphométrie cellulaire a démontré une augmentation de la taille des cardiomyocytes dérivés des cœurs de souris $PKR1^{-/-}$ (Cf. figure 24B). Une immunofluorescence indirecte ciblant la dystrophine sur des cryocoupes de cœurs a confirmé cette observation puisque la mesure de la longueur des cardiomyocytes indiquait que cette dernière était beaucoup plus élevée chez les souris $PKR1^{-/-}$ (Cf. figure 24C).

Une analyse échocardiographique a permis de déceler, chez la souris $PKR1^{-/-}$, la réduction de la paroi du septum inter-ventriculaire et de la paroi postérieure du ventricule gauche. Dans des conditions basales, les dimensions des chambres ventriculaires ne sont pas altérées chez les souris $PKR1^{-/-}$ (Cf. tableau 9). Cependant, en réponse à un stress, lors de l'emploi d'un stimulus β -adrénergique (injection de dobutamine), les souris $PKR1^{-/-}$ ont présenté une réduction de la fonction cardiaque caractérisée par une baisse de la fraction d'éjection et de la fraction de raccourcissement du ventricule gauche (Cf. figure 24D et tableau 10). Une

augmentation des dimensions des chambres ventriculaires est également observée en diastole comme en systole après traitement à la dobutamine (Cf. tableau 10).

L'expression des gènes des récepteurs $\beta 1ar$ et celle des gènes impliqués dans le cycle du calcium ne sont pas altérées chez la souris $PKR1^{-/-}$ (Cf. figure 24E).

De plus, une analyse histologique pratiquée sur des cœurs isolés à la naissance, a démontré que les dilatations des cavités cardiaques observées à l'âge adulte, chez les souris $PKR1^{-/-}$, apparaissaient dès la naissance (Cf. figure 24F).

Les données morphologique, histologique et fonctionnelle obtenues ont mis en avant le développement chez les souris $PKR1^{-/-}$ d'une cardiomyopathie dilatée compensée par une hypertrophie des cardiomyocytes. Ainsi, au vu de ces anomalies apparaissant dans les cœurs $PKR1^{-/-}$, nous avons orienté nos investigations vers une étude relative à la structure cardiaque.

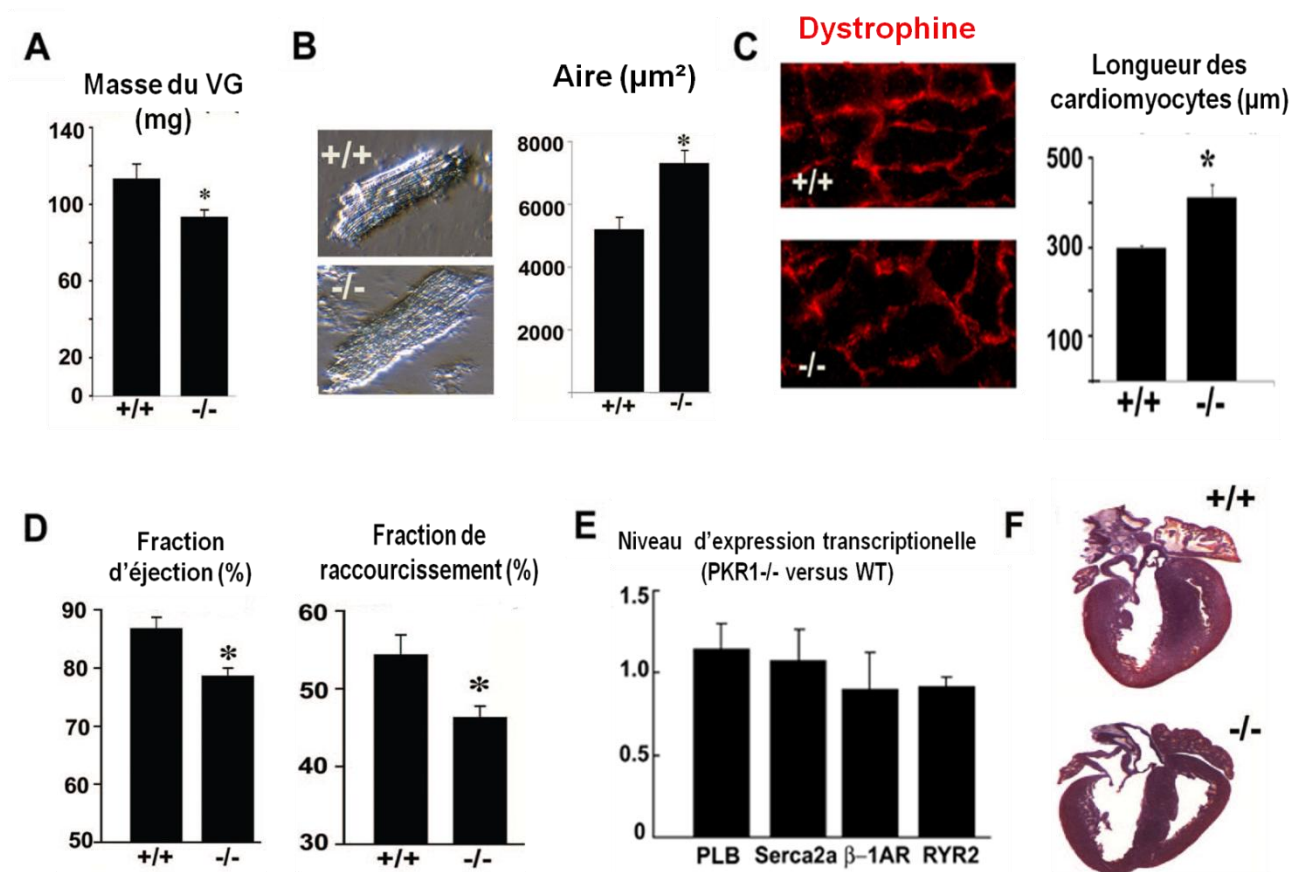


Figure 24. Analyses morphométriques des cardiomyocytes, de la fonction cardiaque et de l'expression des gènes spécifiques au cycle du calcium chez les souris WT et $PKR1^{-/-}$

A) Masse du ventricule gauche (VG), en mg, mesurée par échocardiographie (n=6, $p<0.05$). B) Comparaison de la taille des cardiomyocytes illustrée par des photos de cardiomyocytes isolés et un histogramme représentant l'aire en μm^2 des cardiomyocytes isolés. C) Analyse de la longueur des cardiomyocytes par immunofluorescence indirecte utilisant des anticorps anti-dystrophine et visualisés par microscopie à fluorescence. La longueur des cardiomyocytes est mesurée à l'aide du logiciel ImageJ et est représentée en μm par un histogramme. D) Mesure par échocardiographie de la fonction cardiaque, après traitement à la dobutamine, caractérisée par le pourcentage de la fraction d'éjection et de la fraction de raccourcissement du ventricule gauche (n=6, $p<0.01$). E) Niveau d'expression des gènes relatifs au Plb, au Serca, au récepteur $\beta 1\text{ar}$ et au récepteur de la Ryanodine (RyR) mesuré par PCRq. F) Analyse histologique de cryocoupes de cœurs de souris nouveau-nées colorées au trichrome de Mallory (n=5).

Tableau 9. Echocardiographie à 24 semaines avant traitement à la dobutamine (n=6).

SIV : septum inter-ventriculaire ; DIVGs diamètre interne systolique du VG ; DIVGd : diamètre interne diastolique du VG ; PPVG : paroi postérieure du VG ; TRIV : temps de relaxation iso-volumétrique ; TRCV : temps de contraction iso-volumétrique.

	WT	PKR1 ^{-/-}
Fréquence cardiaque (bpm)	444.75±28.21	452.33±20.62
Masse du VG (mg)	112.97±8.01	92.94±4.16 *
Paramètres mesurés en diastole		
SIV (mm)	0.809±0.054	0.612±0.021 *
DIVGd (mm)	3.794±0.135	4.047±0.027
PPVG (mm)	1.064±0.064	0.953±0.034 *
vol VG (μl)	62.33±5.59	72.71±6.66
Paramètres mesurés en systole		
SIV (mm)	1.166±0.075	0.99±0.053 *
DIVGs (mm)	2.59±0.155	2.823±0.148
PPVG (mm)	1.417±0.074	1.310±0.055
vol VG (μl)	25.51±3.90	32.02±4.31
Fraction d'éjection (%)	53.32±3.27	57.96±2.7
Fraction de raccourcissement (%)	30.74±2.37	30.3±1.82

Vélocité de l'onde E (mm/s)	835.5±52.31	816.47±25.36
Vélocité de l'onde A (mm/s)	498.27±69.08	580.22±56.36
Ratio E/A	1.737±0.180	1.448±0.13
TRIV	23.21±2.42	21.61±0.83
TCIV	18.93±2.83	17.5±0.91

Tableau 10. Echocardiographie à 24 semaines après traitement à la dobutamine (n=6).

SIV : septum inter-ventriculaire ; DIVGs : diamètre interne systolique du VG ; DIVGd : diamètre interne diastolique du VG ; PPVG : paroi postérieure du VG ; TRIV : temps de relaxation iso-volumétrique ; TRCV : temps de contraction iso volumétrique

	WT (PKR1^{+/+})	PKR1^{-/-}
Fréquence cardiaque (bpm)	474.86±32.8	543.00±25.78
Paramètres mesurés en diastole		
SIV (mm)	0.76±0.049	0.788±0.049
DIVGd (mm)	3.501±0.111	3.930±0.132 *
PPVG (mm)	1.070±0.029	1.058±0.063
vol VG (µl)	52.08±4.12	54.80±4.78
Paramètres mesurés en systole		
SIV (mm)	1.386±0.057	1.305±0.079
DIVGs (mm)	1.656±0.110	1.926±0.088 *
PPVG (mm)	1.754±0.069	1.531±0.071 *
vol VG (µl)	8.34±1.48	11.70±1.28
Fraction d'éjection (%)	86.65±2.02	78.53±1.47 *
Fraction de raccourcissement (%)	54.31±2.67	46.27±1.47 *
Vélocité de l'onde E (mm/s)	884.40±18.77	861.66±54.60
Vélocité de l'onde A (mm/s)	590.11±69.19	517.14±46.09
Ratio E/A	1.513±0.061	1.630±0.104
TRIV	20.36±1.49	22.08±2.62
TCIV	13.57±1.65	18.75±1.91 *

2. Etude des anomalies cellulaires associées aux dysfonctions cardiaques

a. Développement d'anomalies structurales lors de la délétion du récepteur PKR1

L'observation au microscope électronique a révélé un épicarde considérablement aminci alors que le sous-épicarde était atteint d'une accumulation anormale de cardiomyocytes et d'un dépôt excessif de fibre de collagène (Cf. figure 25A).

Par ailleurs, les cardiomyocytes présentaient une membrane ondulante, une désorganisation des myofibrilles, une réduction de la longueur des sarcomères. Ils avaient également tendance à se détacher. D'autre part, le myocarde se composait de mitochondries aberrantes anormalement distribuées au sein des cardiomyocytes (Cf. figure 25B).

Un marquage ciblant la molécule d'adhésion N-cadhérine, a confirmé le désassemblage des disques de jonction et ainsi la structure anormale du cœur des souris PKR1^{-/-} (Cf. figure 25B).

b. Anomalies morphologique et fonctionnelle des mitochondries

Les mitochondries des cœurs de souris PKR1^{-/-} semblaient plus nombreuses, que celles des souris WT et présentaient également un aspect plus dense et fusionné (Cf. figure 25B).

La fonction mitochondriale a été examinée par la mesure de l'activité de la SDH, enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Ainsi, nous avons démontré la présence d'une anomalie fonctionnelle des mitochondries accompagnant les défauts morphologiques puisque l'activité de la SDH était réduite dans les cœurs des souris PKR1^{-/-} (Cf. figure 25C).

Les acides gras étant la première source d'énergie utilisée par le cœur, nous avons ensuite effectué un marquage à l'oil red, qui a décelé la présence d'une abondante accumulation lipidique dans le cœur des souris PKR1^{-/-} confirmant la dysfonction mitochondriale (Cf. figure 25D).

Le programme de mort cellulaire a également été examiné à l'aide d'analyse par TUNNEL. Nous avons démontré ainsi la présence d'une forte majorité de cellules apoptotiques dans les cœurs PKR1^{-/-} atteints de cardiomyopathies dilatées (Cf. figure 25E).

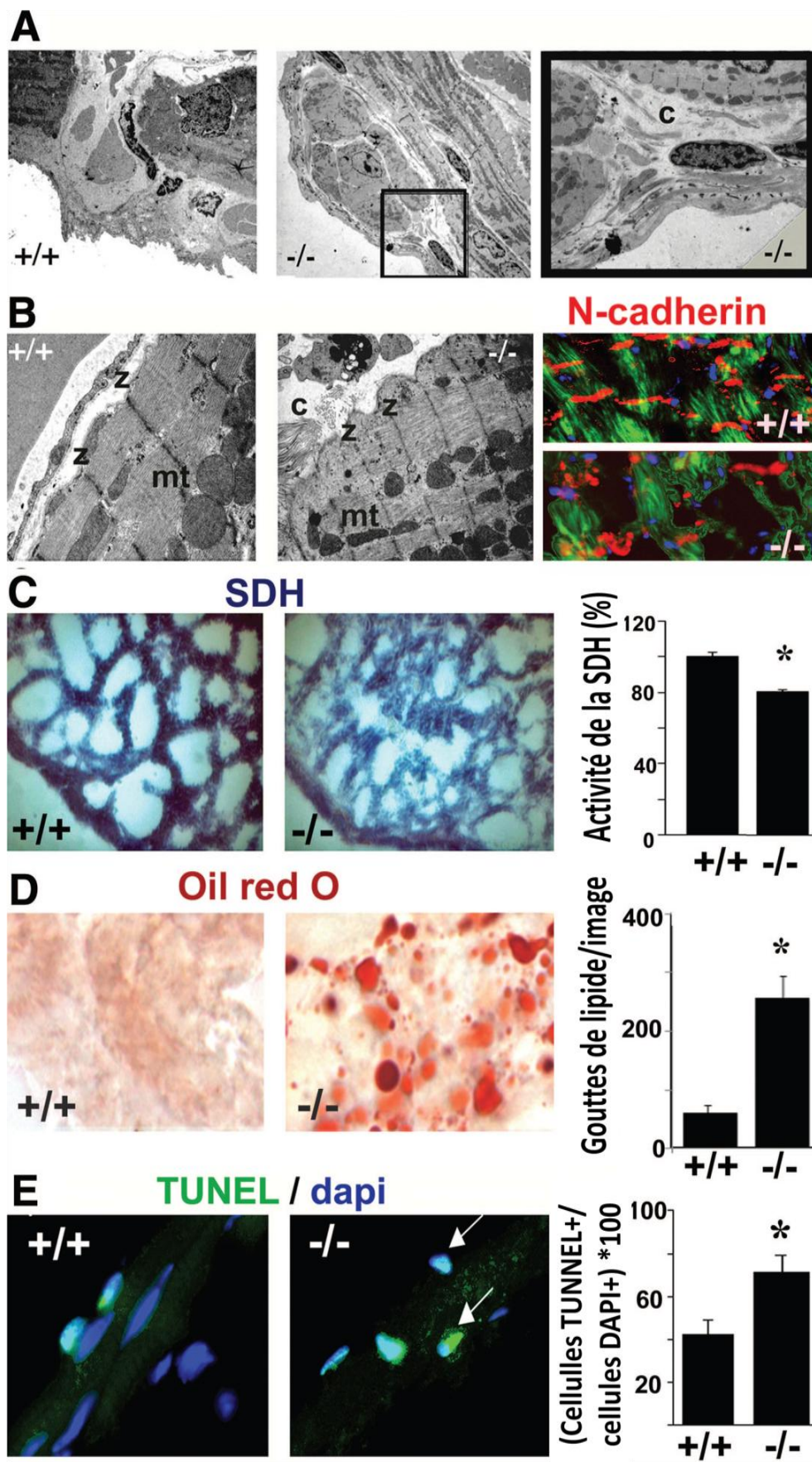


Figure 25. Analyse structurale, de l'homéostasie mitochondriale et de l'apoptose dans les cœurs WT et $PKR1^{-/-}$

A et B) Vue en coupe par microscopie électronique montrant un épicaide aminci, des dépôts de collagène (c), la réduction de la longueur des sarcomères (z indique la bande z), une membrane plasmique ondulante, des mitochondries (mt) anormales. La N-cadhérine (rouge) et la troponine C (vert) sont détectées par immunofluorescence indirecte. C) Mesure de l'activité de la SDH. L'histogramme représente l'analyse par ImageJ de l'intensité de la couleur (n=4, $p<0.05$). D) Marquage à l'oil red des cryocoupes de cœurs. L'histogramme représente le nombre de gouttes de lipides quantifiés par ImageJ (n=3, $p<0.05$). E) Détection de l'apoptose par la technique du TUNNEL. L'histogramme représente la quantification du nombre de cellules TUNNEL⁺ normalisé par rapport au nombre de cellule DAPI (n=4, $p<0.05$).

C. Etude du phénotype du rein lors de la délétion du gène codant *Pkr1*

1. Profil d'expression de PKR1 dans le rein

Nous avons souhaité établir le profil d'expression de PKR1 dans les reins de souris WT.

De nombreuses doubles immunofluorescences ont été effectuées sur des cryocoupes de reins suivies d'une visualisation en microscopie confocale.

Celle-ci a révélé, dans le glomérule que PKR1 n'était exprimé que par les cellules endothéliales glomérulaires PECAM-1⁺. Les podocytes (podocin⁺) et cellules mésangiales (vimentine⁺) n'exprimaient pas PKR1.

Elle a démontré également la présence de PKR1 dans les tubules (NAPI⁺) (Cf. figure. 26A-D).

Une hybridation in situ a confirmé ces observations et a détecté l'expression de PKR1 au sein du glomérule et dans le tissu interstitiel rénal (Cf. figure 26E).

Au vu du profil d'expression du récepteur PKR1 au niveau des cellules endothéliales glomérulaires et des cellules tubulaires rénales, nous avons voulu connaître le rôle de celui-ci dans la morphogenèse rénale.

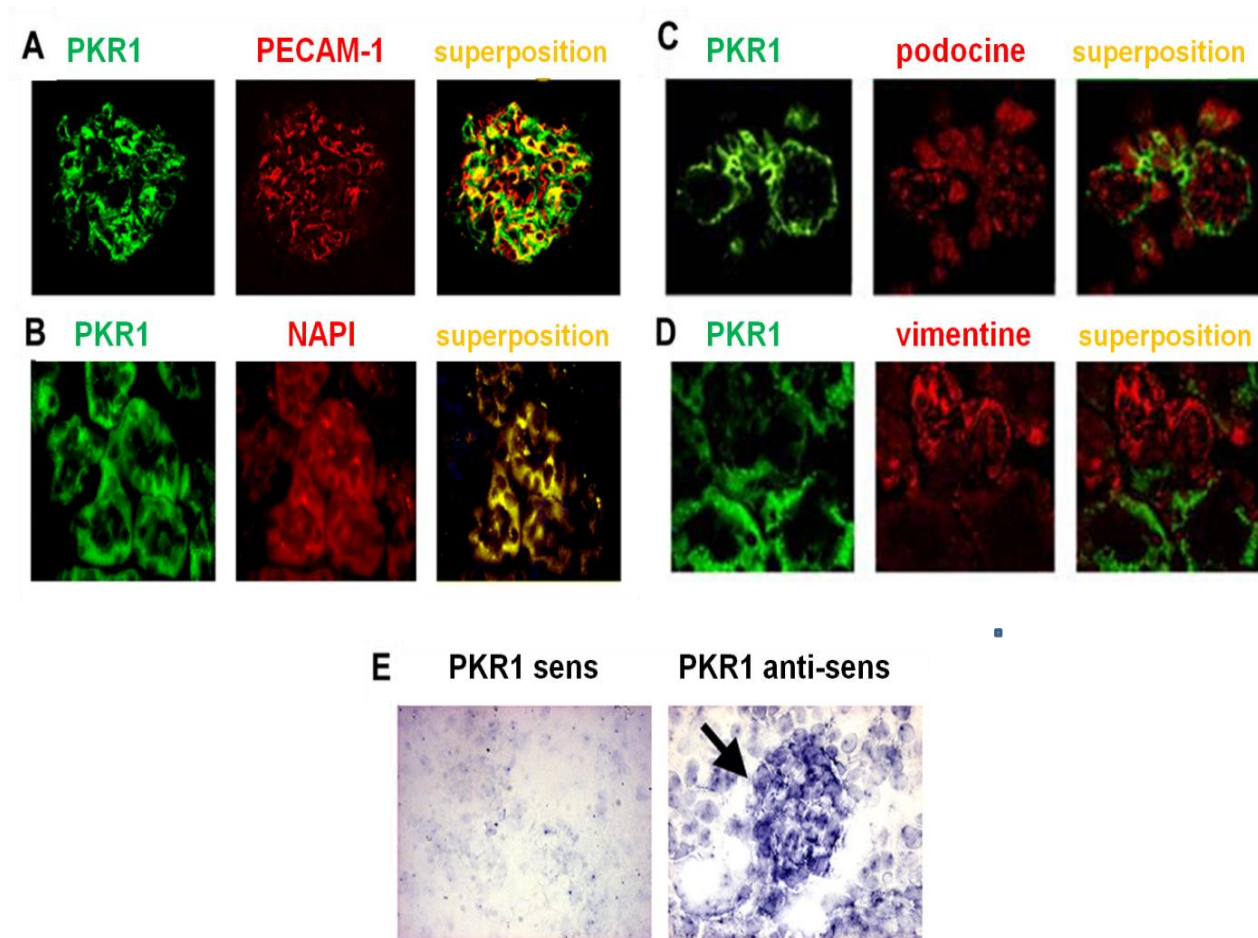


Figure 26. Expression rénale de PKR1

A, B, C, D) Co-localisation de PKR1 (vert) avec PECAM-1 spécifique aux cellules endothéliales (A, rouge), NAPI spécifique aux cellules tubulaires (B, rouge), Podocine spécifique aux podocytes (C, rouge), Vimentine spécifique aux cellules mésangiales (D, rouge) par immunofluorescence indirecte et visualisation en microscopie confocale. E) Hybridation in situ sur cryocoupes de reins révélant grâce aux amorces anti-sens que l'expression de PKR1 se situe au niveau des structures glomérulaires et tubulaires.

2. Analyses macroscopiques, histologiques et morphologie du glomérule

a. Anomalies morphologique et histologique

Les premières analyses effectuées ont été morphologiques et ont démontré que les souris $\text{PKR1}^{-/-}$ développaient un rein apparaissant, le plus généralement, hypertrophié.

Nous avons néanmoins observé que dans d'autres cas, les souris $\text{PKR1}^{-/-}$ pouvaient être atteintes d'une atrophie du rein.

Enfin nous avons pu constater le développement de rétention urinaire chez les souris $\text{PKR1}^{-/-}$. Par ailleurs, des examens morphologiques ont permis de déceler une augmentation du ratio du poids du rein mouillé sur le poids total qui s'avère augmenté et confirme que les souris $\text{PKR1}^{-/-}$ développaient, dans de nombreux cas, une hypertrophie rénale à l'âge de 24 semaines (Figure 27A-C).

Par la suite, nous avons effectué une analyse histologique des tissus rénaux, extraits des souris nouveau-nées, afin de savoir si la pathologie rénale observée se développait à la naissance ou si elle était dépendante d'anomalies cardiaques décrites auparavant.

L'étude histologique utilisant le trichrome de Mallory a ainsi mis en évidence la présence d'une hypoplasie des reins de nouveau-nées des souris $\text{PKR1}^{-/-}$. Cette observation a démontré que les anomalies morphologiques se développaient dès la naissance et qu'elles ne dépendaient pas de la cardiomyopathie dilatée décrite auparavant (figure 27D).

b. Altération de la vascularisation glomérulaire

L'analyse par TUNNEL a finalement révélé que la majorité de cellules composants le glomérule étaient apoptotiques (Cf. figure 27E). En concordances avec ces observations, nous avons démontré, une réduction du nombre de cellules endothéliales PECAM-1^+ dans les glomérules $\text{PKR1}^{-/-}$ suggérant que l'apoptose glomérulaire touchait principalement les cellules endothéliales (Cf. figure 27F).

Au vu des analyses morphologiques décrites touchant particulièrement les glomérules, nous avons pris la décision de poursuivre notre étude vers une analyse plus approfondie de la structure rénale.

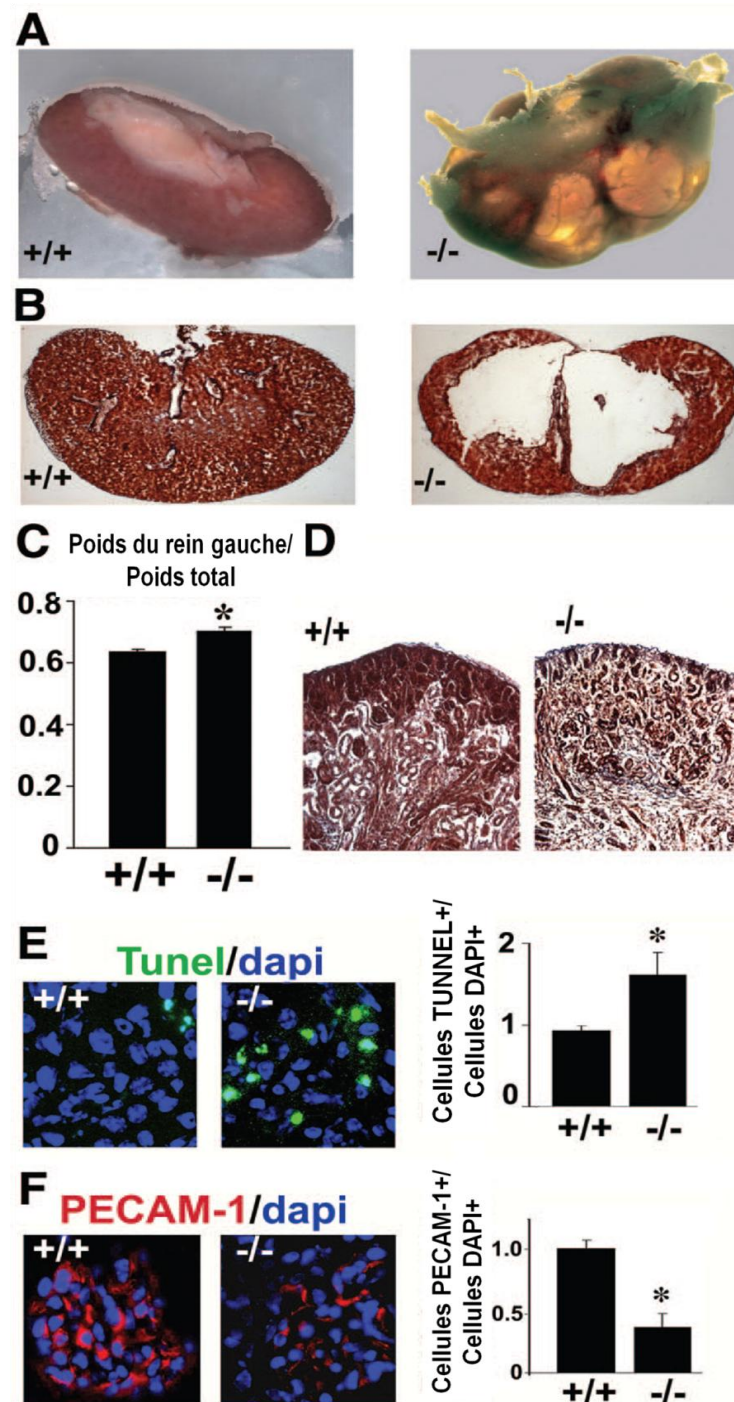


Figure 27. Analyses morphologique et histologique des reins WT et $PKR1^{-/-}$

A, B) Analyses morphologique et histologique des reins. C) Ratio poids du rein mouillé sur poids total ($n=8$, $p<0.05$). D) Sections paraffines de reins de souris nouveau-nées marquées au trichrome de Mallory. E) Détection de l'apoptose par la technique du TUNNEL. L'histogramme représente la quantification du nombre de cellules TUNNEL⁺ normalisé par rapport au nombre de cellules DAPI ($n=4$, $p<0.05$). F) Détection par immunofluorescence indirecte des cellules endothéliales glomérulaires PECAM-1⁺. L'histogramme représente le nombre de cellules PECAM-1⁺ normalisé par rapport aux cellules DAPI ($n=3$, $p<0.01$)

3. Analyses structurales du rein

a. Anomalies structurales du glomérule

L'analyse histologique des reins dérivés des souris PKR1^{-/-} a dans un premier temps révélé une dilatation de la capsule de Bowman dans l'espace glomérulaire.

L'étude par microscopie électronique a décelé un épaississement de la membrane basale et un étalement des pédicelles de podocytes (Cf. figure 28A).

b. Anomalies morphologiques des composants de l'espace interstitiel rénal et de la fonction des mitochondries

La coloration au trichrome de Mallory a démontré une dilatation des tubules accompagnée d'une fibrose interstitielle alors que la microscopie électronique a révélé des capillaires dysmorphiques (Cf. figure 28B).

Par ailleurs, le nombre et la densité des mitochondries étaient réduits dans les reins PKR1^{-/-}. Ces anomalies étaient accompagnées d'une modification structurale des mitochondries incluant leur gonflement et l'augmentation du nombre de crêtes et de granules (Cf. figure 28C).

En concordance avec ces observations nous avons décrits également une réduction de l'activité mitochondriale révélée par la mesure de l'activité de la SDH qui était réduite dans les reins PKR1^{-/-} (Cf. figure 28D).

Au vu des anomalies touchant l'angiogenèse glomérulaire, la structure glomérulaire et la morphologie des tubules rénaux, induites par la délétion de Pkr1, nous avons continué nos investigations par l'étude de la fonction rénale.

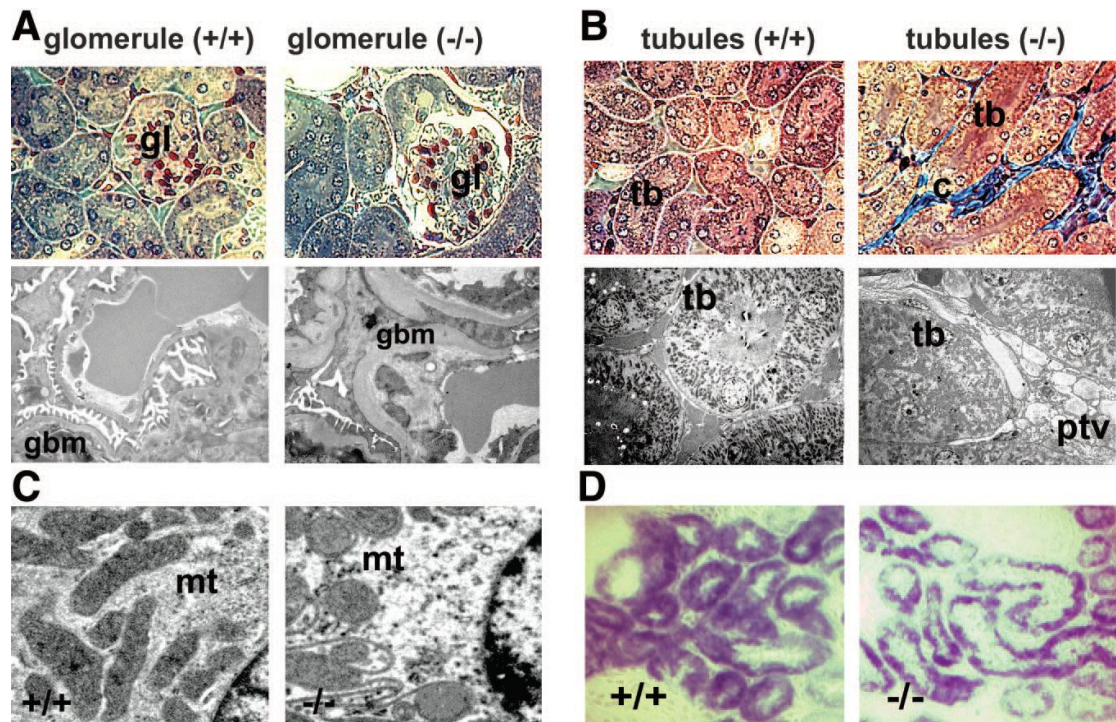


Figure 28. Analyse histologique et microscopique des tubules et glomérules issus des reins WT et PKR1^{-/-}

A,B) Analyse histologique (haut) et en microscopie électronique (bas) mettant en évidence la morphologie des glomérules (A) gl : glomérule, gbm : membrane basale ; et des tubules (B) tb : tubules, c : collagène, ptv : vaisseaux interstitiels C) Analyse sur coupes en microscopie électronique représentant les mitochondries dérivées de reins. D) Analyse de l'activité de la SDH sur cryocoupes de reins.

4. Analyse de la fonction rénale

La fonction rénale a été étudiée par le biais d'analyse urinaire et sanguine.

De ce fait, les prélèvements urinaires ont été effectués lors du placement de souris en cage à métabolisme. Ainsi, après une période d'acclimatation de 48 heures, la diurèse des 24 heures, le volume d'eau absorbée et la prise de nourriture ont été mesurés. Nous n'avons pas pu observer de différence dans le volume d'eau absorbée ni dans la prise de nourriture par 24 heures. Cependant la diurèse des 24 heures des souris PKR1^{-/-} était significativement réduite (Cf. figure 29).

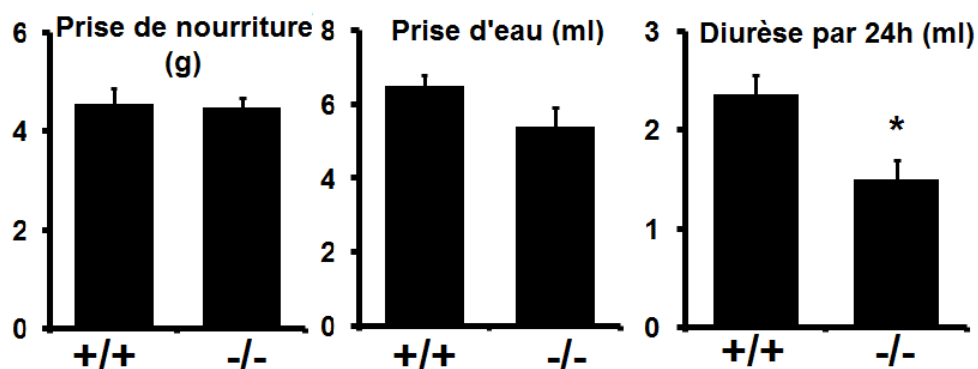


Figure 29. Paramètres mesurés, par 24 heures, lors du placement des souris en cage à métabolisme : prise de nourriture (g), prise d'eau (ml), diurèse en ml.

Le débit de filtration glomérulaire est également diminué chez la souris $PKR1^{-/-}$, comme a pu l'indiquer la baisse de la clairance de la créatinine. Les faibles taux de créatinine urinaire étaient associés à de fort taux sanguins (Cf. Tableau 11).

Aucun changement n'a été observé dans la Kaliurèse, Natriurèse, Calciurie et Chlorurie. Cependant nous avons pu constater la présence d'une hyperphosphaturie confirmée par une hypophosphatémie (Cf. Tableau 11).

La fonction rénale s'est vue dégradée au stade de 36 semaines, puisque nous avons observé le développement d'une protéinurie (6.625 ± 0.7 g/L pour WT et 10.72 ± 2.4 g/L pour $PKR1^{-/-}$, $n=5$, $p<0.05$).

Nous avons donc décrits, durant la première partie de nos recherches que la délétion de Pkr1 induit le développement d'anomalies morphologique et fonctionnelle du cœur et du rein. Ainsi, nous avons souhaité décrire les mécanismes cellulaire et moléculaire à l'origine des ces altérations induites par la perte de Pkr1.

Tableau 11. Analyses urinaire et sanguine à 24 semaines (n=6).

Analyses urinaire		
	WT	PKR1^{-/-}
Urée (mmol/L)	1291.5±156.19	1263.12±137.91
Creatinine (µmol/L)	4729.87±776.07	4611.13±367.58
Creatinine (mg/24H)	1.18±0.15	0.76±0.07 *
Creatinine (nmol/L /24H/g poids total)	336.89±37.5	225.11±21.9*
Urée/Creat (mol/mol)	279.74±13.12	264.44±13.24
Phos (mmol/L)	31.91±2.29	51.49±5.68*
Phos/Creat (mol/mol)	7.67±1.08	11.14±0.88*
Phosphaturie (mmol/mg Creat/g poids total)	2.07±0.28	2.99±0.23*
Ca (mmol/L)	1.59±0.26	2.05±0.38
Ca/Creat (mol/mol)	0.37±0.07	0.43±0.07
Na (mmol/L)	180.38±19	186.5±20.9
Na/Creat (mol/mol)	40.11±3.2	40.69±2.16
Natriurèse (mmol/mg Creat/g poids total)	10.57±0.69	10.65±0.43
K (mmol/L)	335±44.92	325.38±39.35
K/Creat (mol/mol)	71.38±3.36	69.23±4.15
Kaliurèse (mmol/mg Creat/g poids total)	19.39±0.74	18.52±0.89
Na/K	0.56±0.03	0.58±0.008
Cl (mmol/L)	233.88±25.08	234.75±27.26
Cl/Creat (mol/mol)	51.33±3.26	50.19±3.22
Chlorurie (mmol/mg Creat/g poids total)	13.88±0.65	13.41±0.66
Glucose (mmol/L)	2.04±0.29	2.66±0.37
Protéine totale (g/L)	6.25±1.16	3.93±0.71*

Analyses sanguines		
	WT	PKR1^{-/-}
Urée (mmol/L)	7.70±2.35	7.78±1.77
Creatinine (µmol/L)	12.280±0.47	16.07±1.30*
Phos (mmol/L)	2.24±0.11	1.96±0.12*
Phos/Creat (mol/mol)	0.18±0.01	0.52±0.09*
Na (mmol/L)	151.75±1.05	154.63±1.94
Na/Creat (mol/mol)	12 490.68±486.42	10 119.99±853.53*
K (mmol/L)	7.68±0.29	7.33±0.19
K/Creat (mol/mol)	630.94±28.12	475.89±35.31*
Na/K	19.93±0.73	21.17±0.57
Cl (mmol/L)	112.75±0.82	116.5±1.59*
Cl/Creat (mol/mol)	9.28±0.35	7.60±0.63*
Glucose (mmol/L)	11.33±2.0	9.73±0.84
Protéine totale (g/L)	51.67±11.34	58.2±2.31

D. Mécanismes cellulaire et moléculaire à l'origine des dysfonctions cardio-rénales observées chez la souris PKR1^{-/-}

1. Angiogenèse et survie

a. Altération de l'angiogenèse cardiaque et rénale à la naissance qui est compensée à l'âge adulte

Chez les souris PKR1^{-/-} nouveau-nées, le nombre de capillaires sanguins PECAM-1⁺ s'est vu considérablement réduit.

Cependant, à l'âge de 24 semaines, nous n'avons observé aucune différence dans le nombre de capillaires sanguins PECAM-1⁺ chez les souris PKR1^{-/-}, à l'exception des zones recouvrant l'épicaire (dans le cœur) et les glomérules (dans le rein) (figure 30A). Ainsi, chez les souris PKR1^{-/-}, dans l'épicaire nous avons observé que la baisse de la vascularisation représentait près de 12% (n=4, p<005) alors qu'elle atteignait dans les glomérules près de 39% (n=4, p<0.05).

b. Développement d'un environnement hypoxique

Nous avons supposé que la restauration de la vascularisation au stade de 24 semaines, dans les zones en dehors de l'épicaire et des glomérules des cœurs et reins PKR1^{-/-}, s'effectuait par le biais de mécanismes compensatoires. Cette idée a été vérifiée par la mesure de l'expression du gène inductible par l'hypoxie HIF-1 α .

Nous avons constaté uniquement l'augmentation de l'expression transcriptionnelle du gène *Hif- α* dans les cœurs et reins dérivés de nouveau-nées de souris PKR1^{-/-} (Cf. figure 30B).

Par contre, au stade de 3 semaines, les analyses ont démontré une élévation de la transcription et de la synthèse protéique du gène *Hif α* dans les cœurs et reins PKR1^{-/-} (Cf. figure 30C).

HIF1- α un facteur de transcription pouvant activer l'expression des facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF, PDGF ou FGF. Ainsi, toujours à l'âge de 3 semaines, nous avons décelé une augmentation de la transcription des gènes *Fgf* et *Pdgfb* à la fois dans les cœurs et reins PKR1^{-/-}. Ajoutons que nous avons également observé l'augmentation significative de l'expression transcriptionnelle du gène *Vegf* dans les reins PKR1^{-/-} qui subit une élévation très faible dans les cœurs PKR1^{-/-} (Cf. figure 30D).

c. Altération des voies de survie contrôlées par la voie de signalisation Akt

Au vu du rôle de la voie de signalisation PKR1 dans la protection des cardiomyocytes contre l'hypoxie, nous avons voulu étudier si la voie de signalisation Akt, impliquée dans la survie des cardiomyocytes, était altérée chez la souris PKR1^{-/-}.

Dès lors, l'analyse de l'expression protéique, a révélé une réduction considérable de la phosphorylation d'Akt dans les cœurs et reins de souris PKR1^{-/-} au stade de 3 semaines. Ainsi, nous avons démontré la présence d'une altération des voies de survie en partie responsable de la mort cellulaire observée dans les cœurs et reins des souris PKR1^{-/-} (Cf. figure 30E).

Enfin, nous avons voulu mettre en évidence le type de cellules apoptotiques dans le cœur (cardiomyocytes, cellules endothéliales, cellules epicardin⁺) et le rein (cellules endothéliales glomérulaires et interstitielles, podocytes, cellules tubulaires, cellules epicardin⁺). Pour cela, nous avons co-localisé, par immunofluorescence indirecte, la présence de la caspase-3, protéase pro-apoptotique, avec les marqueurs des cellules endothéliales (PECAM-1), des cardiomyocytes (Troponine C), et des cellules epicardin⁺ (POD-1). Notre étude a donc révélé que les cardiomyocytes, les cellules endothéliales glomérulaires et les cellules epicardin⁺ subissaient une mort cellulaire par apoptose (Cf. figure 30F).

Ces données ont permis de mettre en évidence l'altération de l'angiogenèse dans les cœurs et reins PKR1^{-/-}. Angiogenèse qui sera compensée par des mécanismes induisant la surexpression des gènes pro-angiogéniques. Néanmoins, cette compensation n'a pas permis de pallier aux défauts cellulaires engendrés par les phénomènes hypoxiques. A noter également que l'analyse de l'expression du VEGF dans les reins de 24 semaines a confirmé sa surexpression uniquement au niveau des zones interstitielles rénales des souris PKR1^{-/-} (Cf. figure 30G).

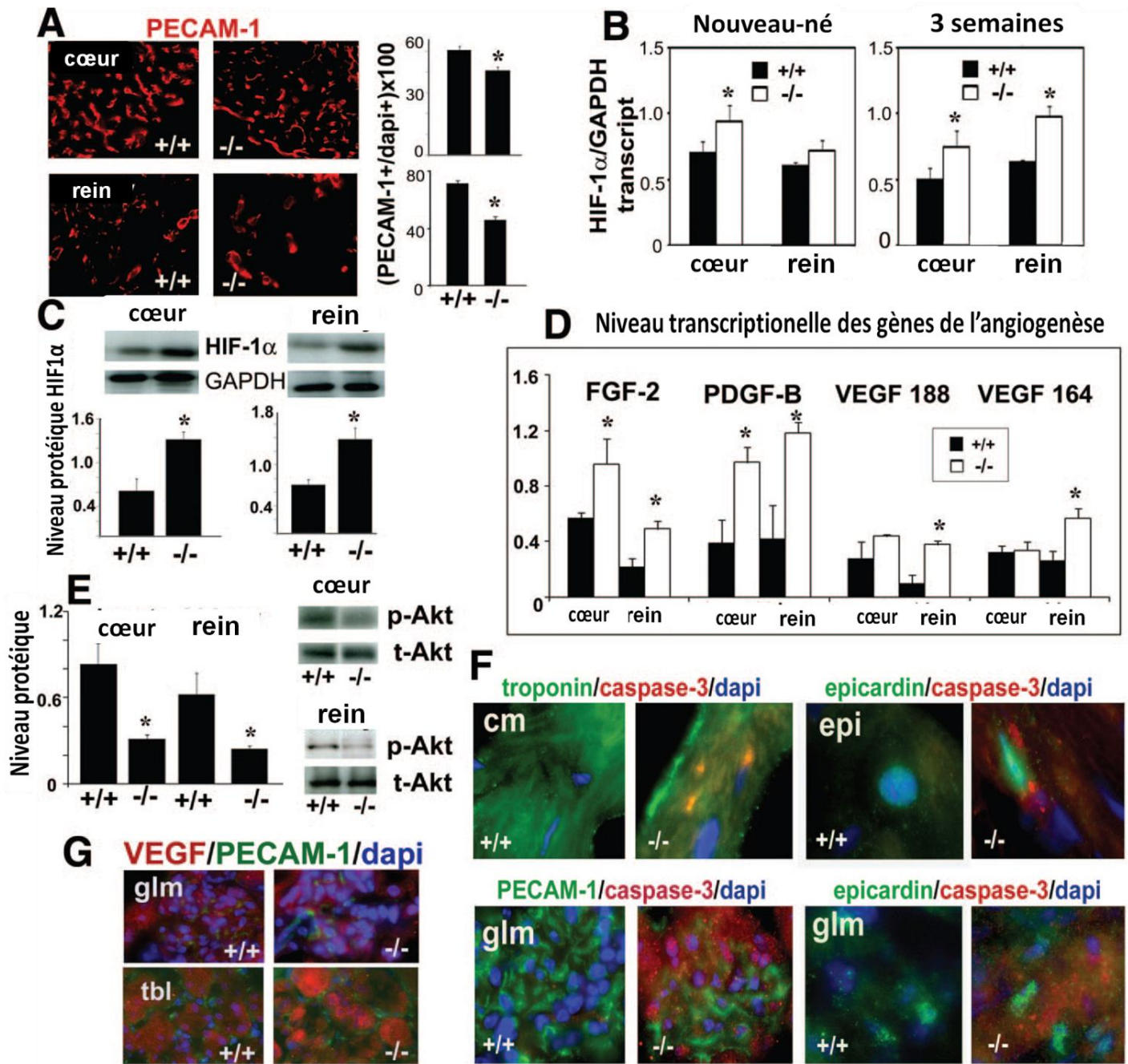


Figure 30. Mécanismes cellulaire et moléculaire impliqués dans les dysfonctions cardio-rénales des souris $PKR1^{-/-}$

A) Détection des capillaires sanguins $PECAM-1^{+}$ dans les cœurs et reins par immunofluorescence indirecte chez le nouveau-né. L'histogramme représente la quantification du nombre de capillaires sanguins $PECAM-1^{+}$ normalisé par rapport au DAPI ($n=4$, $p<0.05$). B) Analyse transcriptionnelle, par PCR, sur des échantillons de cœurs et de reins, de l'expression du gène *Hif-1α* chez les souris nouveau-nées et à 3 semaines normalisée

par rapport au gène de référence *Gapdh* ($n=4$, $p<0.05$). C) Analyse par western blot de l'expression des protéines *HIF-1 α* , à l'âge de 3 semaines sur des extraits protéiques de cœurs et de reins. L'histogramme représente la quantification du taux de protéines *HIF-1 α* normalisé par rapport à l'expression de la protéine de référence *GAPDH* ($n=3$, duplicata, $p<0.05$). D) Niveau transcriptionnelle des facteurs pro-angiogéniques *Fgf-2*, *Pdgf*, des isoformes 188 et 164 du *Vegf* sur des échantillons de cœurs et de reins. La normalisation est effectuée par rapport au gène de référence *Gapdh* ($n=4$). E) Analyse par western blot de l'expression des protéines *pAkt* et *Akt*, à l'âge de 3 semaines sur des extraits protéiques de cœurs et de reins. L'histogramme représente la quantification du taux de protéines *pAkt* normalisée par rapport à l'expression de la protéine de référence *Akt* ($n=4$). F) Co-localisation par immunofluorescence indirecte sur cryocoupes de reins et de cœurs de la caspase-3 (rouge) avec la troponine C (vert, cardiomyocytes), l'epicardin (vert, cellules progénitrices epicardin⁺), et PECAM-1 (vert, cellules endothéliales glomérulaire). G) Détection de l'expression du VEGF (rouge) co-localisé avec PECAM-1⁺ (vert) par immunofluorescence indirecte sur cryocoupes de reins de souris à 24 semaines.

2. Implication des cellules progénitrices dans les dysfonctions cardiaques et rénales

Les cellules progénitrices epicardin⁺ sont, à l'origine, des cellules découvertes dans le cœur. Elles expriment le facteur de transcription epicardin appelé encore POD-1, TCF21 ou capsulin.

a. Réduction de la population des cellules epicardin⁺

i. Population cellulaire epicardin⁺ dans les cœurs

Nous avons détecté par immunofluorescence indirecte la présence des cellules epicardin dans l'épicaarde des cœurs de souris WT.

Leur nombre est considérablement réduit dans l'épicaarde des souris *PKR1^{-/-}* (Cf. figure 31).

ii. Population cellulaire epicardin⁺ dans les reins

Etant donné les phénotypes observés dans les reins de souris $PKR1^{-/-}$ nous avons également voulu recherché la présence de cellules progénitrices epicardin⁺.

De façon surprenante, nous avons constaté dans le rein, à l'âge adulte, la présence des cellules progénitrices epicardin⁺.

Comme pour le cœur, nous avons observé une réduction du nombre de cellules epicardin⁺ dans les niches rénales des souris $PKR1^{-/-}$ (Cf. figure 31)

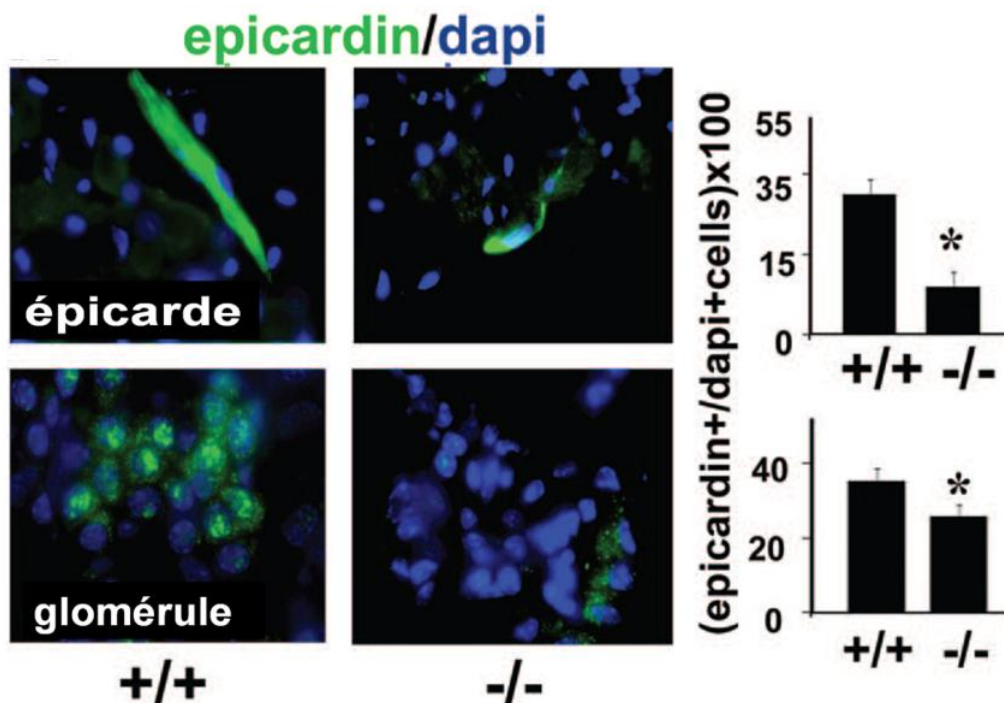


Figure 31. Niche des cellules epicardin⁺ dans les cœurs et reins WT et $PKR1^{-/-}$

Détection du facteur epicardin par immunofluorescence indirecte, sur des cryocoupes de cœurs et reins et visualisation en microscopie à fluorescence. Les histogrammes représentent la quantification du nombre de cellules epicardin⁺ normalisé par rapport aux cellules DAPI (n=5, p<0.05).

Au vu de la réduction de la population de cellules epicardin⁺ dans le cœur et le rein induite par la délétion de *Pkr1*, nous avons voulu connaître le rôle de la voie de signalisation *PKR1* dans l'activité des cellules epicardin⁺ in vitro.

b. Rôle de la voie de signalisation PKR1 dans l'activité des cellules epicardin⁺

Des études préalables menées au sein de notre laboratoire avaient montré le rôle de la voie de signalisation PKR1 dans l'activité des cellules progénitrices epicardin⁺ dérivées d'explants cardiaques (Urayama et al., 2008).

Nous avons donc voulu compléter cette étude par la démonstration du rôle de PKR1 dans l'activité des cellules progénitrices epicardin⁺ dérivées du rein. Pour cela, nous avons utilisé dans un premier temps des cultures d'explants rénaux dérivés de souris néonatales WT et PKR1^{-/-}.

Nous avons d'abord contrôlé l'effet de la PK2, sur la prolifération des cellules migrantes de l'explant rénal. Un traitement à la PK2, des explants rénaux WT, a induit une amplification de la prolifération cellulaire, détectée par une immunofluorescence indirecte ciblant Ki67. Ainsi, près de 50% des cellules dérivées d'explants rénaux WT étaient prolifératives. Cependant, cet effet n'a pas été observé pour les cellules dérivées d'explants rénaux PKR1^{-/-} (Cf. figure 32). A noter également que 90% des cellules dérivées des explants rénaux WT ont été positives pour le facteur de transcription epicardin, après traitement à la PK2 (Cf. figure 32).

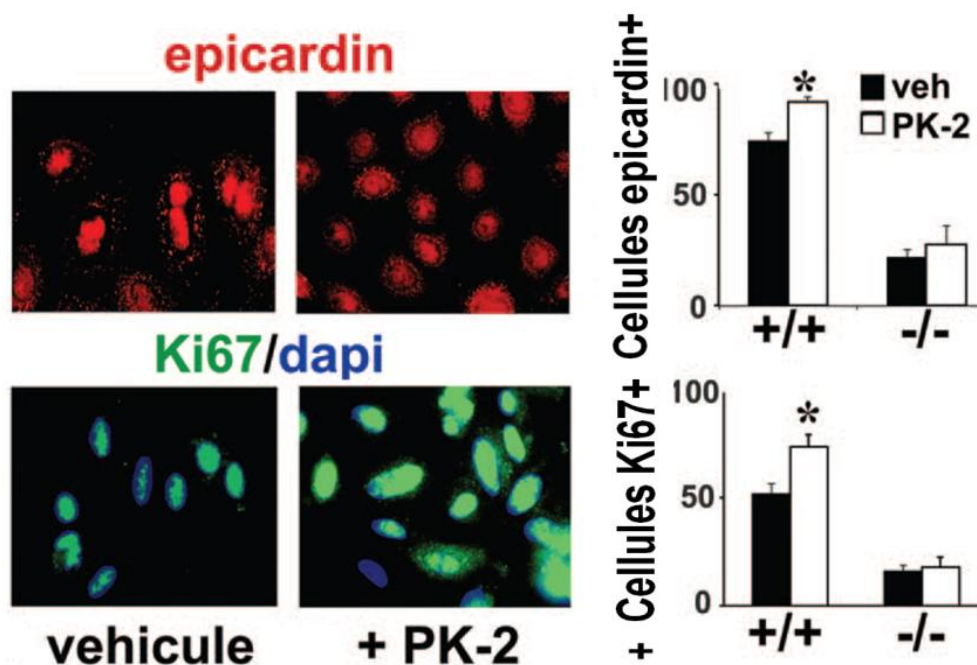


Figure 32. Prolifération des cellules progénitrices issues d'explants de reins néonataux WT et PKR1^{-/-}

Détection du facteur epicardin et Ki67 par immunofluorescence indirecte, sur des explants dérivés de reins, après traitement ou non à la PK2 puis visualisation en microscopie à fluorescence. Les histogrammes représentent le nombre de cellules epicardin⁺ et Ki67⁺ normalisé par rapport aux nombres de cellules DAPI (n=4, p<0.05).

Les cellules epicardin⁺ du rein ont ensuite été isolées par la méthode des billes immunomagnétiques utilisant un anticorps anti-epicardin biotynilé. En effet, nous avons pu mettre en évidence une nouvelle méthode d'isolation des cellules epicardin⁺ basée sur :

- Le type de facteur epicardin : le facteur epicardin est un facteur de transcription de type boucle-hélice-boucle. Il a été récemment démontré que la protéine BETA2/NeuroD, de la famille des facteurs de transcription de type boucle-hélice-boucle, nécessite les héparanes sulfates de protéoglycanes pour son attachement à la membrane (Noguchi et al., 2007). La protéine BETA2/NeuroD étant un facteur de transcription, cette étude démontre que cette protéine subit un trafic cellulaire.
- L'expression du facteur au niveau cytoplasmique (Plotkin and Mudunuri, 2008).
- Nos analyses qui ont démontré que la protéine epicardin est exprimée à la membrane.

Ainsi, nous avons testé la capacité de différenciation des cellules progénitrices epicardin⁺ rénales, après traitement à la PK2, en cellules endothéliales et CML.

Nous avons démontré chez les cellules progénitrices epicardin⁺ rénales WT que la PK2 est capable d'induire la différenciation en CML et cellules endothéliales. Ces effets n'ont pas été observés chez les cellules dérivées des reins PKR1^{-/-} (Cf. figure 33).

Ainsi nous démontrons, comme pour les EPDC dérivée de cœurs que la PK2 via PKR1 est capable d'activer la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices epicardin⁺ dérivées des reins.

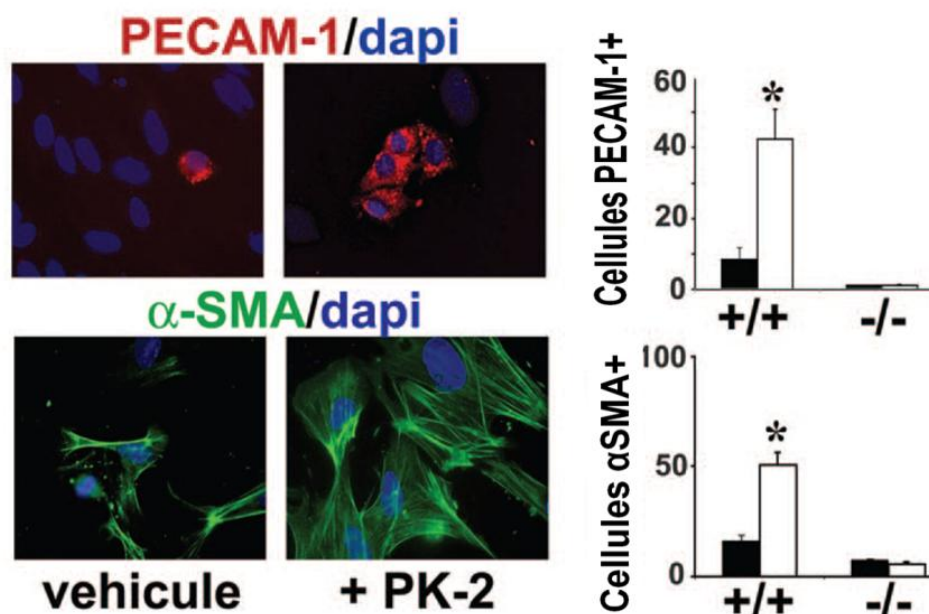


Figure 33. Différenciation des cellules progénitrices issues d'explants de reins néonataux WT et $PKR1^{-/-}$

Détection des marqueurs PECAM-1 et α -SMA, par immunofluorescence indirecte, sur des cellules epicardin⁺ dérivées de reins, après traitement ou non à la PK2 puis visualisation en microscopie à fluorescence. Les histogrammes représentent la quantification du nombre de cellules epicardin⁺, Ki67⁺, PECAM-1⁺ et α -SMA⁺ normalisé par rapport au DAPI (n=4, p<0.05).

E. Conclusion de partie

Pour conclure, le premier volet de mon projet de Doctorat a permis de mettre en avant les conséquences pathologiques d'une perte du récepteur PKR1 sur le cœur et le rein. En effet, nous avons pu démontrer l'altération des voies de signalisation de survie régies par Akt et les défauts d'activité mitochondriale, tous deux menant à l'apoptose. Nous avons également révélé des anomalies de l'activité des cellules progénitrices epicardin⁺ conduisant à une réduction de la vascularisation et à des phénomènes hypoxiques.

Ces résultats ont démontré le rôle important de la voie de signalisation PKR1 dans la physiologie cardio-rénale.

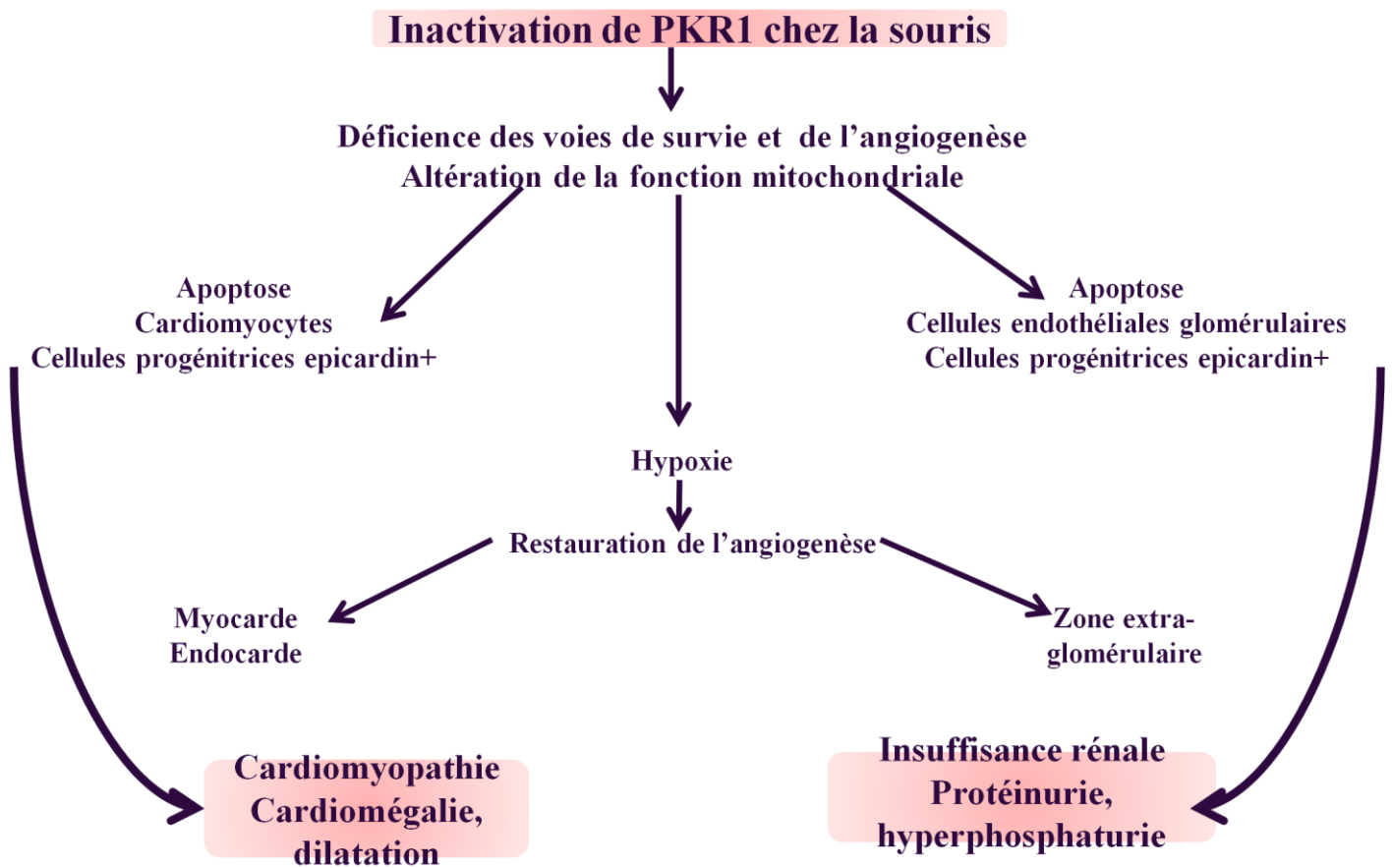


Figure 34. Schématisation des conséquences pathologiques de la délétion de *Pkr1* chez la souris.

II. Rôle de la voie de signalisation PKR1 provenant de l'épicaide dans la fonction cardiaque et rénale

Les études menées au sein de notre équipe de recherche, sur des souris transgéniques surexprimant le gène *Pkr1* spécifiquement dans les cardiomyocytes, ont mis en évidence le rôle de la voie de signalisation PKR1 dans la néo-vascularisation cardiaque. De ce fait, la surexpression du gène *Pkr1* dans les cardiomyocytes induit une sur-libération de son ligand la PK2 qui agit comme facteur paracrine pour stimuler la prolifération et la différenciation des EPDC en CML et cellules endothéliales (Urayama et al., 2008). De plus, le premier volet de mon projet de Doctorat a démontré que la délétion de *Pkr1* provoque la perte des capacités de prolifération et de différenciation des cellules progénitrices epicardin⁺ rénales à l'origine d'une altération de la vascularisation cardiaque et rénale à la naissance qui est compensée à l'âge adulte. Néanmoins, cette compensation ne pallie pas aux effets de l'environnement hypoxique puisque à l'âge adulte, nous avons noté une sévère dégradation de la fonction cardio-rénale.

A partir de là, nous avons posé la question suivante : quelle est la connexion cellulaire entre le cœur et le rein dépendante de la voie de signalisation PKR1 ? En effet, la délétion systémique du gène *Pkr1* ne nous a pas permis de comprendre son rôle dans l'activité des cellules progénitrices epicardin⁺ et ainsi dans la morphologie et dans la fonction cardio-rénale. C'est pourquoi il a été nécessaire de cibler l'inactivation du gène *Pkr1* au niveau de l'épicaide. Notre hypothèse était que les cellules progénitrices de l'épicaide représentent la connexion cellulaire entre le cœur et le rein.

Le deuxième volet de mon projet de Doctorat a ainsi visé à caractériser le rôle de la voie de signalisation PKR1, provenant de l'épicaide dans l'activation de la néo-vascularisation, la communication cellulaire, l'activation des cellules progénitrices, et la morphogénèse des tissus cardiaques et rénaux.

Pour cela, nous avons généré des souris dites epi-PKR1^{-/-} dont le gène *Pkr1* a été spécifiquement inactivé au niveau de l'épicaide par utilisation de la technologie recombinaise Cre. Notre étude a révélé que la voie de signalisation PKR1 est indispensable à l'activité des cellules progénitrices de l'épicaide au sein du cœur et du rein. Ainsi, nous avons montré que l'inactivation du gène *Pkr1* dans l'épicaide et ses dérivés entraîne des anomalies morphologique et fonctionnelle cardio-rénales.

A. Confirmation de l'absence du gène codant pour PKR1 dans l'épicarde des souris epi-PKR1^{-/-}

Pour connaître le rôle de la voie de signalisation PKR1 dans l'activité de l'épicarde, la vasculogénèse et la fonction cardio-rénale, nous avons généré une souris mutante invalidant spécifiquement le gène codant pour *Pkr1* au niveau de l'épicarde. Pour cela, nous avons croisé une souris contenant l'exon 2 du gène *Pkr1* flanqué de deux sites LoxP avec une souris dont l'expression de la recombinaise Cre est sous le contrôle du promoteur GATA-5 (souris GATA5-Cre). Ce croisement a donné lieu à la génération d'une souris dont l'inactivation du gène *Pkr1* est ciblée spécifiquement au niveau de l'épicarde, elle sera appelée tout le long de l'étude epi-PKR1^{-/-}.

Ainsi, dans un premier temps, nous avons voulu localiser, dans le cœur des souris WT nouveau-nées, les cellules exprimant GATA-5. Pour se faire, nous avons effectué une immunofluorescence indirecte, sur cryocoupes de cœurs de souris nouveau-nées WT, ciblant la protéine GATA-5. Nos résultats ont confirmé que l'expression de GATA-5 est bien confinée majoritairement à l'épicarde dans le cœur des souris WT au jour postnatal 1 (Cf. figure 35A).

Par la suite, nous avons voulu confirmer l'inactivation du gène *Pkr1* dans l'épicarde. Pour se faire, nous avons effectué une immunofluorescence indirecte, sur des cryocoupes de cœurs isolés au jour postnatal 1, co-localisant le facteur de transcription WT1 spécifique aux cellules de l'épicarde et le récepteur PKR1 (Cf. figure 35B). Nous avons démontré que chez les souris epi-PKR1^{-/-} la délétion de PKR1 était effective spécifiquement au niveau de l'épicarde. En effet, les cardiomyocytes (dystrophine⁺) exprimaient toujours le récepteur PKR1 (Cf. figure 35C). Une immunofluorescence indirecte a également mis en évidence que les cellules WT1⁺ dérivées des reins WT, au stade néonatal, exprimaient PKR1. Nous avons pu confirmer comme pour les cœurs epi-PKR1^{-/-} que les reins epi-PKR1^{-/-}, au jour postnatal 1, présentaient une invalidation spécifique du récepteur PKR1 au niveau des cellules WT1⁺ (Cf. figure 35D). De plus nous avons confirmé ces résultats *in vitro* puisque le marquage indirect des cellules epicardin⁺ dérivées des cœurs epi-PKR1^{-/-}, à l'aide un anticorps anti-PKR1, ne permettait pas de déceler la présence du récepteur à la membrane alors que les cellules epicardin⁺ dérivées des cœurs WT l'exprimaient (Cf. figure 35E).

Ainsi, nous avons confirmé que le marqueur GATA-5 est spécifique à l'épicaarde et est un marqueur valide spécifique aux cellules dérivant de l'épicaarde et permettant l'étude de leur activité dans le cœur. De plus, nous avons mis en évidence chez les souris *epi-PKR1^{-/-}* l'inactivation du récepteur PKR1, au niveau des cellules WT1⁺, retrouvées dans l'épicaarde et dans le rein. Il est important de noter que la délétion de PKR1 au niveau de l'épicaarde n'a pas causé de létalité embryonnaire.

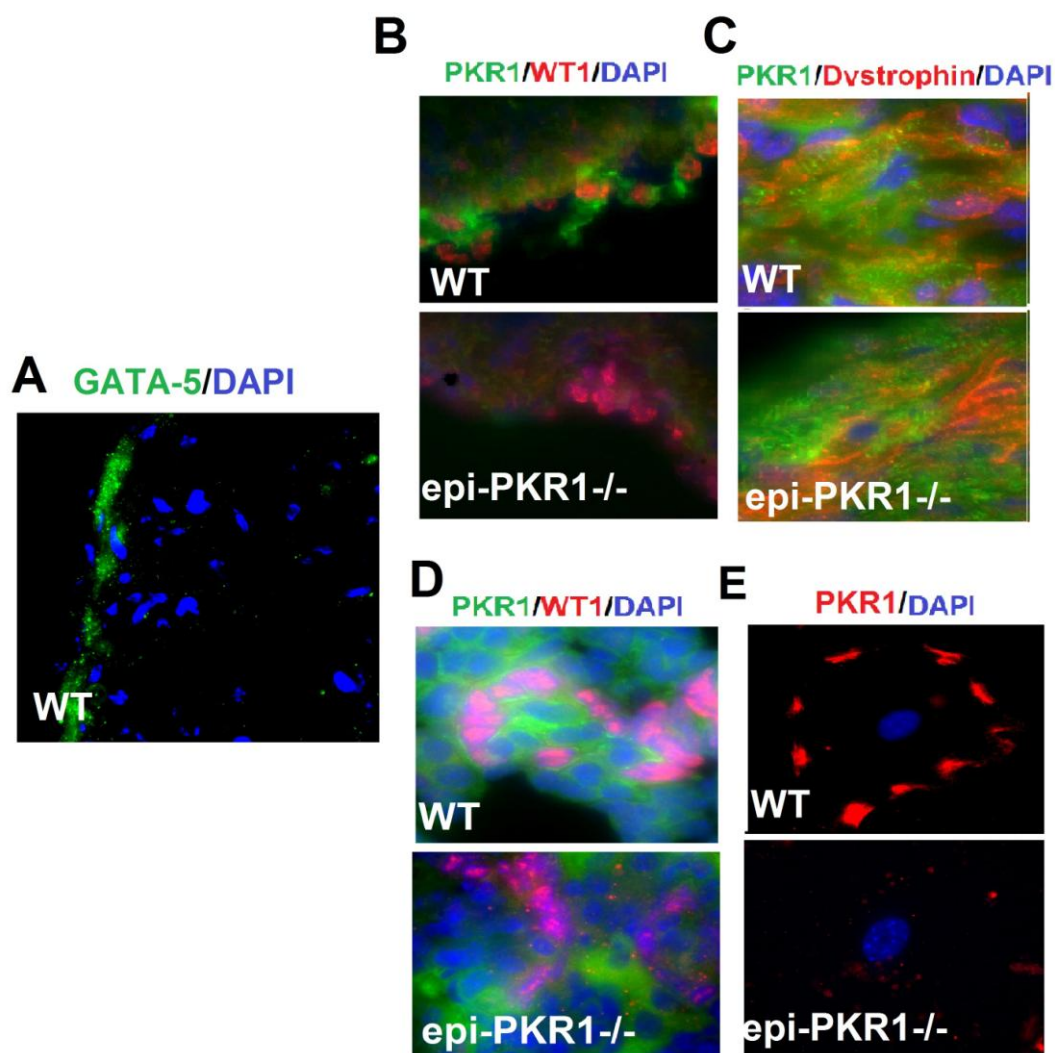


Figure 35. Expression de PKR1 dans les cœurs et reins des souris *epi-PKR1^{-/-}*

Immunofluorescence indirecte sur cryocoupes de cœurs au stade néonatal : A) WT ciblant GATA-5 ; B, C,D) WT et *epi-PKR1^{-/-}* ciblant PKR1 (vert) et WT1 (B, C) ou la dystrophine (C) (rouge). E) Immunofluorescence indirecte, effectuée sans détergent, sur des cellules epicardin⁺ extraites à partir de cœurs néonataux sauvages et *epi-PKR1^{-/-}* ciblant l'expression du récepteur PKR1.

B. Les souris epi-PKR1^{-/-} développent des anomalies cardiaques au jour postnatal 1

1. Anomalies de la structure et de la fonction cardiaque au jour postnatal 1

Des analyses histologiques ont démontré que les cœurs epi-PKR1^{-/-}, au stade néonatal, développaient une atrophie cardiaque qui se caractérisait principalement par une réduction des parois ventriculaires. Ces observations ont été confirmées par la mise en évidence d'une diminution du ratio poids du cœur mouillé sur poids total des souris epi-PKR1^{-/-} (Cf. figure 36A). Un examen histologique approfondi a démontré la désorganisation de l'architecture du myocarde dans les cœurs de souris epi-PKR1^{-/-} (Cf. figure 36B). L'examen microscopique a confirmé cette observation puisqu'il a mis en évidence un manque de cardiomyocytes dans l'aire myocardique des cœurs de souris epi-PKR1^{-/-} (Cf. figure 36B). De plus, le même examen a révélé la présence d'une altération structurale des mitochondries qui paraissaient hypertrophiques dans les cœurs de souris epi-PKR1^{-/-} (Cf. figure 36C). L'homéostasie mitochondriale est à mettre en corrélation avec la fonction cardiaque. Ainsi, nous avons recherché la présence de dysfonction des cardiomyocytes dans les cœurs epi-PKR1^{-/-}.

Dès lors, l'examen de la contractilité de cardiomyocytes, isolés de cœurs de souris WT et epi-PKR1^{-/-} au jour postnatal 1, a démontré le développement de défauts contractiles précoces se caractérisant par une altération de la réponse contractile à un traitement à la dobutamine (Cf. figure 36C). Une analyse de l'expression transcriptionnelle, des cœurs de souris néonatales, a démontré que l'expression du récepteur *β1ar* n'était pas altérée. Néanmoins, elle a permis de révéler une réduction de l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans le signal calcique incluant les gènes du *Plb*, du *Serca*, de l'échangeur *Ncx*, et du récepteur *RyrR* (Cf. figure 36D).

Les anomalies contractiles et mitochondriales sont le plus souvent associées à une accumulation de lipides. Ainsi, nous avons recherché la présence d'accumulation anormale de lipides par une coloration à l'oil red. Celle-ci a révélé, chez les souris epi-PKR1^{-/-} au jour postnatal 1, une accumulation de lipides étendue au niveau de l'épicarde (Cf. figure 36E). Ces observations ont été confirmées par l'extraction des lipides cardiaques par la méthode Folch qui a démontré une forte proportion de lipides dans les cœurs epi-PKR1^{-/-} au jour postnatal 1 (Cf. figure 36F). Enfin, une analyse de l'expression transcriptionnelle, au stade postnatal 1, des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique a démontré une surélévation de l'expression du gène CCAT/Enhancer Binding Protein (C/EBPα), principal inducteur de la lipogenèse, dans les cœurs de souris epi-PKR1^{-/-} (Cf. figure 36G).

Ces données ont révélé le développement d'une cardiomyopathie accompagnée d'altération de la fonction des cardiomyocytes et du métabolisme lipidique.

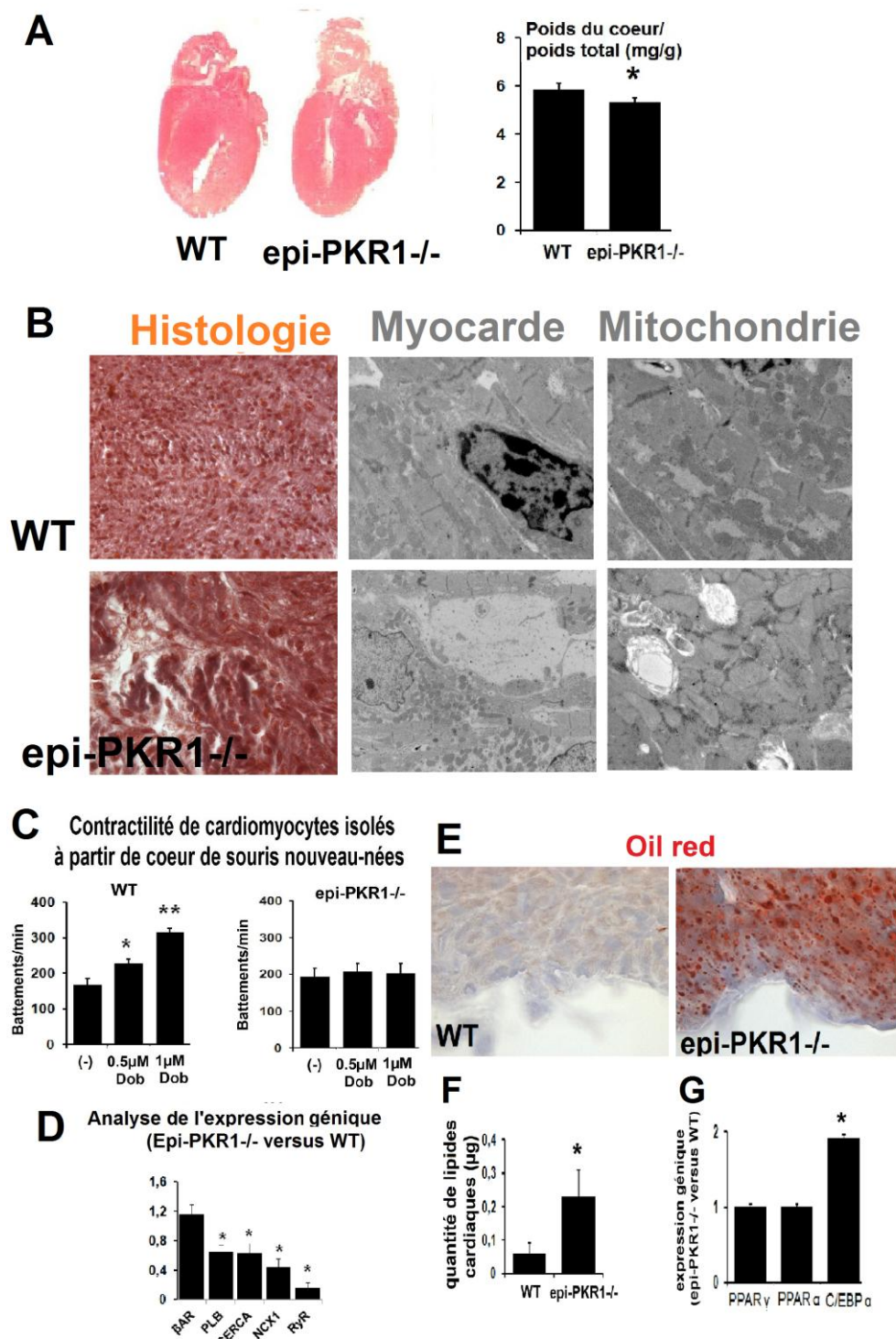


Figure 36. Analyses histologique, microscopique, contractilité des cardiomyocytes et accumulation de lipides des cœurs WT et epi-PKR1^{-/-} au stade néonatal

A) Coloration au trichrome de Mallory sur coupes paraffines de cœurs isolés au jour postnatal 1 (n=3). L'histogramme représente le poids du cœur mouillé normalisé par rapport au poids total (n=6, $p<0.05$). B) Analyse de la morphologie cardiaque par histologie et microscopie électronique au jour postnatal 1 (n=3) C) Contractilité, en battements par minute, des cardiomyocytes isolés à partir de cœurs de souris WT et epi-PKR1^{-/-} au jour postnatal 1. Trois conditions sont représentées : (-) sans traitement ; 0.5μM Dob : 0.5μM de dobutamine ; 1μM Dob : 1μM de dobutamine (n=6, $p<0.05$). D) Analyse de l'expression transcriptionnelle, sur des cœurs de souris extraits au jour postnatal 1, des gènes relatifs au récepteur β1ar, au Plb, Serca2b, à l'échangeur Ncx, et au récepteur RyR (n=4, $p<0.05$). E) Marquage à l'oil red montrant l'accumulation de lipide au sein de l'épicaarde. F) Histogramme représentant la quantité de lipides cardiaques en μg extraits par la méthode Folch (n=6, $p<0.05$). G) Analyse de l'expression transcriptionnelle des gènes Pparγ, Ppara et C/ebpa. Le gène 36b4 est utilisé comme gène de référence (n=4).

2. Altération de la prolifération des cellules cardiaques au jour postnatal 1

Par la suite, nous avons recherché comment la perte de la voie de signalisation PKR1 au niveau de l'épicaarde peut conduire à la réduction des parois ventriculaires et à l'altération de la contractilité et du métabolisme cardiaque. Nous avons ainsi analysé les phénomènes d'apoptose et de prolifération après la délétion de *Pkr1* au niveau de l'épicaarde.

L'analyse de l'apoptose, par la méthode TUNNEL, sur des cryocoupes de cœurs, n'a révélé aucune différence entre les cœurs WT et epi-PKR1^{-/-}, au jour postnatal 1 (Cf. figure 37A).

Le taux de prolifération cellulaire a été mesuré, par la suite, par le biais d'une injection systémique de BrdU afin de localiser les cellules néoformées et d'en quantifier leur nombre. Les souris nouveau-nées ont été sacrifiées 6 heures après l'injection de BrdU afin de permettre son incorporation dans les noyaux des cellules prolifératives. Ainsi, des immunofluorescences directes ont mis en évidence une réduction considérable du taux de cellules prolifératives au sein des cœurs epi-PKR1^{-/-} au jour postnatal 1 (Cf. figure 37B).

De plus, des co-immunofluorescences, localisant le BrdU avec les marqueurs des cellules cardiaques, ont démontré que les cellules progénitrices epicardin⁺, les cellules endothéliales PECAM-1⁺, les CML α-SMA⁺ et les cardiomyocytes dystrophine⁺, issus des cœurs epi-PKR1^{-/-}, étaient atteintes d'une altération de leur prolifération au jour postnatal 1 (Cf. figure 37C).

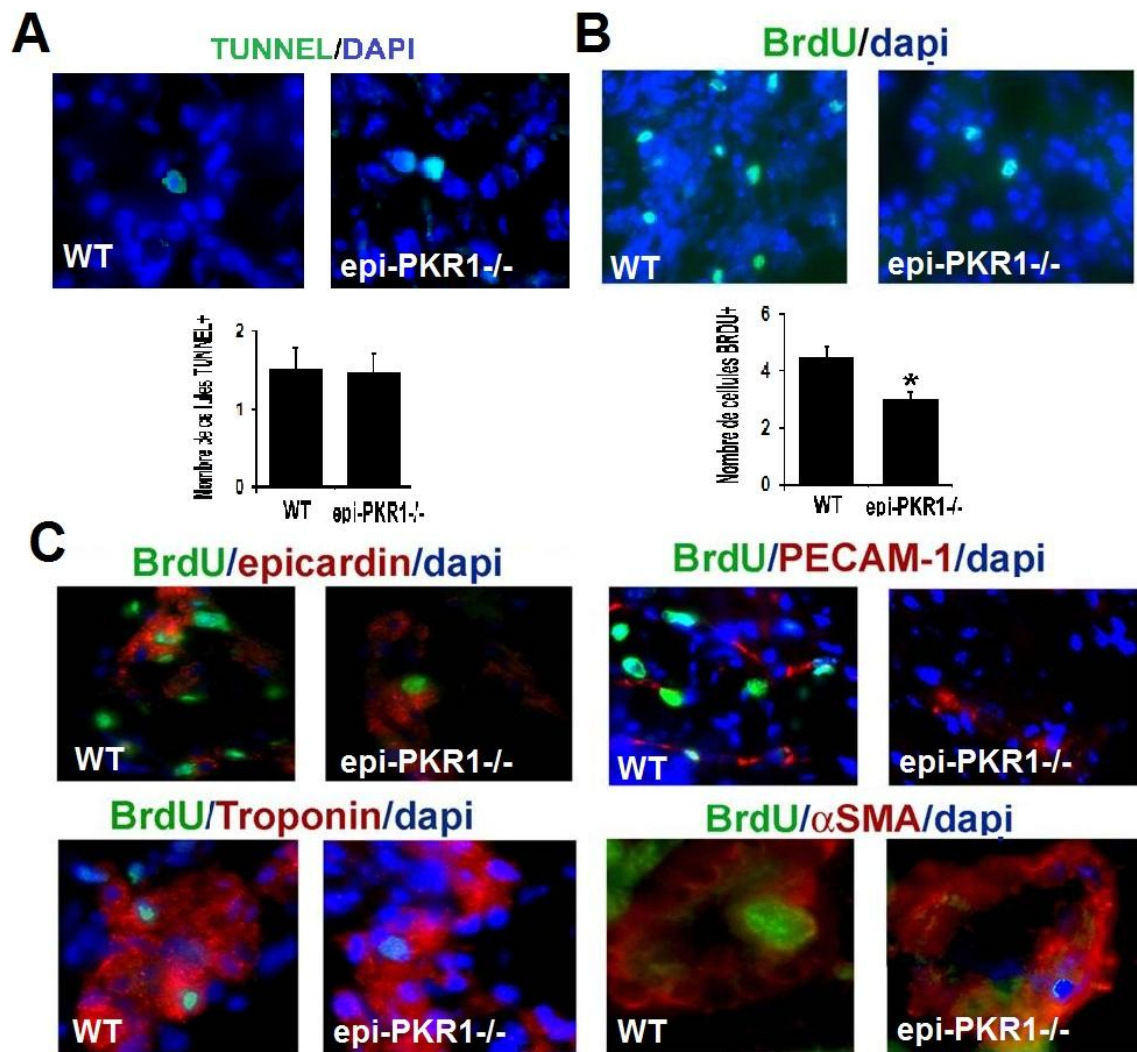


Figure 37. Apoptose et prolifération des cœurs WT et epi-PKR1^{-/-} au stade néonatal

A) Analyse de l'apoptose par la méthode TUNNEL sur des cryocoupes de cœurs dérivés de souris nouveau-nées. L'histogramme représente la quantification du nombre de cellules positives au TUNNEL (n=3). B) Analyse de la prolifération après injection de BrdU par immunofluorescence directe. L'histogramme représente le nombre de cellules positives au BrdU (n=3, $p < 0.05$). C) Co-localisation des cellules prolifératives positives au BrdU avec les marqueurs de cellules cardiaques : epicardin : EPDC ; dystrophine : cardiomyocytes ; PECAM-1 : cellules endothéliales ; α-SMA : CML.

3. Régression de l'angiogenèse et de l'artériogenèse au jour postnatal 1

La suite de nos investigations a concerné l'analyse de la vascularisation cardiaque. En effet, nous avons recherché si l'altération de la perfusion coronarienne pouvait être impliquée dans le développement des anomalies morphologiques cardiaques des souris *epi-PKR1^{-/-}* au jour postnatal 1.

Ainsi, nous avons entrepris des immunofluorescences indirectes, reconnaissant l'endothélium des capillaires sanguins PECAM-1⁺ et des vaisseaux α -SMA⁺, sur des cryocoupes de cœurs isolés de souris WT et *epi-PKR1^{-/-}* au jour postnatal 1. Ainsi, ces analyses ont démontré une réduction du réseau microvasculaire PECAM-1⁺ et une diminution du nombre des vaisseaux sanguins α -SMA⁺ dans les cœurs de souris *epi-PKR1^{-/-}* au jour postnatal 1 (Cf. figure 38).

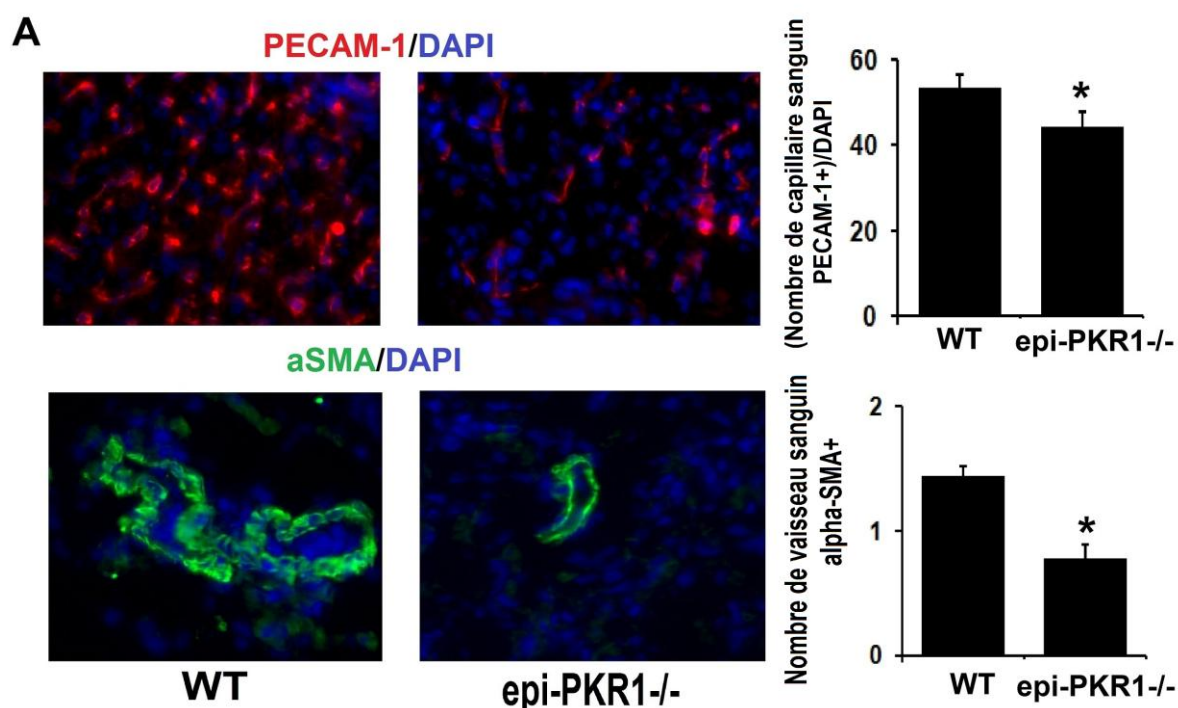


Figure 38. Angiogenèse et artériogenèse des cœurs WT et *epi-PKR1^{-/-}* au stade néonatal

Immunofluorescence indirecte sur cryocoupes de cœurs ciblant les capillaires sanguins PECAM-1⁺ et les vaisseaux sanguins α -SMA⁺. Les histogrammes représentent la quantification du pourcentage de cellules endothéliales PECAM-1⁺ normalisé par rapport au nombre de noyau DAPI ou la quantification du nombre de vaisseaux sanguins α -SMA⁺ (B) ($n=3$, $p<0.05$).

4. Altération des communications cellulaires cardiaques autocrines et paracrines provenant des cellules epicardin⁺ chez les souris epi-PKR1^{-/-}

Par la suite, nous avons décidé d'étudier la contribution des cellules epicardin⁺ dans les défauts de prolifération des cardiomyocytes et des cellules vasculaires dans les cœurs epi-PKR1^{-/-} au stade postnatal 1. Plus spécifiquement, nous avons recherché si la perte de la voie de signalisation PKR1 dans les cellules epicardin⁺ pouvait conduire à l'altération de la différenciation des cellules epicardin⁺ provoquant ainsi, de manière autocrine, la réduction du nombre de cardiomyocytes et la régression vasculaire dans les cœurs epi-PKR1^{-/-}.

- **Altération de la voie de signalisation autocrine gouvernant l'activité des cellules epicardin⁺ in vivo**

Ainsi, afin d'étudier la population cellulaire de cellules epicardin⁺ dans les cœurs au stade néonatal, nous avons procédé à des immunofluorescences sur cryocoupes de cœurs, au jour postnatal 1, visant à mettre en évidence la présence des populations cellulaires epicardin⁺.

Concernant les cœurs WT, ces analyses ont décelé la présence des cellules progénitrices epicardin⁺ principalement au niveau de l'épicaarde (Cf. figure 39). Ces cellules étaient également retrouvées dans le myocarde suggérant qu'elles subissaient des processus de migration cellulaire au sein du myocarde pour contribuer au développement postnatal du cœur. Nos analyses ont également révélé une diminution considérable des cellules progénitrices epicardin⁺ dans les cœurs de nouveau-nées epi-PKR1^{-/-} au jour postnatal 1 (Cf. figure 39).

De plus, étant donné le rôle des cellules epicardin⁺ dans la vasculogenèse et la morphogenèse cardiaque, nous avons recherché les précurseurs dérivant des cellules progénitrices epicardin⁺ par le biais d'immunofluorescences. Ainsi, nous avons démontré, dans les cœurs WT au jour postnatal 1, la présence en faible proportion de cellules exprimant à la fois la protéine epicardin et les marqueurs des cellules matures dont : la troponine C (cardiomyocytes), PECAM-1 (cellules endothéliales), α -SMA (CML). Par ailleurs, dans les cœurs epi-PKR1^{-/-} au jour postnatal 1, nos analyses ont permis de déceler la réduction de ces précurseurs cardiaques dérivants des cellules epicardin⁺ (Cf. figure 39).

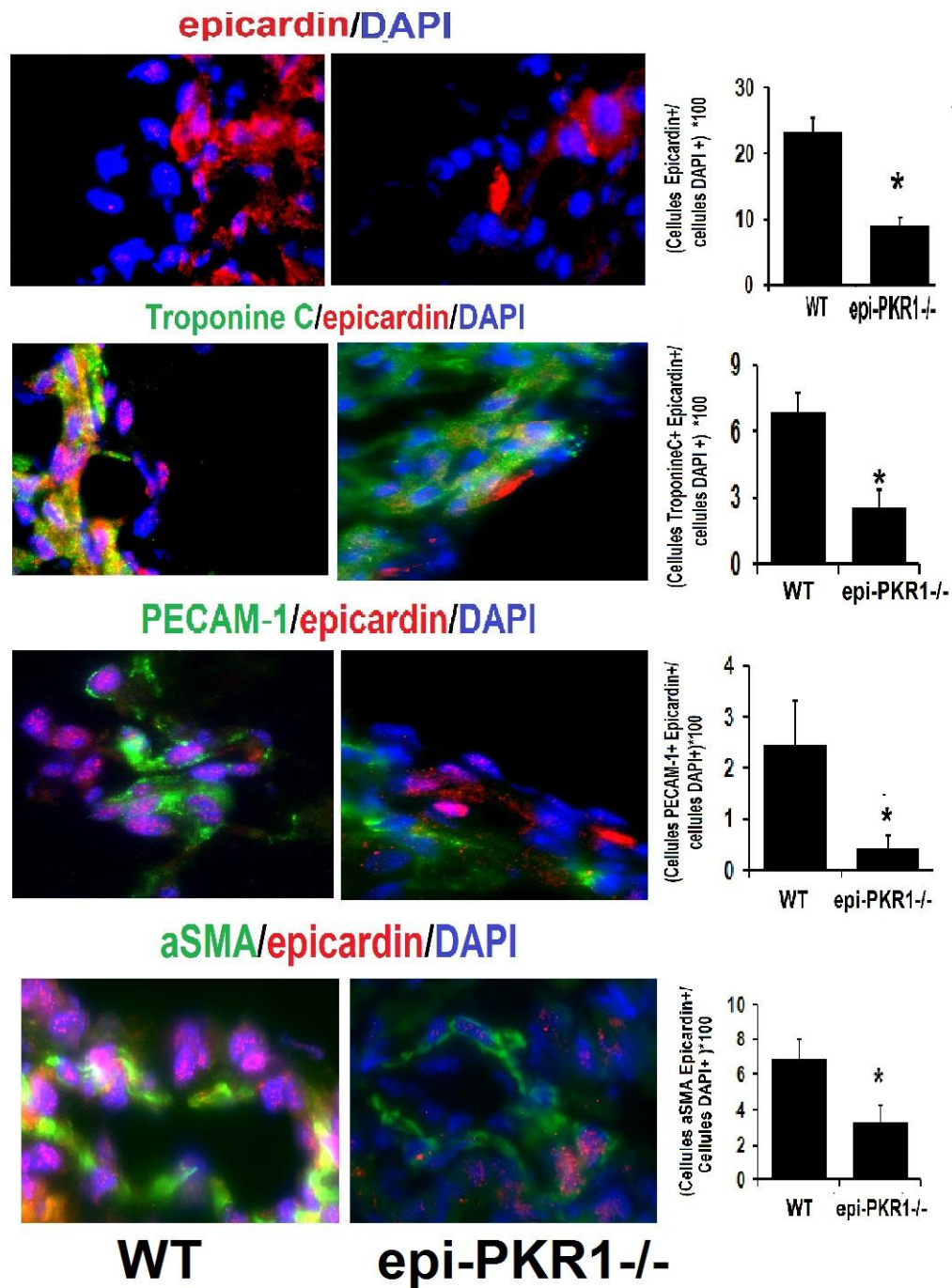


Figure 39. Précurseurs des cellules matures dans les cœurs WT et epi-PKR1^{-/-} au stade néonatal

Immunofluorescence indirecte sur cryocoupes de cœurs ciblant le facteur de transcription epicardin seul (rouge) ou le co-localisant avec la troponine C (cardiomyocytes), PECAM-1 (cellules endothéliales), α -SMA (CML) (vert). Les histogrammes représentent la quantification du pourcentage de cellules epicardin⁺ ou de précurseurs normalisé par rapport au nombre de cellules DAPI ($n=3$, $p<0.05$).

- **Etude du contrôle par la PK2 de la différenciation des cellules epicardin⁺ en lignées vasculaires et de cardiomyocytes**

La voie de signalisation PK2/PKR1 active la différenciation des cellules provenant d'explants cardiaques, qui se composent à 95% de cellules epicardin⁺, en cellules endothéliales et CML (Urayama et al., 2008).

Nous avons ici voulu savoir si la PK2 était capable d'induire la différenciation des cellules epicardin⁺ provenant d'une population de cellules isolées de cœurs néonataux. Ainsi après leur extraction, les cellules ont été déposées sur puits et les différenciations en cellules endothéliales et CML ont été initiées par traitement à 5 ou 10nM de PK2.

Des immunofluorescences indirectes ont permis de mettre en évidence que la PK2 était capable de favoriser la différenciation des cellules epicardin⁺ en cellules endothéliales VEGFR2⁺ et CML α SMA⁺ (Cf. figure 40A et B).

Nous avons continué, par la suite, à étudier la plasticité cellulaire des cellules epicardin⁺. Des études ont pu démontrer le rôle des cellules epicardin⁺ durant le développement cardiaque. Ainsi, ces cellules epicardin⁺ contribuent à la morphogenèse cardiaque puisqu'elles peuvent donner naissance aux cardiomyocytes *in vivo* (Zhou et al., 2008a). Aucune étude n'a démontré la capacité de différenciation des cellules epicardin⁺ en cardiomyocytes *in vitro*. Cependant, une étude a pu mettre en évidence que le facteur FGF-2 est capable de favoriser la différenciation des cellules cardiaques Sca1⁺, dérivées de cœurs au jour postnatal 1, en cardiomyocytes contractiles sous l'action d'un traitement approprié (Rosenblatt-Velin et al., 2005).

Nous avons donc supposé que la PK2 ou le FGF-2 étaient capables d'induire la différenciation des cellules epicardin⁺, extraites de cœurs néonataux, en cardiomyocytes contractiles après un traitement approprié contenant du glycérophosphate, du DMX et de l'acide ascorbique (milieu CM). Après 30 jours de traitement avec le milieu CM, la contractilité des cellules a été analysée à l'aide d'un vidéo microscope.

De façon surprenante, nos analyses ont démontré la présence de cellules contractiles dans les conditions CM+ PK2 et CM+ FGF-2 alors que le milieu CM seul n'induisait pas la génération de cellules contractiles. Par ailleurs, le traitement à la dobutamine, agoniste β -adrénergique, conduisait à une augmentation significative de la contractilité des cellules issues des

conditions CM+PK2 et CM+FGF-2. Ces résultats ont démontré que les cardiomyocytes générés dans les deux conditions (PK2 et FGF-2) étaient fonctionnels. Enfin, les cellules ont été marquées à l'aide d'une immunofluorescence indirecte ciblant l' α -actinine cardiaque confirmant que les cellules contractiles générées par le traitement CM+PK2 ou CM+FGF-2 étaient bien des cardiomyocytes (Cf. figure 40C).

Ces résultats ont démontré que la PK2 joue un rôle dans le contrôle de la différenciation des cellules epicardin⁺ en activant la différenciation en cellules endothéliales, CML et cardiomyocytes.

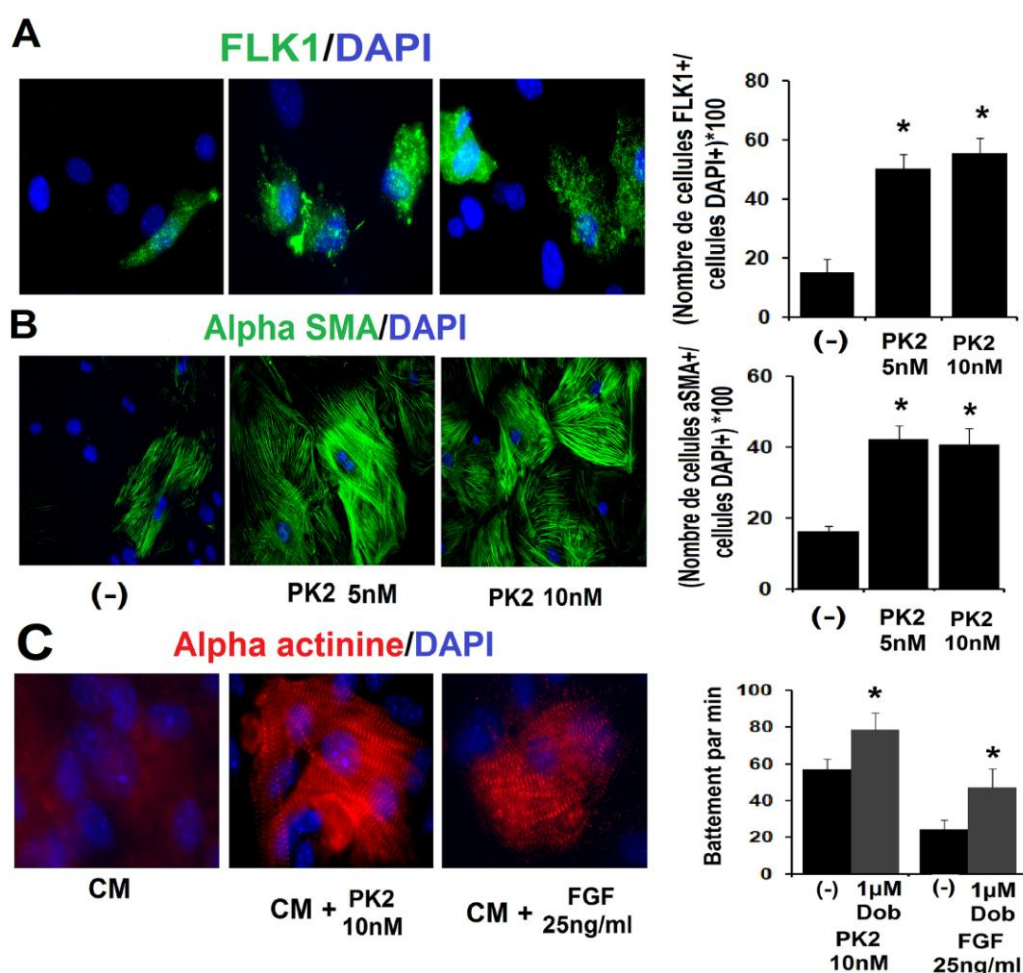


Figure 40. Différenciation des cellules epicardin⁺ cardiaques en cellules vasculaires et cardiomyocytes.

A,B) Immunofluorescence indirecte localisant les cellules endothéliales VEGFR2 (FLK1)⁺ (A) et les CML α -SMA⁺ (B) lors du traitement ou non des cellules epicardin⁺ à la PK2 (5 ou

10nM, 48h pour les cellules endothéliales et 24h pour les CML). Les histogrammes représentent la quantification du nombre de cellules $FLK1^+$ ou $\alpha\text{-SMA}^+$ normalisé par rapport aux noyaux DAPI ($n=3$, $p<0.05$). C) Immunofluorescence indirecte localisant l' α -actinine cardiaque sur des cellules epicardin⁺ traitées par un milieu induisant la cardiomyogenèse avec ou sans traitement à la PK2 10nM ou au FGF-2 25ng/ml pendant 30 jours. L'histogramme représente le nombre de contraction par minute observé par vidéo microscopie après 30 jours de traitement ($n=3$, $p<0.05$).

- **Les cœurs de souris epi-PKR1^{-/-} sont atteints au jour postnatal 1 d'une altération de la communication cellulaire paracrine**

Par la suite nous avons recherché l'impact de la délétion de *Pkr1* spécifique aux cellules epicardin⁺ sur l'interaction paracrine entre les cellules epicardin⁺ et les cellules cardiaques matures pouvant être responsable de l'altération de la fonction des cardiomyocytes et de la régression du réseau capillaire. Ainsi, nous avons décidé d'étudier le rôle des facteurs libérés par les cellules progénitrices epicardin⁺ sur la fonction contractile des cardiomyocytes.

Pour cela, nous avons mis en présence des cardiomyocytes néonataux WT avec du milieu conditionné provenant des cellules epicardin⁺ WT ou epi-PKR1^{-/-} (la première condition sera appelée CM-WT et la deuxième CM-epi-PKR1^{-/-}). Le milieu a été changé tout les deux jours et après 5 jours, la capacité de contraction des cardiomyocytes a été mesurée.

A ce titre, nous avons observé une réduction considérable de la fonction contractile des cardiomyocytes mis en présence avec du milieu de cellules epicardin⁺ epi-PKR1^{-/-} comparé au WT (246,51 battements/min et 159.1 battements/min pour les CM-WT et CM-epiPKR1^{-/-} respectivement). L'ajout de dobutamine, agoniste β AR, permettait l'augmentation significative de la contractilité des CM-WT alors qu'elle n'agissait pas sur la contraction des CM-epi-PKR1^{-/-} (Cf. figure 41A). Ces données ont révélé que la fonction contractile des cardiomyocytes était altérée en présence de milieu conditionné provenant des cellules progénitrices epicardin⁺ epi-PKR1^{-/-}. Ces résultats ont démontré que la voie de signalisation PKR1 est nécessaire pour l'activation de facteurs paracrines libérés par les cellules epicardin⁺ et joue un rôle dans la régulation de la contraction des myocytes cardiaques.

- **Altération de la communication cellulaire entre les cellules epicardin⁺ et les cellules endothéliales**

Par la suite, nous avons mesuré la prolifération des cellules endothéliales cardiaques, H5V, en présence de milieu conditionné provenant des cellules epicardin⁺ WT ou epi-PKR1^{-/-} (la première condition sera appelée H5V-WT et la deuxième H5V-epi-PKR1^{-/-}) pendant 24 heures et 48 heures. La prolifération des cellules H5V a été quantifiée par comptage manuel.

Ainsi, la prolifération des cellules H5V-WT était augmentée de manière temps-dépendante (Cf. figure 41B) par rapport à la prolifération basale des cellules H5V en présence de 15% de FCS. Ces résultats ont démontré que les facteurs libérés par les cellules epicardin⁺ sont capables de stimuler la prolifération des cellules endothéliales cardiaques. Nous avons ensuite démontré que la prolifération des cellules H5V-epi-PKR1^{-/-} n'était pas stimulée puisqu'elle était identique à la prolifération basale des cellules H5V en présence de 15% de sérum (Cf. figure 41B). Ces résultats démontrent que la voie de signalisation PKR1 est nécessaire pour l'activation de facteurs paracrines libérés par les cellules epicardin⁺ et joue un rôle dans la stimulation de la prolifération des cellules endothéliales cardiaques.

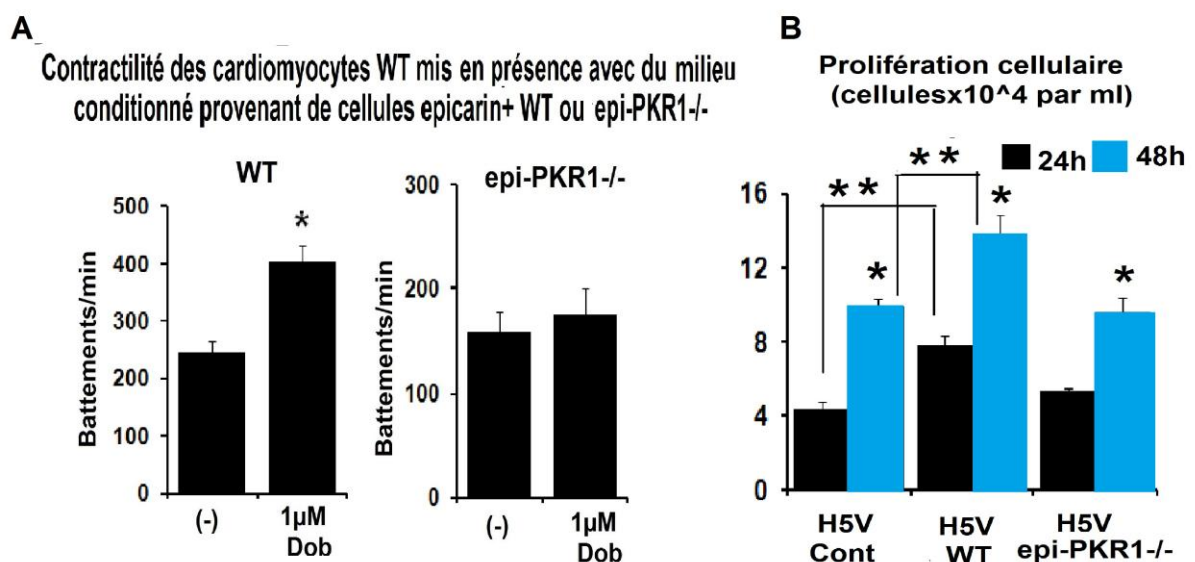


Figure 41. Contrôle paracrine de l'activité des cellules endothéliales et cardiomyocytes par la voie de signalisation PKR1 dépendante des cellules epicardin⁺ cardiaques

A) Contractilité de cardiomyocytes WT mis en présence de milieu de cellules epicardin⁺ dérivées de cœurs WT et epi-PKR1^{-/-}. Les histogrammes représentent la contractilité des

cardiomyocytes en battements par minute avec deux conditions : (-) : sans traitement ; $1\mu\text{M}$ Dob: $+1\mu\text{M}$ dobutamine ($n=4$, $p<0.05$). B) Prolifération de cellules H5V mises en présence de milieu de cellules epicardin⁺ dérivées de cœurs WT et epi-PKR1^{-/-} après 24 heures et 48 heures. L'unité est cellule* 10^4 /ml. (* significatif par rapport à 24 heures et **significatif par rapport à la condition contrôle) ($n=4$, $p<0.05$).

La perte de la voie de signalisation PKR1 spécifique aux cellules epicardin⁺ conduit à l'altération des fonctions autocrines et paracrines des cellules epicardin⁺. Ces anomalies sont responsables des anomalies fonctionnelles des cardiomyocytes, de la régression du réseau vasculaire et de la réduction des parois ventriculaires chez les souris epi-PKR1^{-/-} au stade néonatal.

C. Les souris epi-PKR1^{-/-} développent une cardiomyopathie hypertrophique à l'âge adulte

1. Dysmorphie et dysfonction cardiaques à l'âge adulte

Nous avons ensuite décidé de rechercher si les anomalies observées au stade néonatal pouvait affecter la morphologie et la fonction cardiaque des souris epi-PKR1^{-/-} à des âges avancés.

Ainsi, des analyses histologiques ont démontré que les cœurs des souris epi-PKR1^{-/-} à l'âge de 24 semaines étaient atteints d'atrophie caractérisée par une réduction de l'épaisseur des parois ventriculaires (Cf. figure 42A). Ces observations ont été confirmées par la mesure du ratio poids du cœur mouillé sur poids total qui s'avérait ainsi réduit chez les souris epi-PKR1^{-/-} à 24 semaines (Cf. figure 42B). Corroborant ces résultats, une analyse échocardiographique, pratiquée à 24 semaines, a démontré la réduction du poids du ventricule gauche chez les souris epi-PKR1^{-/-} (Cf. figure 42C). Par ailleurs, des analyses histologiques, par coloration au trichrome de Mallory, ont démontré l'altération de la formation du mésenchyme sous épicaordique chez les souris epi-PKR1^{-/-} caractérisée par un contact physique entre l'épicarde et le myocarde (Cf. figure 42D).

Les examens histologiques, par coloration au trichrome de Mallory, ont mis en évidence la présence d'une fibrose interstitielle dans les cœurs epi-PKR1^{-/-} (Cf. figure 42E). En concordance avec ces résultats, l'analyse de l'expression transcriptionnelle a révélé la

surexpression des gènes *Col1a1* et *Col1a3* dans les cœurs epi-PKR1^{-/-} à 24 semaines (Cf. figure 42F).

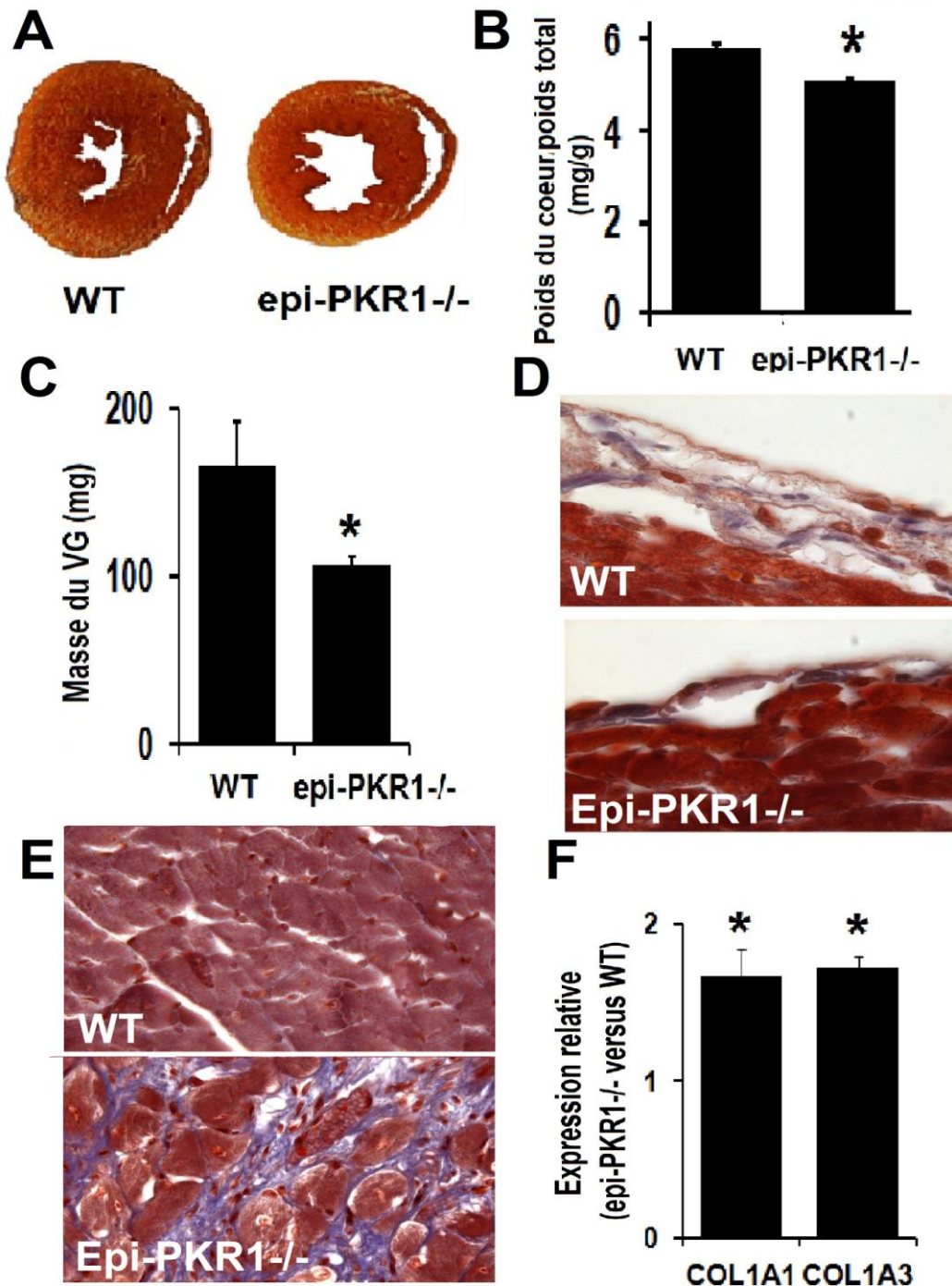


Figure 42. Analyse histologique des cœurs de souris WT et epi-PKR1^{-/-} à 24 semaines

A) Coloration au Trichrome de Mallory sur cryocoupes de cœurs isolés à 24 semaines (n=3).
 B) Histogramme représentant le poids du cœur mouillé normalisé par rapport au poids total (n=15, p<0.01). C) Mesure par échocardiographie de la masse du ventricule gauche (VG) en

mg ($n=5$, $p<0.05$) D) Coloration au trichrome de Mallory sur coupes paraffines de cœurs isolés à 24 semaines. La section représente, chez les souris WT, l'épicarde et le myocarde séparé par le mésenchyme sous-épicardique. Chez les souris *epi-PKR1^{-/-}*, l'épicarde et le myocarde sont reliés par un contact physique direct. E) Coloration au trichrome de Mallory sur coupes paraffines de cœurs isolés à 24 semaines. La fibrose est indiquée en bleu. E) Mesure par PCRq du niveau d'expression relatif des gènes du collagène *1a1* et *1a3* ($n=4$).

2. Hypertrophie des cardiomyocytes à l'âge adulte

Une mesure de la morphométrie des cardiomyocytes, par le biais d'une immunofluorescence indirecte, pratiquée à l'âge de 24 semaines et visant la dystrophine, a permis de révéler une augmentation de l'aire des cardiomyocytes composant les cœurs *epi-PKR1^{-/-}* (Cf. figure 43A). De plus, la même analyse effectuée sur des cardiomyocytes isolés, confirmait cette observation puisque la taille des cardiomyocytes isolés des cœurs *epi-PKR1^{-/-}* à l'âge de 24 semaines avait augmenté (Cf. figure 43B).

Il est donc évident que les souris *epi-PKR1^{-/-}* développaient une cardiomyopathie dilatée compensée par une hypertrophie des cardiomyocytes.

Cependant à 24 semaines, les cœurs *epi-PKR1^{-/-}* ne présentaient pas une élévation de l'expression des gènes hypertrophiques. Seul le gène *Bnp* était surexprimé dans les cœurs *epi-PKR1^{-/-}* à 24 semaines. A contrario, l'analyse de l'expression transcriptionnelle sur les cœurs isolés à 3 semaines a décelé, chez les souris *epi-PKR1^{-/-}*, une réduction de l'expression de l' α -*Mhc* alors que la β -*Mhc*, l'*Anf* et le *Bnp* étaient surexprimés (Cf. figure 43C). Ces résultats ont démontré que les mécanismes hypertrophiques se développaient dès le plus jeune âge dans les cœurs *epi-PKR1^{-/-}* et la réduction des gènes hypertrophiques observée à 24 semaines était sans doute reliée à l'apparition de mécanismes de décompensation.

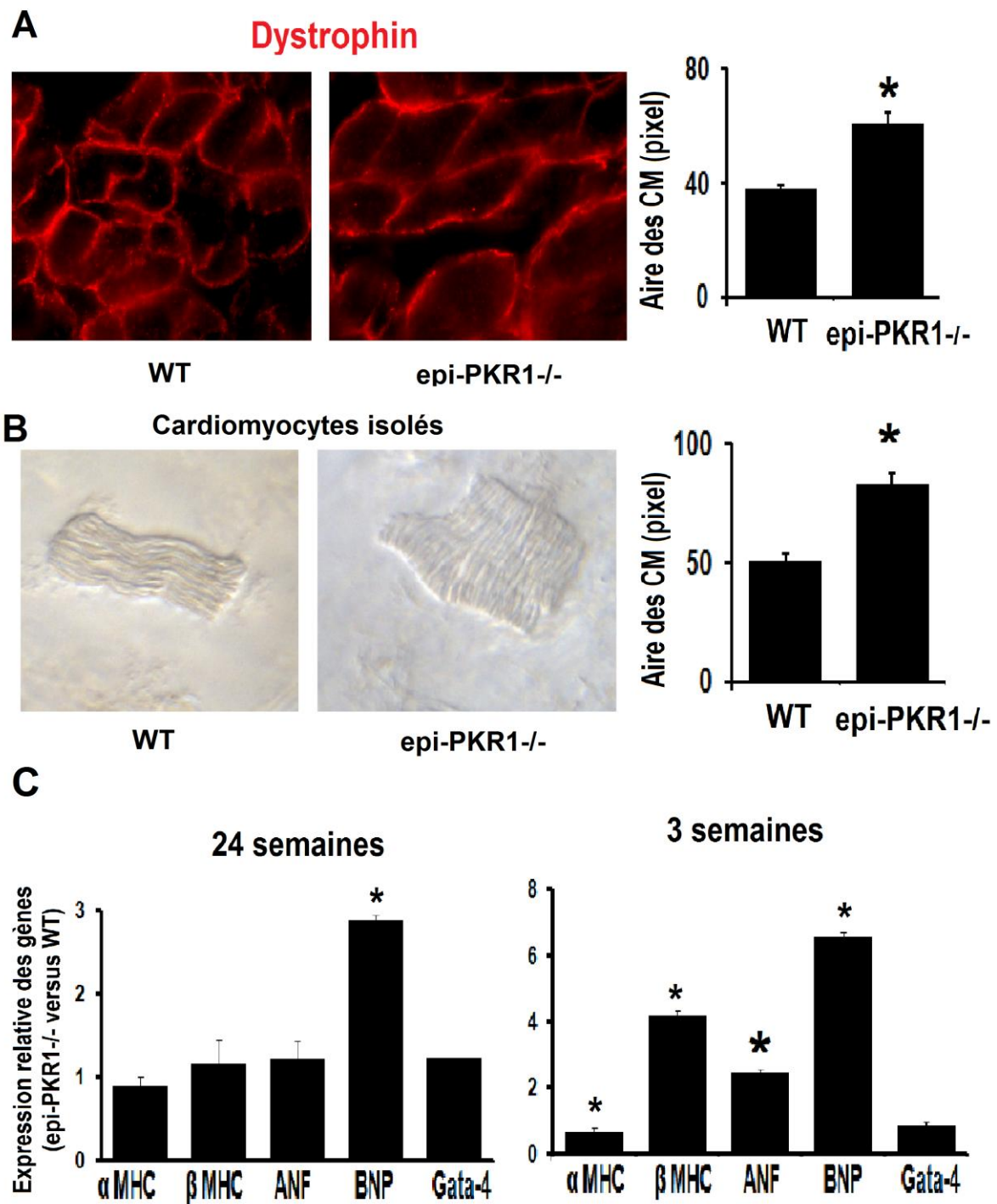


Figure 43. Analyse morphométrique des cardiomyocytes et de l'expression des gènes hypertrophiques des cœurs WT et epi-PKR1^{-/-} à l'âge adulte

A) Immunofluorescence indirecte, ciblant la dystrophine, sur cryocoupes de cœurs à l'âge de 24 semaines. L'histogramme représente la mesure de l'aire des cardiomyocytes par le logiciel ImageJ (n=3, p<0.05). B). Cardiomyocytes isolés de cœurs de souris à l'âge de 24 semaines. L'histogramme représente la mesure de l'aire des cardiomyocytes par le logiciel imageJ (n=3, p<0.05). C) Expression relative des gènes hypertrophiques incluant l'α-Mhc, la β-Mhc,

l'Anf, le Bnp et Gata4 à 3 et 24 semaines. L'expression des gènes est normalisé par rapport au gène de référence 36b4 (n=4).

3. Anomalies de la structure cardiaque

Ainsi, un examen sur coupe au microscope électronique, au stade de 24 semaines, a démontré un élargissement des myofibrilles confirmant le développement d'une hypertrophie compensatrice (Cf. figure 44A).

Il a mis également en évidence la présence de mitochondries anormales d'un point de vue de leur distribution au sein du myocarde mais également d'un point de vue structural puisqu'elles apparaissaient gonflées ou dégénérescentes (Cf. figure 44A-B).

De plus, le myocarde était également dégénérescent puisque nous avons pu observer la dégradation des myofibrilles accompagnée de phénomènes d'autophagie (Cf. figure 44B-C).

Enfin, les capillaires sanguins présentaient une organisation anarchique de leur endothélium semblant correspondre à un phénotype de type fenestration (Cf. figure 44D).

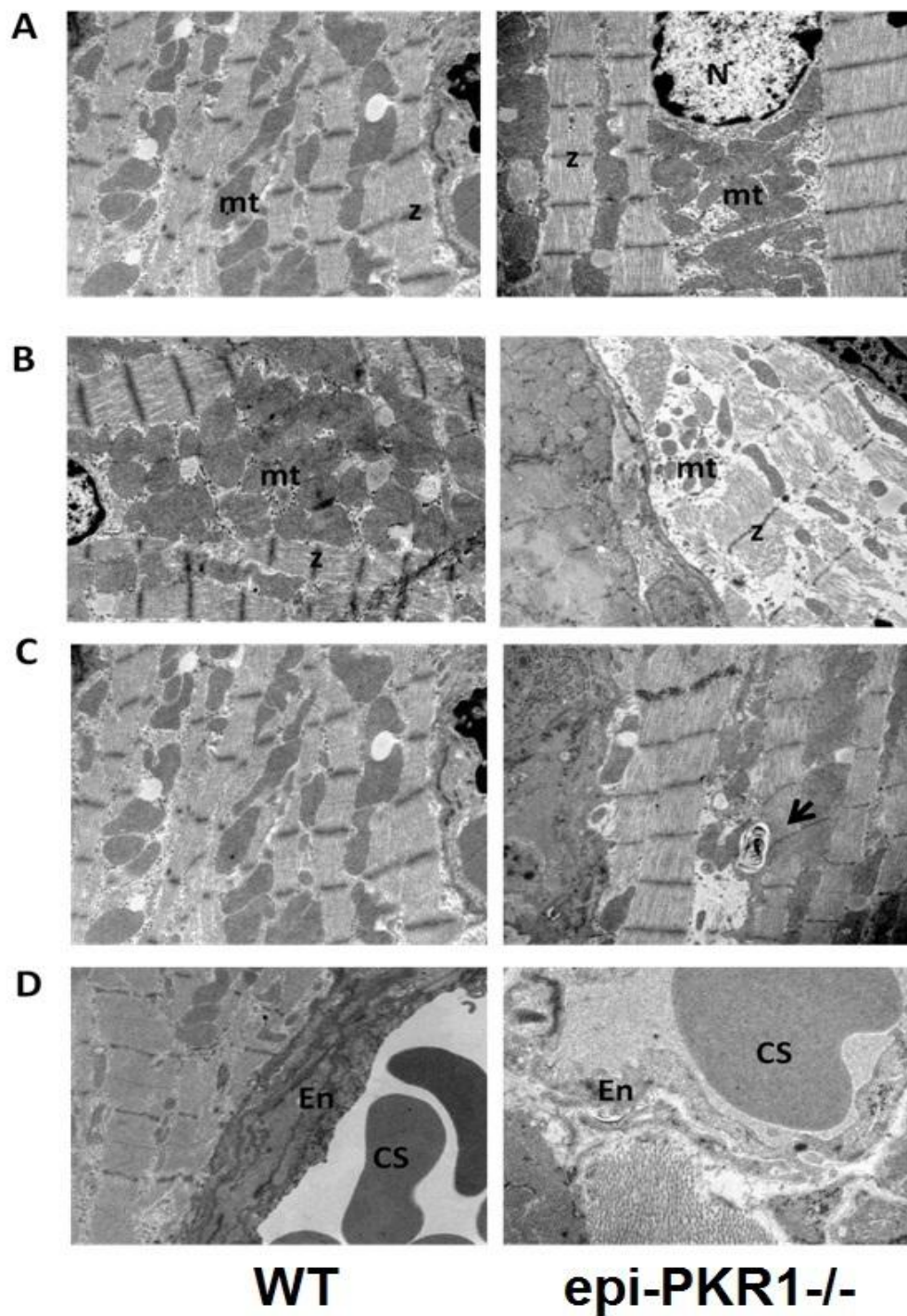


Figure 44. *Vue en coupe par microscopie électronique de cœurs de souris à 24 semaines*

A, B,C) Représentation des structures myocardiques. mt : mitochondries, z : bande z, N : noyaux, la flèche noire représente les phénomènes d'autophagie. D) Représentation des capillaires, En : endothélium, GR : globules rouges, N : noyau.

4. Altération de la fonction mitochondriale

Après la révélation des défauts structuraux des mitochondries, nous avons choisis de mener une étude plus approfondie de la fonction de l'enzyme SDH impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale.

Ainsi, au stade de 24 semaines, nous avons constaté une réduction de l'activité mitochondriale des cœurs epi-PKR1^{-/-} puisque l'intensité de couleur représentant l'activité de la SDH était considérablement diminuée (Cf. figure 45A). Par la suite, nous avons décidé de contrôler le métabolisme des lipides au sein du myocarde.

Toujours au stade de 24 semaines, un marquage à l'oil red a démontré la présence d'accumulation de lipides augmentée significativement dans certaines zones du myocarde et de l'épicarde (Cf. figure 45B). Cependant, l'extraction de lipides par la méthode Folch n'a pas mis en évidence une différence significative dans l'accumulation de lipides entre les cœurs WT et epi-PKR1^{-/-} (Cf. figure 45C). Néanmoins, au vu de la réduction de l'activité mitochondriale et de la détérioration de la structure des mitochondries des cœurs epi-PKR1^{-/-}, nous avons recherché les accumulations localisées des lipides dans les cœurs epi-PKR1^{-/-}. Ainsi, la mesure du nombre de gouttelettes lipidiques a révélé une accumulation localisée des lipides dans les cœurs epi-PKR1^{-/-} (Cf. figure 45D). Enfin, une analyse de l'expression transcriptionnelle a démontré que les deux principaux activateurs du métabolisme lipidique incluant, *Pparγ* et *C/ebpa*, étaient surexprimés dans les cœurs epi-PKR1^{-/-} à 24 semaines (Cf. figure 45E).

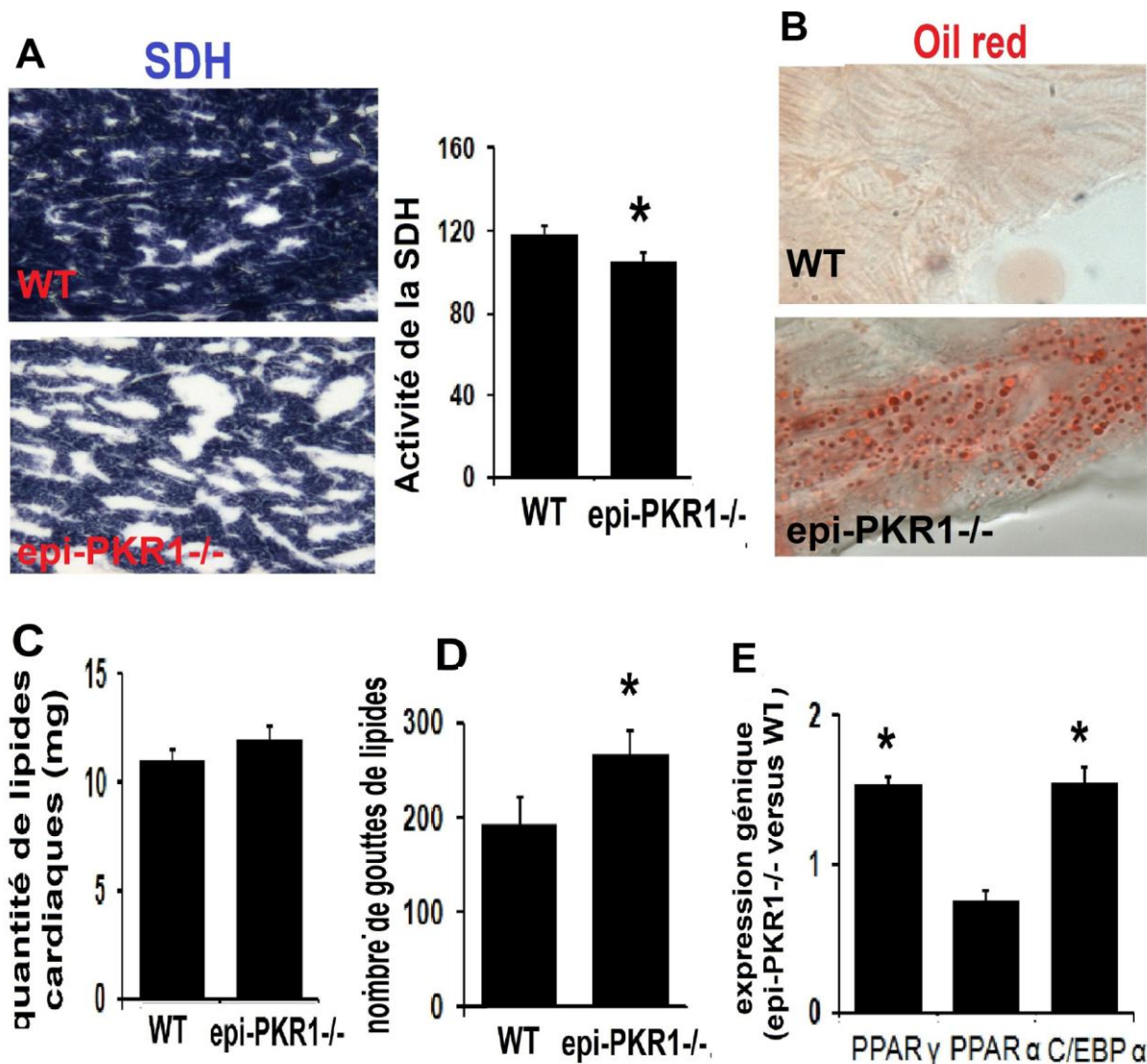


Figure 45. Analyse de la fonction mitochondriale des cœurs WT et epi-PKR1^{-/-} à 24 semaines

A) Analyse de l'activité de la SDH. L'histogramme représente la quantification par le logiciel ImageJ de la couleur de la SDH ($n=3$, $p<0.05$). B) Marquage à l'oil red montrant l'accumulation de lipides ($n=3$). C) L'histogramme représente la quantité de lipides cardiaques (en mg) extraits par la méthode Folch ($n=6$, $p<0.05$). D) Histogramme représentant la quantification par le logiciel ImageJ du nombre de gouttelettes de lipides au sein du myocarde et de l'épicarde ($n=3$, $p<0.05$). E) Analyse de l'expression transcriptionnelle des gènes *Ppar γ* , *Ppara* et *C/ebp α* . Le gène 36b4 est utilisé comme référence ($n=4$).

5. Apoptose abondante à l'origine de la réduction de la masse du ventricule gauche

Afin de déterminer quelles étaient les causes pouvant être à l'origine de la réduction de la paroi du ventricule gauche, nous avons choisis de quantifier le nombre de cellules en apoptose au sein des cœurs WT et epi-PKR1^{-/-} à 24 semaines.

Ainsi, une analyse par TUNNEL a démontré une forte proportion de cellules en apoptose dans les cœurs epi-PKR1^{-/-} à 24 semaines (Cf. figure 46A).

De plus, une co-immunofluorescence ciblant la caspase-3 (protéase pro-apoptotique) et la troponine C (marqueur des cardiomyocytes) révélait qu'une forte proportion des cardiomyocytes issus des cœurs epi-PKR1^{-/-} de 24 semaines entraient dans des processus d'apoptose (Cf. figure 46B).

Par ailleurs, cette même co-immunofluorescence ciblant la caspase-3 et le facteur epicardin a mis en évidence qu'une forte proportion des cellules progénitrices epicardin⁺ était également en apoptose (Cf. figure 46B). Confirmant ces résultats, une immunofluorescence indirecte a démontré à 24 semaines la réduction du nombre de cellules epicardin⁺ dans les cœurs epi-PKR1^{-/-} (Cf. figure 46C).

Au vu de ces observations révélant l'amplification de l'apoptose et donc le déclenchement de processus hypoxiques, nous avons cherché à savoir si l'altération de l'angiogenèse et de l'artériogenèse, observée au stade néonatal, était compensée ou maintenue à l'âge adulte. Pour cela, nous avons effectué des immunofluorescences indirectes à l'âge de 24 semaines qui ont démontré une réduction du nombre de capillaires sanguins PECAM⁺ et de vaisseaux α -SMA⁺ dans les cœurs epi-PKR1^{-/-} à 24 semaines (Cf. figure 46D).

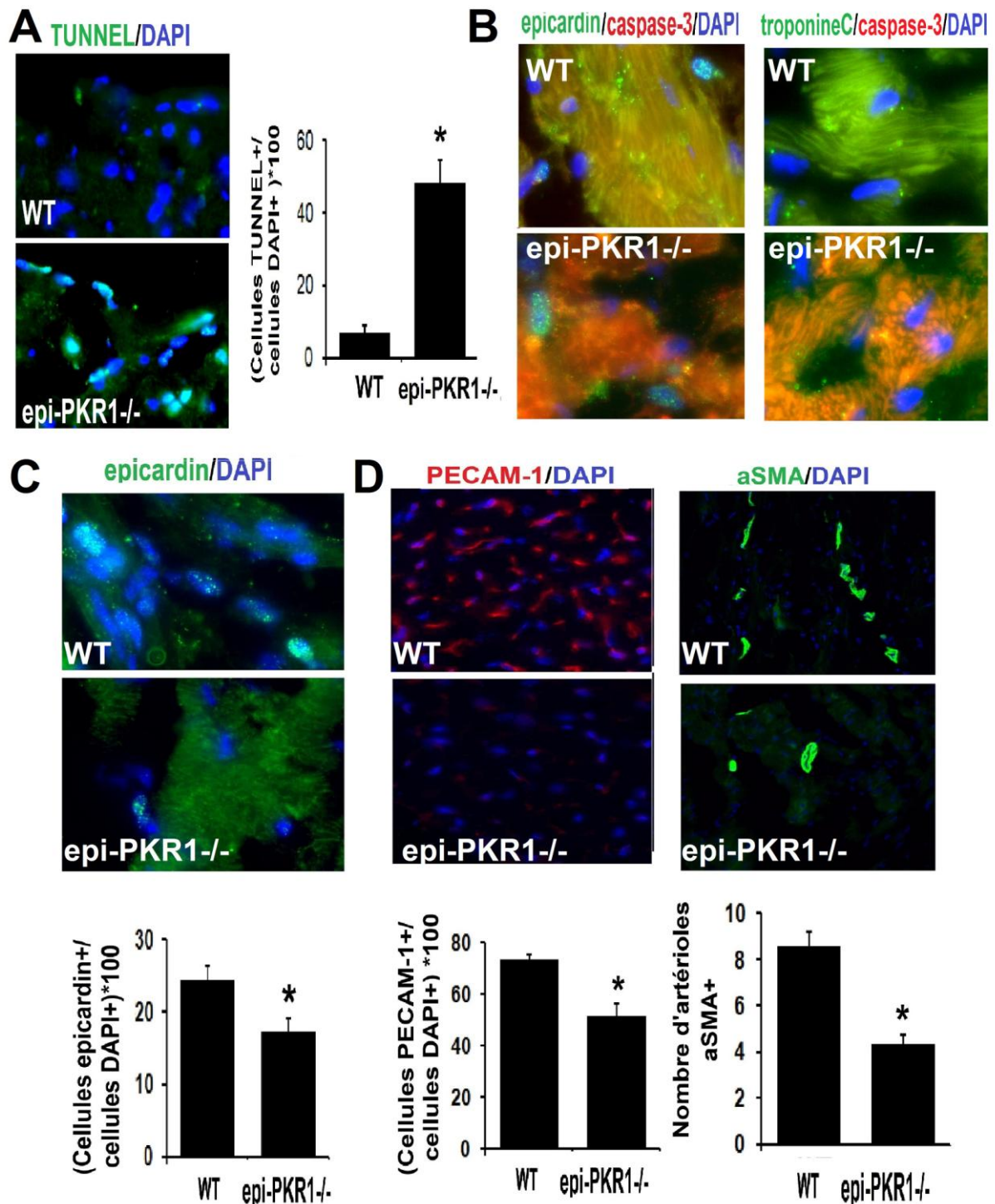


Figure 46. Apoptose et vascularisation de cœurs WT et epi-PKR1^{-/-} à 24 semaines

A) Analyse de l'apoptose par la méthode TUNNEL sur cryocoupes de cœurs à 24 semaines. L'histogramme représente la quantification du nombre de cellules TUNNEL⁺ normalisé par rapport au nombre de noyau DAPI. B) Immunofluorescence indirecte co-localisant le marqueur epicardin ou troponine C (vert) et la caspase-3 (rouge) sur des cryocoupes de

cœurs à 24 semaines. D) Immunofluorescence indirecte sur cryocoupes de cœurs à 24 semaines ciblant le facteur de transcription epicardin. L'histogramme représente la quantification du pourcentage de cellules epicardin⁺ normalisé par rapport au nombre de noyau DAPI (n=3, p<0.05). D) Immunofluorescence indirecte sur cryocoupes de cœurs à 24 semaines ciblant les cellules endothéliales PECAM-1⁺ (gauche) et les vaisseaux α -SMA⁺. Les histogrammes représentent la quantification du nombre de cellules PECAM-1⁺ normalisé par rapport au nombre de noyau DAPI (n=3, p<0.05) et la quantification nombre des vaisseaux α -SMA⁺ (n=3, p<0.05).

6. Dysfonction cardiaque à l'âge adulte

Une échocardiographie pratiquée à l'âge de 24 semaines a révélé le développement d'anomalies fonctionnelles sévères. Ainsi, le diamètre interne du ventricule gauche était augmenté alors que l'épaisseur de sa paroi antérieure était réduite (Cf. tableau 12).

A coté de cela, nous avons constaté une altération de la fonction ventriculaire puisque les fractions d'éjection et de raccourcissement étaient réduites (Cf. figure 47A).

Ces anomalies étaient également accompagnées d'une augmentation du volume ventriculaire et d'œdèmes pulmonaires mise en évidence par l'augmentation du ratio poids du poumon mouillé sur le poids total (Cf. figure 47A et tableau 12).

Par ailleurs, un électrocardiogramme, effectué sur des souris au stade de 24 semaines, a démontré la présence d'une tachycardie associée à une ischémie (Cf. figure 47B).

Nous avons voulu également analyser le taux de survie des souris en condition de stress. Pour cela, nous avons employé un modèle d'infarctus du myocarde par ligature permanente de l'artère coronaire gauche descendante. Nous avons démontré que le taux de survie, 56 jours après l'infarctus, était considérablement réduit chez les souris epi-PKR1^{-/-} puisque 71% de ces souris ont succombées à la ligature de l'artère coronaire alors que le pourcentage se réduisait à 56% chez les souris WT.

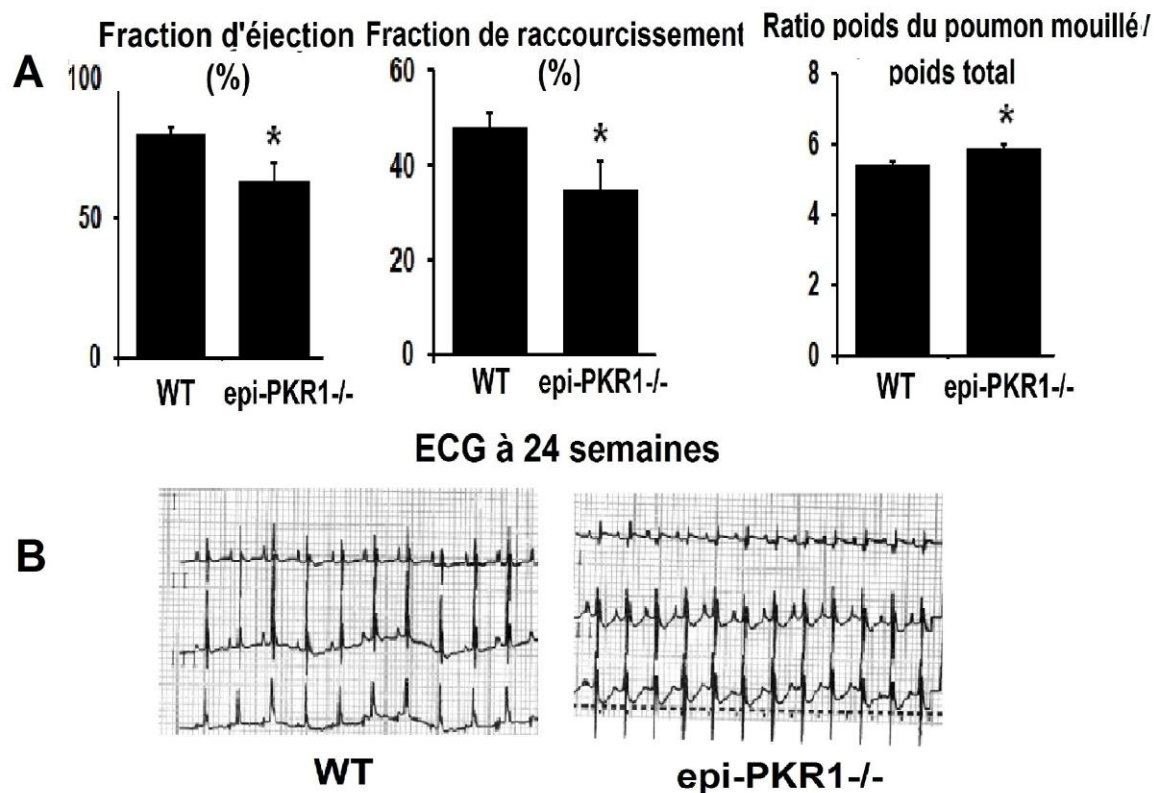


Figure 47. ECG et analyse de la fonction cardiaque des souris WT et epi-PKR1^{-/-}

A) Mesure par échocardiographie de la fraction d'éjection et de raccourcissement (%) ($n=5$, $p<0.05$) et mesure du ratio poids du poumon mouillé sur poids totale ($n=15$, $p<0.01$). B) Electrocardiogramme (ECG) de souris au stade 24 semaines représentant une tachycardie et un sous-décalage ST chez la souris epi-PKR1^{-/-}.

Tableau 12 : Echocardiographie à 24 semaines (n=5).

DIVG diamètre interne du VG ; PPVG : paroi postérieure du VG ; PAVG paroi antérieure du ventricule gauche ; VG ventricule gauche ; d diastole, s systole

	WT	Epi-PKR1^{-/-}
DIVG (d) (mm)	3.37±0.24	3.73±0.11
PPVG (d) (mm)	1.27±0.15	1.02±0.14
DIVG (s) (mm)	1.76±0.19	2.46±0.28*
PPVG (s) (mm)	1.87±0.07	1.45 ±0.15*
PAVG (d) (mm)	1.09±0.10	0.99 ±0.02
PAVG (s) (mm)	1.65±0.12	1.29±0.05*
Volume VG (d) (µl)	56.935 ±10.7	59.75±4.14
Volume du VG (s) (µl)	10.94 ±2.22	23.39±5.64*
Fraction d'éjection (%)	80.04 ±2.77	62.83±7.27*
Fraction de raccourcissement (%)	48.09±3	34.76±5.93*
Masse VG (mg)	165.32 (±26.7)	106.48±4.72*

L'altération des fonctions autocrine et paracrine des cellules epicardin⁺ dépendante de la délétion de la voie de signalisation PKR1 conduit au développement d'une cardiomyopathie dilatée compensée par une hypertrophie des cardiomyocytes. Les souris epi-PKR1^{-/-} développent une ischémie dépendante de la régression du réseau vasculaire coronarien, une amplification de l'apoptose, une dysfonction mitochondriale accompagnée de lipotoxicité et une mortalité accrue après un infarctus du myocarde.

D. Les souris epi-PKR1^{-/-} développent des anomalies rénales au stade néonatal

1. Anomalies de la morphologie rénale, de la structure des glomérules et des tubules rénaux

A la naissance les reins des souris epi-PKR1^{-/-} apparaissaient hypoplasiques puisque le ratio poids du rein mouillé sur poids total était considérablement réduit. Par ailleurs, l'analyse histologique des reins epi-PKR1^{-/-} a décelé également l'apparition d'hypoplasie avancée (Cf. figure 48A).

Ces résultats ont démontré grâce à la mise en évidence de la dysmorphie rénale que le développement de la pathologie rénale n'était pas du à la cardiomyopathie décrite précédemment mais dépendait directement de l'inactivation de *Pkr1* spécifiquement au niveau de l'épicarde.

Une analyse par microscopie électronique a décelé une atrophie des podocytes accompagnée d'un effacement de leurs pédicelles le plus généralement caractéristique des glomérulopathies. De plus, l'endothélium et la membrane basale des glomérules epi-PKR1^{-/-} paraissaient amincis (Cf. figure 48B).

Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'analyse de la structure des tubules rénaux. Ainsi, un examen de coupes de reins néonatales en microscope électronique a démontré l'absence, dans de nombreuses cellules tubulaires, d'invaginations essentielles à la fonction des tubules rénaux chez les souris nouveau-nées epi-PKR1^{-/-}.

De plus, le même examen a permis de déceler, dans les reins epi-PKR1^{-/-} au jour postnatal 1, la présence de mitochondries anormales dont le nombre et la densité étaient réduits. Dans les reins WT, les mitochondries paraissaient allongées et d'une taille moyenne alors que dans les reins epi-PKR1^{-/-} elles paraissaient de forme arrondie et le plus souvent atrophique.

Nous avons également observé la présence d'une forte accumulation de lipides dans les cellules tubulaires rénales, provenant des reins epi-PKR1^{-/-} au jour postnatal 1 (Cf. figure 48C). Nous détectons également la présence d'accumulation lipidique qui a été mise en évidence par l'extraction des lipides par la méthode Folch et par un marquage de cryocoupes de reins à l'oil red (Cf. figure 49D).

Les souris epi-PKR1^{-/-} développent une pathologie rénale au stade néonatal caractérisée par une hypoplasie tissulaire et une altération des structures tubulaires et glomérulaires.

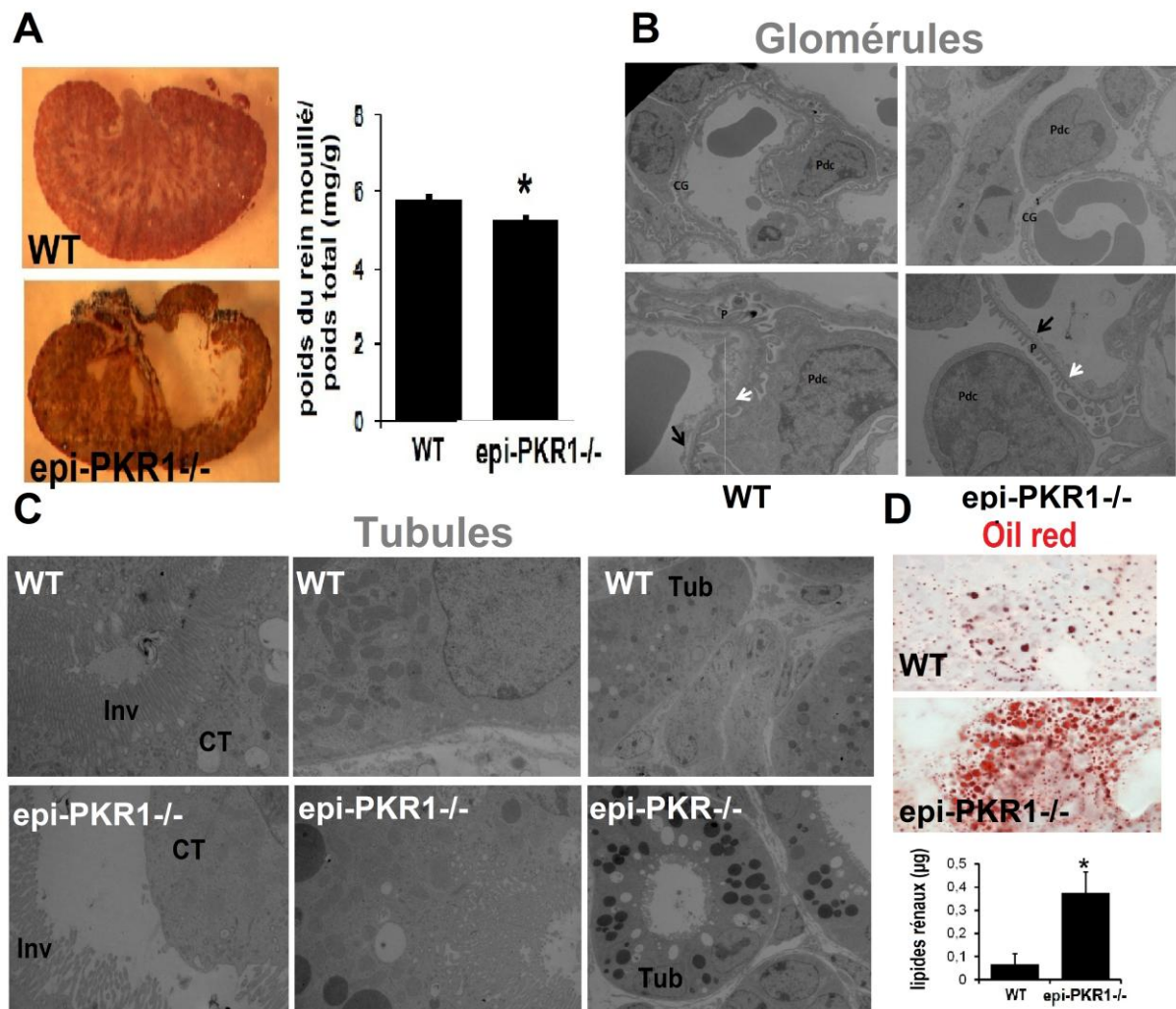


Figure 48. Analyse histologique et microscopique et accumulation de lipides des reins WT et epi-PKR1^{-/-} au stade néonatal

A) Examen histologique par coloration au trichrome de Mallory de cryocoupages de reins au stade néonatal (n=3). L'histogramme représente le poids du rein mouillé sur le poids total en mg par g (n=6, p<0.05). B) Analyse en microscopie électronique sur coupes de reins au stade néonatal. Les images représentent la structure glomérulaire. CG : capillaires glomérulaires, Pdc : podocytes, P : pédicelles, la flèche noire représente l'endothélium fenestré, la flèche blanche représente la membrane basale glomérulaire. C) Analyse en microscopie électronique sur coupe de reins au stade néonatal. Les images représentent la structure tubulaire. Inv : invagination des cellules tubulaires (CT), Tub : tubules, les flèches indiquent

les mitochondries. D) Coloration à l'oil red de cryocoupes de reins néonatales. L'histogramme représente la quantité de lipides rénaux en μg extraits par la méthode Folch.

2. Altération de la prolifération cellulaire

Par la suite, nous avons recherché comment la délétion de PKR1 spécifique à l'épicaarde peut causer des altérations de la morphologie et de la structure rénale. Plus particulièrement, si l'hypoplasie rénale des souris epi-PKR1^{-/-} est due à une perte de la prolifération ou à une amplification de l'apoptose.

Concernant l'apoptose, nous n'avons observé aucune intensification de celle-ci dans les reins epi-PKR1^{-/-} au stade néonatal puisque l'analyse par TUNNEL a révélé un même taux de mort cellulaire entre les reins WT et epi-PKR1^{-/-} (figure 49A).

Pour la quantification de la prolifération cellulaire des reins, nous avons entrepris une injection systémique de BrdU afin de localiser les cellules néoformées et d'en quantifier leur nombre. Nous avons suivi le même schéma d'injection et de préparation tissulaire que pour le cœur. Ainsi, des immunofluorescences directes ont mis en évidence une réduction considérable du taux de cellules prolifératives au sein des reins epi-PKR1^{-/-} (Cf. figure 59B). De plus, des co-localisations du BrdU avec les marqueurs des cellules rénales ont permis de mettre en évidence une altération de la prolifération, au stade néonatal, des cellules progénitrices rénales (epicardin⁺), des cellules endothéliales glomérulaires (PECAM-1⁺) et des podocytes (Podocin⁺) dérivées des reins epi-PKR1^{-/-} (Cf. figure 49C).

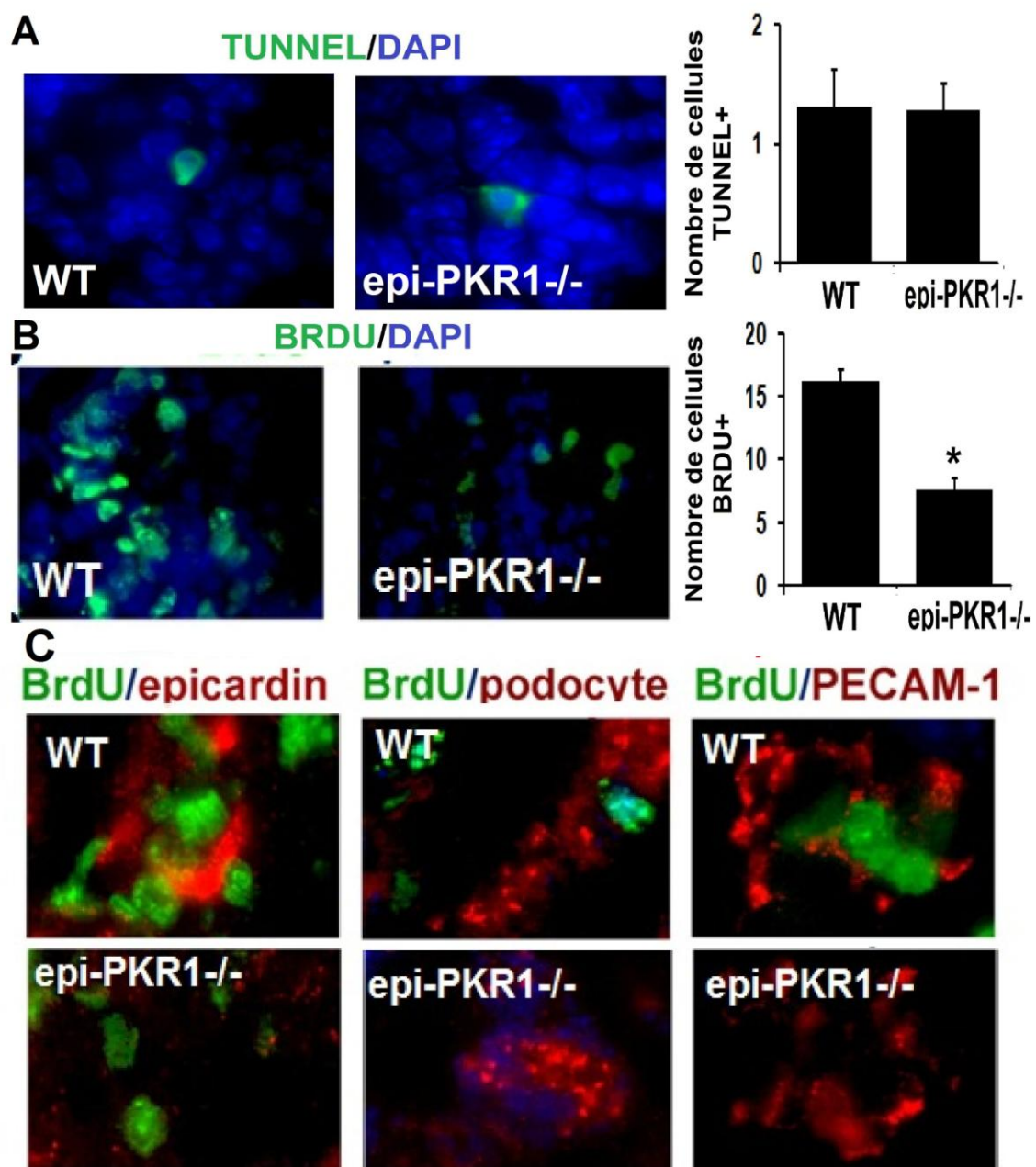


Figure 49. Prolifération et apoptose des reins WT et epi-PKR1^{-/-} au stade néonatal

A) Analyse de l'apoptose par la méthode TUNNEL sur des cryocoupes de reins dérivés de souris nouveau-nées. L'histogramme représente la quantification du nombre de cellules positives au TUNNEL ($n=3$, $p<0.05$). B) Analyse de la prolifération sur cryocoupes de reins après injection de BrdU par immunofluorescence directe. L'histogramme représente le nombre de cellules positives au BrdU ($n=3$, $p<0.05$). C) Co-localisation du marqueur epicardin, PECAM-1 et podocin (rouge) avec le BrdU (vert) sur cryocoupes de reins dérivés de souris néonatale

3. Altération de l'angiogenèse et de l'artériogenèse

Nous avons recherché par la suite si les défauts morphologiques et structuraux observés chez les souris *epi-PKR1*^{-/-} étaient dus à une baisse des réseaux sanguins rénaux.

Nous avons démontré à l'aide d'une immunofluorescence indirecte que les glomérules *epi-PKR1*^{-/-} présentaient un défaut de développement de leurs capillaires sanguins caractérisé par une réduction du nombre de cellules PECAM-1⁺. Cependant, ces analyses n'ont pas décelé la réduction du nombre de capillaires sanguins PECAM-1⁺ mais ont révélé la baisse du nombre de vaisseaux α -SMA⁺ (Cf. figure 50).

Ces données ont permis de démontrer, dans les reins epi-PKR1^{-/-} au jour postnatal 1, le développement du réseau interstitiel microvasculaire PECAM-1⁺ normal mais l'altération de l'artériogenèse rénale et de l'angiogenèse glomérulaire.

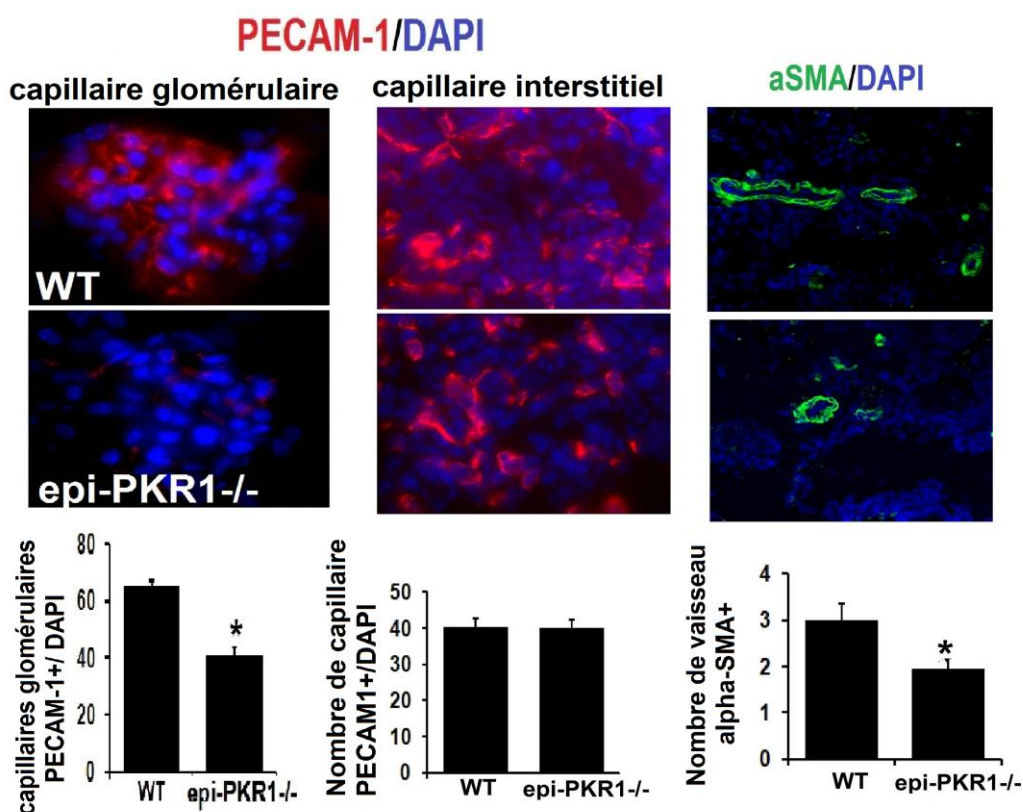


Figure 50. Angiogenèse et artériogenèse des reins WT et *epi-PKR1*^{-/-} au stade néonatal

Immunofluorescence indirecte sur cryocoupes de reins ciblant les cellules endothéliales glomérulaires et interstitielles PECAM-1⁺ et les vaisseaux α -SMA⁺. Les histogrammes représentent la quantification du pourcentage de cellules endothéliales glomérulaires ou interstitielles PECAM-1⁺ normalisé rapport au nombre de noyau DAPI ou la quantification du nombre de vaisseau α -SMA⁺ (n=3, p<0.05).

4. Altération des communications cellulaires rénales autocrine et paracrine provenant des cellules epicardin⁺ chez les souris epi-PKR1^{-/-}

- **Réduction du nombre de cellules progénitrices epicardin⁺ et des précurseurs en dérivant dans les reins de souris epi-PKR1^{-/-}**

Nous avons recherché la contribution des cellules epicardin⁺ dans l'hypoplasie rénale et l'altération de l'angiogenèse glomérulaire et l'artériogenèse rénale. Plus particulièrement, nous avons souhaité étudier si la perte de *Pkr1* dans les cellules epicardin⁺ pouvait induire une altération de la prolifération des cellules endothéliales glomérulaires.

Afin d'étudier la population cellulaire de cellules epicardin⁺ dans les reins au stade néonatal, nous avons procédé à des immunofluorescences sur cryocoupes de reins visant à mettre en évidence la présence des populations cellulaires epicardin⁺. Ces analyses ont décelé, au niveau des reins WT au jour postnatal 1, la présence d'une forte proportion cellulaire de cellules epicardin⁺ essentiellement localisée au niveau du cortex et semblant migrer et contribuer au développement postnatal du rein. Nos analyses ont également révélé une diminution considérable des cellules progénitrices epicardin⁺ dans les reins de nouveau-nées epi-PKR1^{-/-} (Cf. figure 51).

Nous avons recherché les précurseurs dérivant des cellules progénitrices epicardin⁺ par le biais d'immunofluorescences. Ainsi, nous avons démontré, dans les reins WT au jour postnatal 1, la présence en faible proportion de cellules exprimant à la fois la protéine epicardin et les marqueurs des cellules matures incluant PECAM-1 (cellules endothéliales) et α -SMA (CML). Par ailleurs, dans les reins epi-PKR1^{-/-} au jour postnatal 1, nos analyses ont

permis de déceler la réduction de ces précurseurs rénaux dérivants des cellules epicardin⁺ (Cf. figure 51).

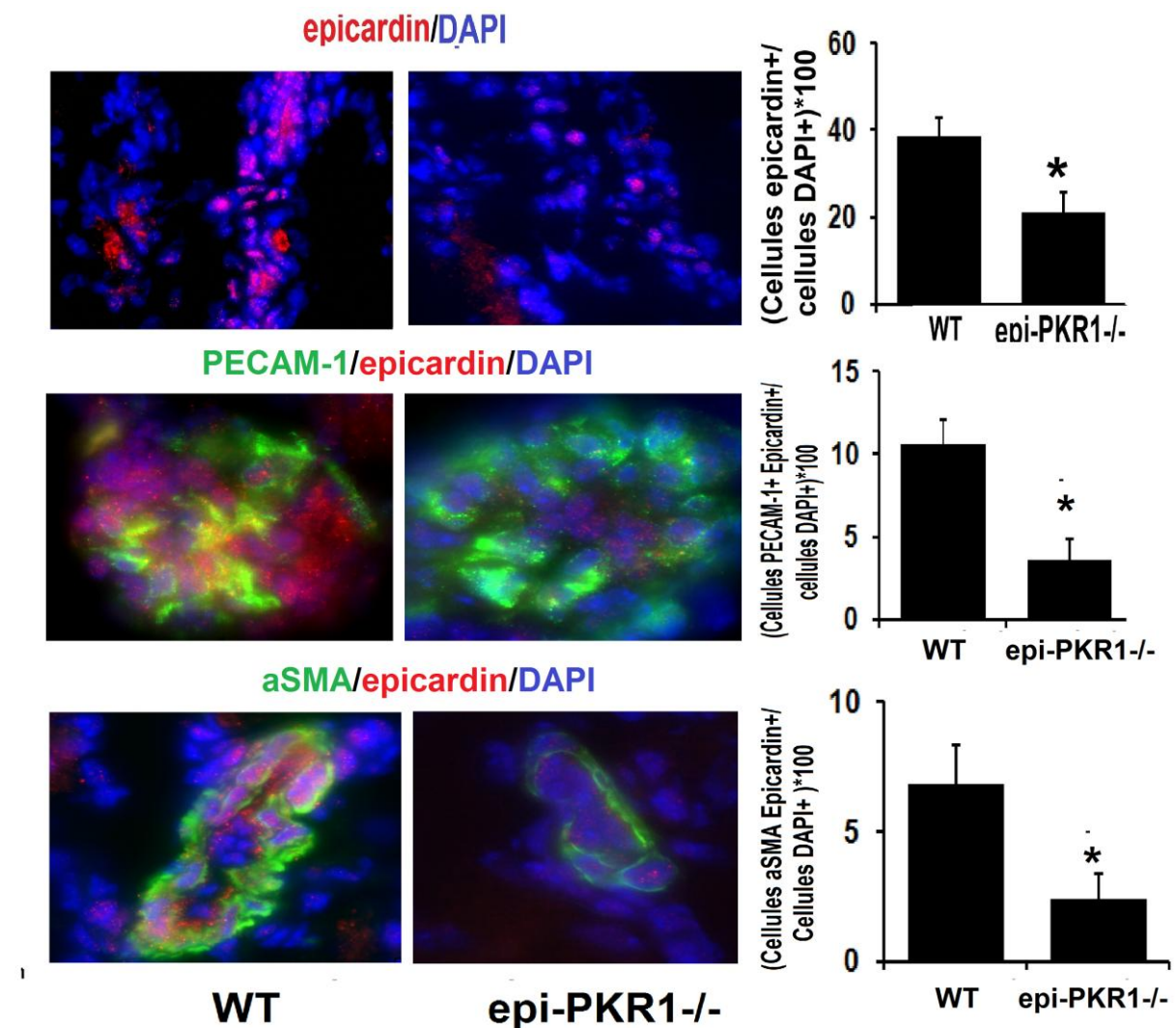


Figure 51. Niche de cellules epicardin⁺ dans les reins WT et epi-PKR1^{-/-} au stade néonatal

Immunofluorescence indirecte sur cryocoupes de reins ciblant le facteur de transcription epicardin seul (rouge) ou le co-localisant avec PECAM-1 (cellules endothéliales) ou α-SMA (artérioles) (vert). Les histogrammes représentent la quantification du pourcentage de cellules epicardin⁺ ou de précurseurs normalisé par rapport au nombre de noyau DAPI (n=3, p<0.05).

- **Altération de la communication cellulaire entre les cellules epicardin⁺ et les cellules endothéliales glomérulaires**

Nous avons voulu comprendre si la perte de PKR1 dans les cellules epicardin⁺ peut empêcher la communication cellulaire entre les cellules rénales matures et les cellules progénitrices epicardin⁺ responsables de la régression de l'angiogenèse glomérulaire.

Une étude *in vitro* concernant la communication cellulaire des cellules dites epicardin⁺ et des cellules endothéliales glomérulaires a également été menée. En effet, l'étude *in vivo* avait démontré que la prolifération des cellules endothéliales glomérulaires était considérablement réduite mais également que l'activité des cellules progénitrices epicardin⁺ rénales était altérée. Ainsi, nous avons isolé les cellules endothéliales glomérulaires à partir de glomérules extraits de reins WT et nous avons étudié la prolifération cellulaire en présence de milieu provenant des cellules epicardin⁺ WT ou epi-PKR1^{-/-} pendant 24 heures ou 48 heures (la première condition sera appelée CEG-WT et la deuxième CEG-epi-PKR1^{-/-}). Nous avons, par la suite, mesuré la prolifération cellulaire des cellules endothéliales glomérulaires par comptage manuel.

Ainsi, la prolifération des cellules CEG-WT est considérablement augmentée après 24 et 48 heures de culture en comparaison à la prolifération basale des CEG en présence de milieu 15% FCS. Ainsi, ces premiers résultats révèlent que les facteurs libérés par les cellules epicardin⁺ rénales sont capables de stimuler la prolifération cellulaire des CEG. Par ailleurs, la prolifération cellulaire des CEG-epi-PKR1^{-/-} était identique à la prolifération basale des CEG en présence de 15% FCS. Ces résultats démontrent que la voie de signalisation PKR1 des cellules epicardin⁺ rénales est nécessaire pour induire la stimulation de la prolifération des CEG (Cf. figure 52).

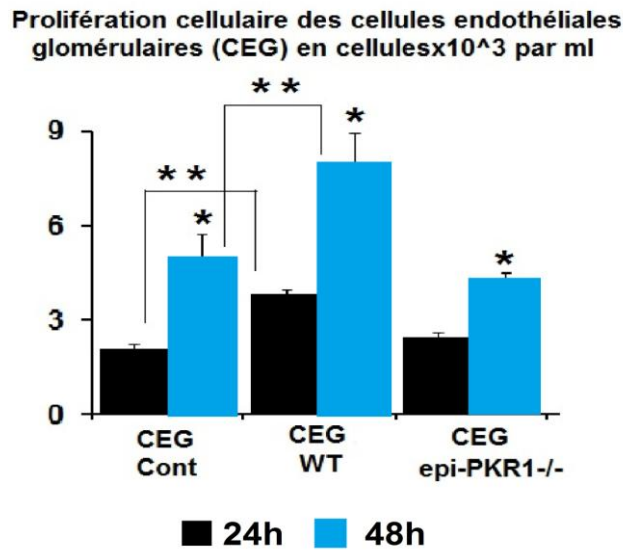


Figure 52. Contrôle paracrine de l'activité des cellules endothéliales glomérulaires par la voie de signalisation PKR1 dépendante des cellules epicardin⁺ rénales

Prolifération de cellules endothéliales glomérulaires (CEG) mises en présence de milieu de cellules epicardin⁺ dérivées de cœurs WT (CEG-WT) et epi-PKR1^{-/-} (CEG-epi-PKR1^{-/-}) ou contrôle (CEG-cont) après 24 heures et 48 heures. L'unité est cellule $\times 10^3$ /ml. (* significatif par rapport à 24h et **significatif par rapport à la condition contrôle) (n=4, p<0.05)

L'altération des fonctions autocrine et paracrine des cellules epicardin⁺ rénales mène à la régression de l'angiogenèse glomérulaire, à la réduction de l'artériogenèse rénale et à l'hypoplasie rénale.

E. Les souris epi-PKR1^{-/-} développent une altération de la fonction rénale à l'âge adulte

1. Altération de l'histologie rénale et atteinte glomérulaire à l'âge adulte

Nous avons voulu démontrer si les anomalies observées au stade néonatal altéraient la morphologie et la fonction rénale des souris epi-PKR1^{-/-} à un âge plus avancé.

Ainsi, des analyses histologiques ont démontré chez les souris epi-PKR1^{-/-} que les reins adultes semblaient hypertrophiés à l'inverse des reins néonataux qui étaient atrophiques. Cette observation a été confirmée par la mesure du ratio poids du cœur mouillé sur poids total qui s'avérait ainsi augmenté chez les souris epi-PKR1^{-/-} (Cf. figure 53A).

De plus, les examens histologiques, par coloration au trichrome de Mallory, ont mis en évidence la présence d'une fibrose interstitielle rénale chez les souris epi-PKR1^{-/-} à 24 semaines (Cf. figure 53B). En concordance avec ces résultats, l'analyse de l'expression transcriptionnelle des gènes du *Col1a1* et *Col1a2*, a révélé leur surexpression à 24 semaines dans les reins epi-PKR1^{-/-} (Cf. figure 53B).

Par ailleurs, des analyses de la morphologie des glomérules ont démontré la réduction de la taille des glomérules issus des souris epi-PKR1^{-/-} à 24 semaines (Cf. figure 53C). Cette observation a été corroborée avec une analyse plus détaillée dont l'objet était la quantification du nombre de cellules au sein des glomérules et qui a mise en évidence la réduction apparente du nombre de cellules glomérulaires issues des reins epi-PKR1^{-/-} à 24 semaines. Par ailleurs, les glomérules epi-PKR1^{-/-} étaient également atteints de micro thrombose (Cf. figure 53D).

La suite de notre étude a révélé que les reins epi-PKR1^{-/-} développaient une altération de l'angiogenèse glomérulaire caractérisée par une réduction du nombre de capillaires glomérulaires PECAM-1⁺ qui atteignait près de 35.4% dans les reins epi-PKR1^{-/-} à 24 semaines (Cf. figure 53E).

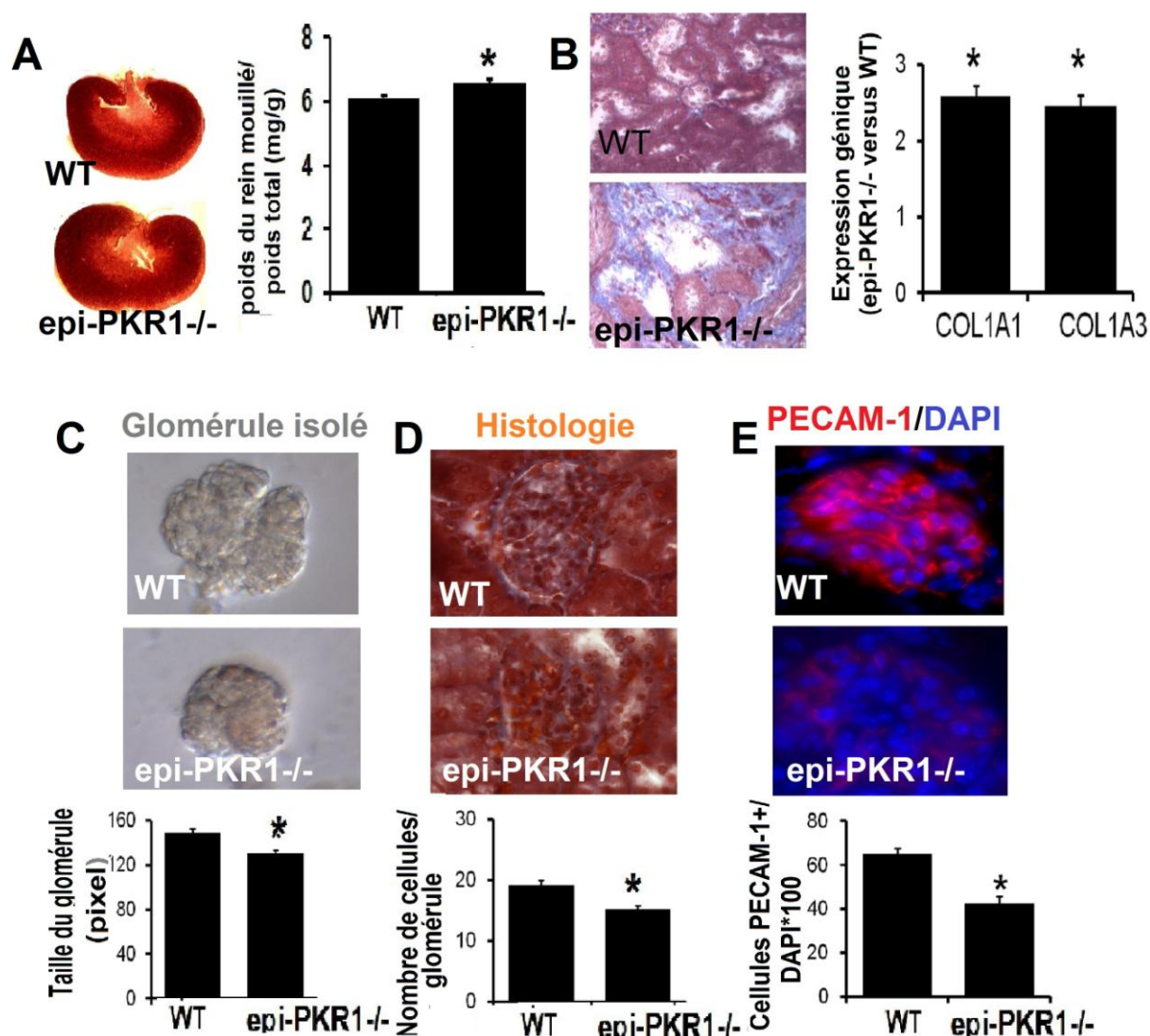


Figure 53. Histologie rénale, fibrose interstitielle et morphologie glomérulaire des reins WT et epi-PKR1^{-/-} à 24 semaines

A) Analyse histologique de coupes paraffines de reins à 24 semaines (n=3). L'histogramme représente le ratio poids du rein mouillé normalisé par rapport au poids total (n=15, $p < 0.05$). B) Analyse histologique de coupes paraffines de reins à 24 semaines représentant l'apparition de dépôts de fibrose (bleu) dans les reins de souris epi-PKR1^{-/-}. L'histogramme représente l'analyse par PCRq de l'expression transcriptionnelle des gènes du Col1a1 et 1a3 (n=4). C) Glomérules isolés de reins de souris de 24 semaines. L'histogramme représente la mesure de la taille des glomérules (n=3, $p < 0.05$). D) Coloration de coupes paraffines de reins de 24 semaines au trichrome de Mallory. A noter la présence de micro thrombose dans

les glomérules issus des reins *epi-PKR1^{-/-}*. L'histogramme représente la quantification du nombre de cellules par glomérule. E) Immunofluorescence ciblant PECAM-1 sur des cryocoupes de reins à 24 semaines. L'histogramme représente la quantification du nombre de cellules endothéliales glomérulaires PECAM-1⁺ sur le nombre de noyau DAPI (n=4, $p<0.05$).

2. Altération de la structure rénale et dysfonction mitochondriale

L'analyse par microscopie électronique, sur des échantillons de reins à 24 semaines, a démontré la présence de tubules rénaux qui apparaissaient dégénérés dans les reins de souris *epi-PKR1^{-/-}* (Cf. figure 54A).

Cette même analyse a révélé la présence d'anomalies structurales des mitochondries issues des reins *epi-PKR1^{-/-}* à l'âge de 24 semaines. Ainsi, le nombre, la densité et la taille des mitochondries semblaient augmentés dans les reins provenant des souris *epi-PKR1^{-/-}* à 24 semaines (Cf. figure 54B).

Nous avons testé, par la suite, la fonction mitochondriale à l'aide d'une analyse de l'activité de la SDH à l'âge de 24 semaines qui a décelé une réduction significative de l'activité mitochondriale des reins *epi-PKR1^{-/-}* (Cf. figure 54C).

Par ailleurs, un marquage à l'oil red de cryocoupes de reins à 24 semaines a mis en évidence une forte accumulation de lipides dans les reins *epi-PKR1^{-/-}* (Cf. figure 54D). Cette observation a été confirmée par l'isolation des lipides par la méthode Folch qui a démontré une proportion importante de lipides dans les reins des souris *epi-PKR1^{-/-}* à 24 semaines. (Cf. figure 54E). Ces observations ont été corrélées avec la mise en évidence de la surexpression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique dans les reins de souris *epi-PKR1^{-/-}* à 24 semaines (Cf. figure 54F).

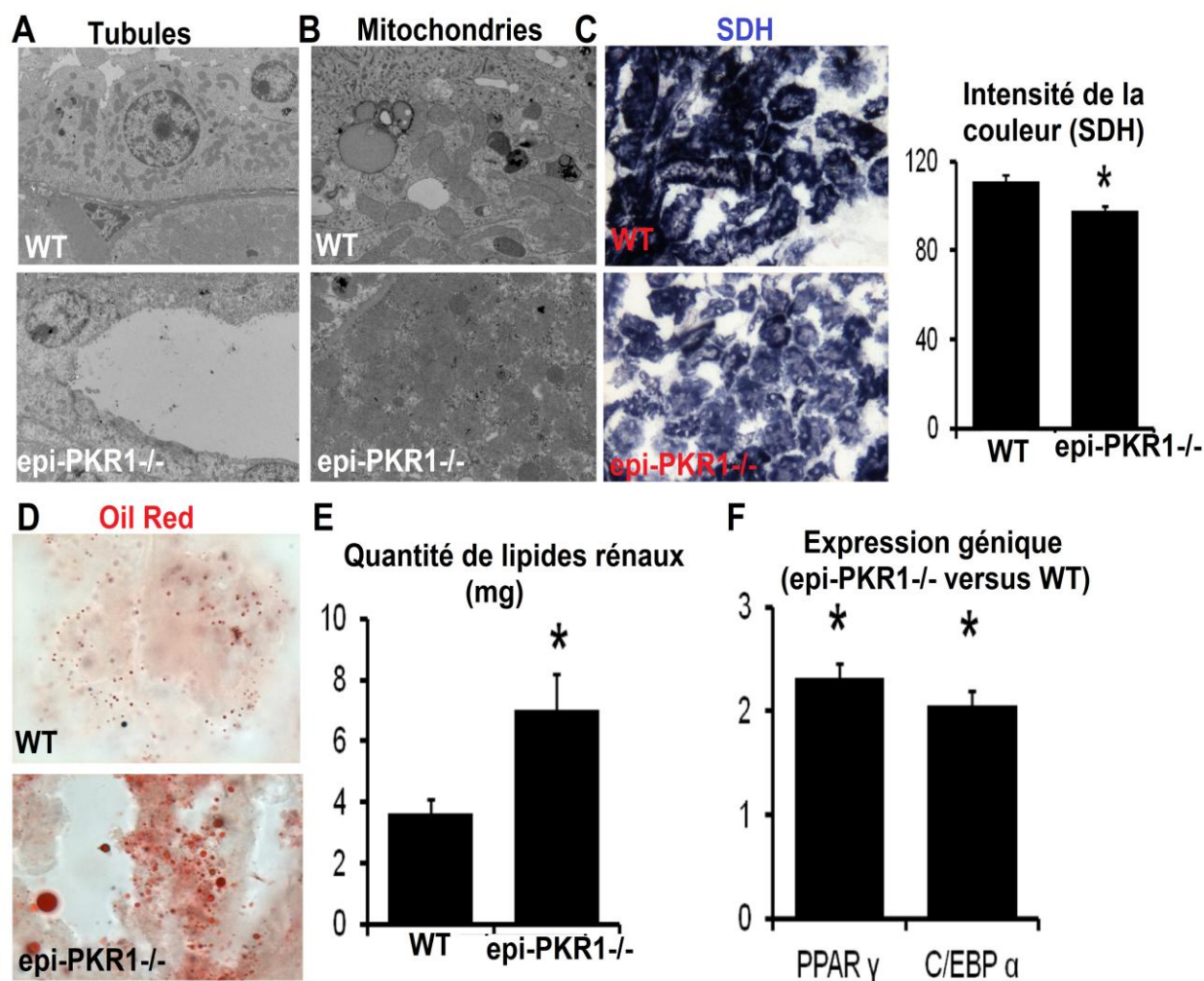


Figure 54. Fonction des tubules rénaux et lipogenèse des reins WT et epi-PKR1^{-/-} à 24 semaines

A,B) Analyse sur coupe en microscopie électronique de reins à 24 semaines illustrant les tubules qui paraissent dégénèrescent dans les reins de souris epi-PKR1^{-/-} (A) et les mitochondries (B). C) Mesure de l'activité de la SDH. Les images représentent les photos prises en microscopie après la coloration. L'histogramme représente la quantification de l'intensité de couleur par le logiciel imageJ (n=3, p<0.05). D) Marquage à l'oil red de cryocoupages de reins à 24 semaines (n=3). E) Quantification des lipides rénaux à 24 semaines extraits par la méthode Folch. (n=6, p<0.05). F) Analyse de l'expression transcriptionnelle par PCRq des gènes *Ppar γ* et *C/ebp α* impliqués dans la lipogenèse (n=4).

3. Amplification de l'apoptose des cellules rénales

Une analyse par TUNNEL a démontré une forte proportion de cellules en apoptose dans les reins epi-PKR1^{-/-} à 24 semaines (Cf. figure 55A). De plus, une immunofluorescence ciblant la caspase-3 et les marqueurs des cellules rénales a mis en avant qu'une forte proportion des cellules progénitrices rénales epicardin⁺, cellules tubulaires NAPI⁺, et cellules endothéliales interstitielles PECAM-1⁺ dérivait des reins epi-PKR1^{-/-} étaient en apoptose (Cf. figure 55B). Par ailleurs, une immunofluorescence indirecte ciblant la protéine epicardin sur des coupes de reins à 24 semaines a décelé une réduction du nombre de cellules progénitrices epicardin⁺ dans les reins de souris epi-PKR1^{-/-} (Cf. figure 55C).

Une analyse de l'angiogenèse à 24 semaines a démontré également une réduction du nombre de cellules endothéliales interstitielles PECAM-1⁺ dans les reins epi-PKR1^{-/-} (Cf. figure 55D).

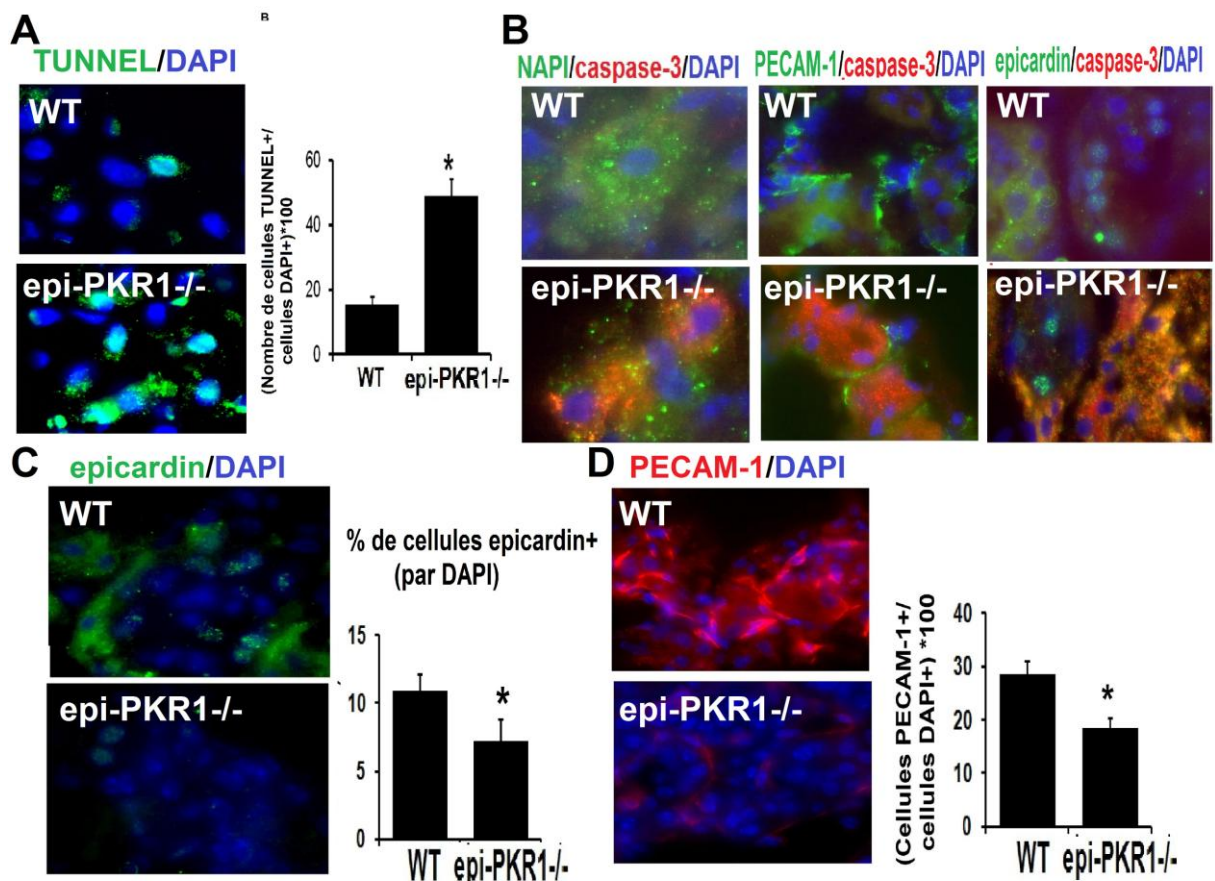


Figure 55. Apoptose, niche de progéniteurs epicardin⁺ et angiogenèse des reins WT et epi-PKR1^{-/-} à 24 semaines

A) Analyse de l'apoptose par la méthode TUNNEL sur des cryocoupes de reins à 24 semaines. L'histogramme représente le nombre de cellules TUNNEL⁺ normalisé par rapport au nombre de noyau DAPI (n=3, p<0.05). B) Co-localisation de NAPI, PECAM-1 et epicardin (vert) avec la caspase-3 (rouge) sur des cryocoupes de reins à 24 semaines. C) Immunofluorescence indirecte sur cryocoupes de reins à 24 semaines ciblant le facteur de transcription epicardin. L'histogramme représente la quantification du pourcentage de cellules epicardin⁺ normalisé par rapport au nombre de noyau DAPI (n=3, p<0.05). Immunofluorescence de cryocoupes de reins à 24 semaines localisant les cellules endothéliales interstitielles PECAM-1⁺. L'histogramme représente la quantification du nombre de cellules PECAM-1⁺ normalisé par rapport au noyau DAPI

4. Altération de la fonction rénale

Pour analyser la fonction rénale, les souris ont été placées en cage à métabolisme à l'âge de 24 semaines. Après une période d'acclimatation de 48 heures, les prises d'eau et de nourriture ont été mesurées ainsi que la diurèse des 24 heures. Nous n'avons constaté aucune différence dans les deux premiers paramètres. Cependant la diurèse des 24 heures était réduite chez les souris epi-PKR1^{-/-} révélant ainsi des anomalies fonctionnelles comme celles observées pour les souris PKR1^{-/-} (Cf. figure 56).

Corroborant ces résultats, des analyses urinaires ont démontré une réduction du taux d'urée urinaire et de la clairance de la créatinine par les souris epi-PKR1^{-/-} confirmant ainsi la présence d'une dysfonction rénale et la réduction du taux de filtration glomérulaire (Cf. Tableau 13).

Ainsi, ces résultats ont confirmé l'altération de l'angiogenèse glomérulaire, l'un des principaux composants impliqués dans la filtration glomérulaire et donc la fonction rénale.

Nous avons également observé la réduction de l'excrétion des ions Na⁺, Cl⁻, K⁺ (Cf. tableau 13). Ces résultats sont en corrélation avec les défauts de la structure des tubules rénaux observés dès la naissance.

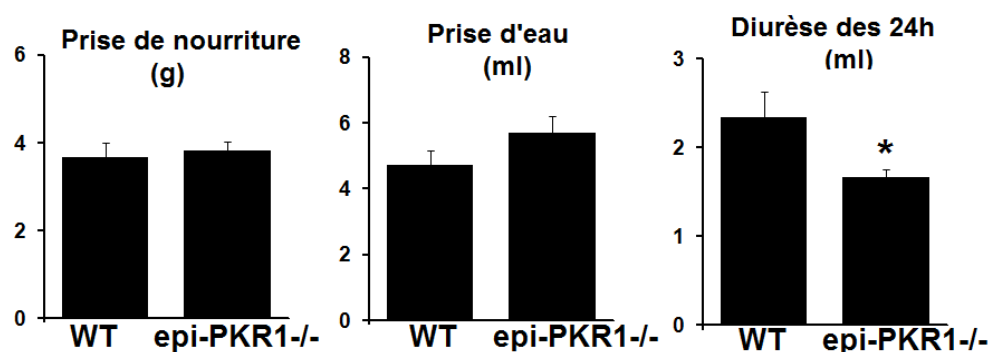


Figure 56. Paramètres mesurés lors de la mise en cage à métabolisme des souris WT et epi-PKR1^{-/-} incluant la prise de nourriture en g, la prise d'eau en ml et la diurèse des 24 heures en ml (n=7)

Tableau 13. Analyse urinaire (n=7)

	WT	epi-PKR1 ^{-/-}
Prise d'eau (ml)	4.71±0.44	5.71±0.11
Diurèse (ml)	2.34 ±0.29	1.66±0.09*
Urée	484.83±45.24	307.5±41.91*
Na (mmol/l)	479.43±57.11	309.37±58.59*
Na créatinine (mol/mol)	310.98±22.28	229.36±24.23
Na balance (mmol/g)	15.46±1.88	10.30±1.97*
K (mmol/l)	776.28±109.89	512.31±114.24*
K créatinine (mol/mol)	514.25±50.4	388.58±42.14*
K balance (mmol/g)	24.99±2.22	17.07±3.86
Na/K	0.65±0.06	0.64±0.04
Cl (mmol/l)	498.63±63.56	326.28±62.85*
Cl créatinine (mol/mol)	331.32±26.7	257.37±30.87*
Cl balance mmol/g	16.08±2.07	10.87±2.36
T protéine	3.38±0.41	2.35±0.54
Albumine	26912.26±3912.14	26612.15±3805.52
Créatinine (mmol/l)	1.54±0.19	1.34±0.25
Créatinine (mmol/l/24h/g)	1196.17±159.59	1085.003±197.96*
Ca (mmol/l)	0.4±0.06	0.27±0.06
Ca créatinine (mol/mol)	0.26±0.02	0.21±0.03
Ca balance (mol/g)	0.012±0.001	0.009±0.002
Phosphate (mmol/l)	26.75±2.47	25.7±3.21
Phosphate créatine (mol/mol)	19.02±2.38	21.4±2.35

Ainsi, nos résultats démontrent que l'altération des fonctions autocrine et paracrine des cellules epicardin⁺ dépendantes de la voie de signalisation PKR1 engendre le développement d'une pathologie rénale. Cette dernière est caractérisée par une glomérulopathie, la raréfaction du réseau microvasculaire, le développement d'une fibrose interstitielle et la mort des cellules tubulaires rénales. Ces défauts sont traduits par une dégradation de la fonction rénale à 24 semaines.

F. Conclusion de partie

Ce deuxième volet de mon projet de Doctorat a pu mettre en avant le rôle spécifique de la voie de signalisation PKR1 propre aux cellules epicardin⁺ dans la fonction cardiaque et rénale.

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence deux types d'effets : un effet direct puisque l'activité des cellules epicardin est défaillante ; un effet indirect puisque l'activité des cellules matures cardiaques et rénales qui est altérée.

Nous avons pu démontrer que l'inactivation de PKR1 au niveau des cellules progénitrices epicardin⁺ conduisait à des défauts de prolifération et de différenciation de ces dites cellules epicardin⁺. Ces défauts ont entraîné une perte de l'angiogenèse et de l'artériogenèse cardiaque et rénale menant au développement d'un environnement hypoxique propice à l'apoptose cellulaire.

A coté de cela, nous avons également décelé que l'absence de PKR1 au niveau des cellules epicardin⁺ avait un effet délétère sur la fonction des cellules cardiaques et rénales matures.

Ces deux voies ont mené au développement de cardiomyopathies hypertrophiques et de pathologies rénales.

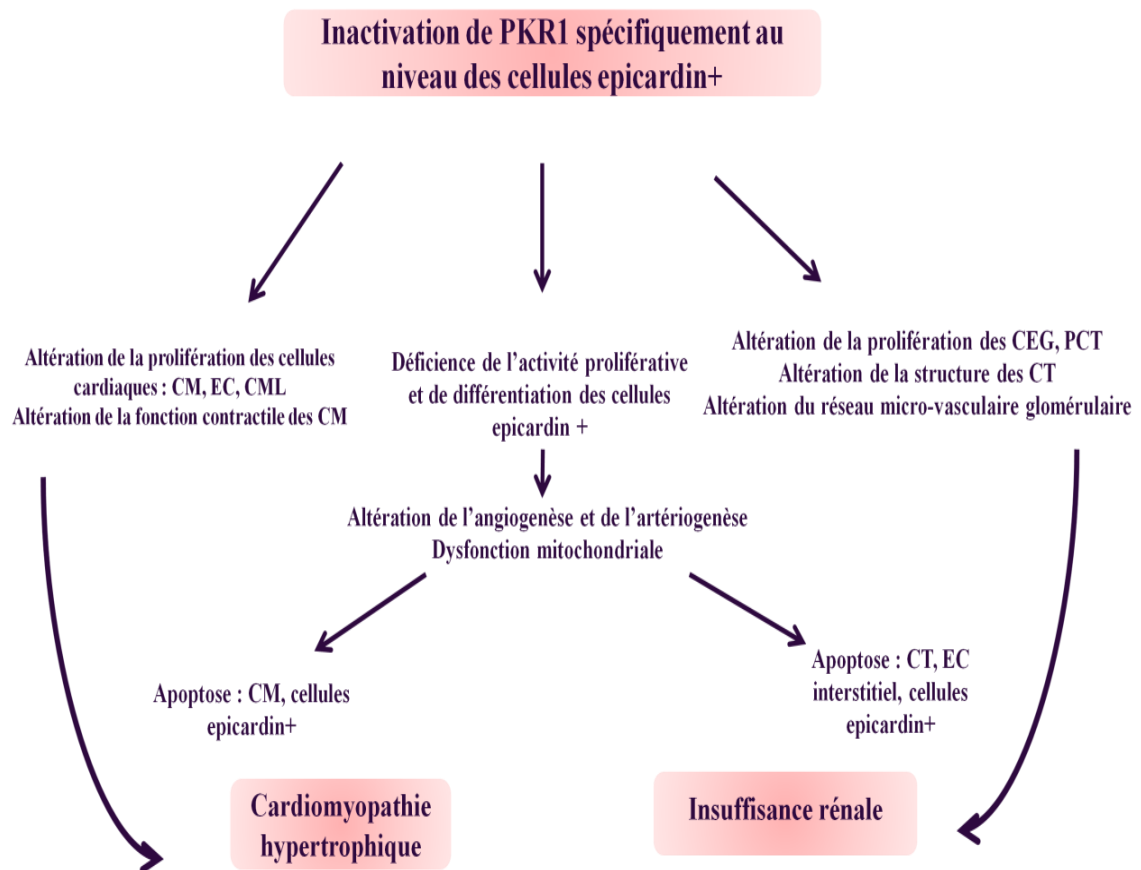


Figure 57. Schématisation de l'effet délétère de l'inactivation de *Pkr1* spécifique au niveau de l'épicaarde sur la fonction cardiaque et rénale.

CM : cardiomyocytes, *EC* : cellules endothéliales, *CML* : CML, *CEG* : cellules endothéliales glomérulaires, *PCT* : podocytes, *CT* : cellules tubulaires.

PARTIE 5 : DISCUSSION

Notre étude a permis de ressortir trois points importants :

- 1) le rôle essentiel de la voie de signalisation PKR1 dans la fonction cardiaque et rénale : son inactivation induit le développement de pathologies cardiaques et rénales. Il a été prouvé maintes fois le rôle des facteurs angiogéniques dans leur homéostasie :
 - Le récepteur PDGFR β est impliqué dans l'embryogenèse cardiaque et rénale (Soriano, 1994) (Van den Akker et al., 2008) ;
 - Le facteur de croissance VEGF contrôle l'embryogenèse cardiaque (Bellomo et al., 2000), la glomérulogenèse et la tubulogenèse rénale (Villegas, Lange-Sperandio, and Tufro, 2005) ;
 - Le facteur de croissance FGF joue un rôle dans le développement et la fonction cardiaque (Marguerie et al., 2006).
- 2) Pour la première fois nous avons mis en évidence une méthode d'extraction pour isoler de façon efficace les cellules progénitrices epicardin⁺ ou EPDC à partir de tissu cardiaque et rénal. Nous avons démontré que la voie de signalisation PK2/PKR1 contrôle le devenir de ces cellules progénitrices en cellules vasculaires et cardiomyocytes. Nous avons également mis en évidence pour la première fois la présence des cellules d'origine épicardique dans le rein.
- 3) Enfin, nous avons mis en avant le rôle de la voie de signalisation épicarde-PKR1 dans l'activité des cellules progénitrices epicardin⁺ cardiaques et rénales : la perte épicarde-spécifique de la voie de signalisation PKR1 conduit au développement de dysfonctions cardiaques et rénales. Nos résultats rejoignent d'autres études qui avaient démontré le rôle de facteurs spécifiques à l'épicarde à la fois dans la fonction cardiaque et rénale :
 - La perte du gène *Wt1* cause chez l'homme et la souris une agénésie rénale et une malformation cardiaque (Kreidberg et al., 1993);
 - L'invalidation du gène *Epicardin* cause des malformations cardiaques et rénales (Cui, Schwartz, and Quaggin, 2003).

I. Phénotype cardiaque : PKR1^{-/-} versus epi-PKR1^{-/-}

Nos travaux de recherche ont permis de caractériser le développement de cardiomyopathies à la fois chez les souris PKR1^{-/-} portant la délétion systémique de PKR1 et epi-PKR1^{-/-} portant l'inactivation de PKR1 au niveau de l'épicaarde. Ils démontrent ainsi l'importance de la voie de signalisation autocrine et paracrine de PKR1 sur la survie des cardiomyocytes, le rôle de PKR1 dans la prolifération des cardiomyocytes et dans la vascularisation cardiaque (Cf. figure 58).

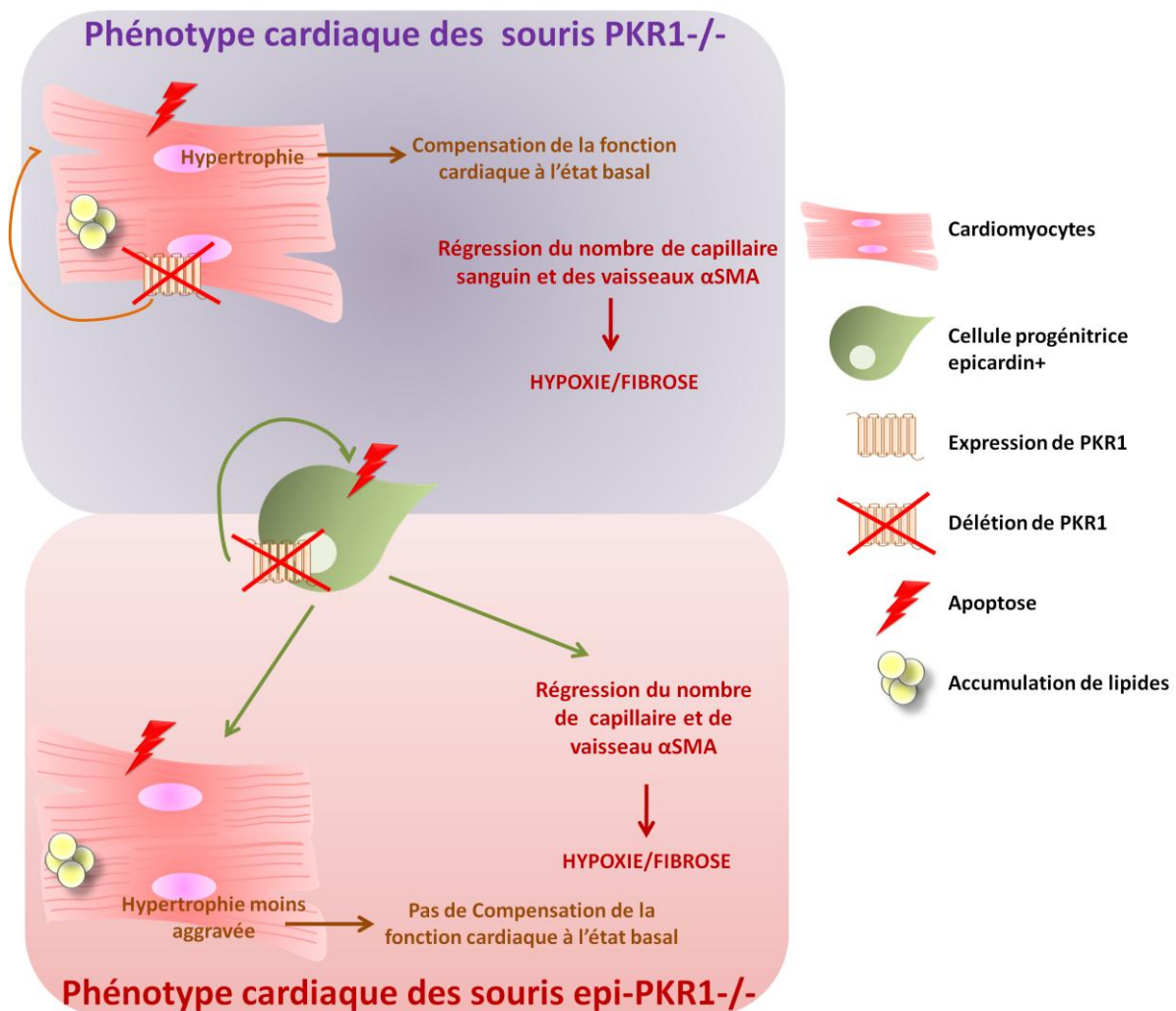


Figure 58. Rôle de PKR1 et de la voie de signalisation épicaarde-PKR1 dans la fonction cardiaque

A. PKR1 est essentiel pour le contrôle autocrine et paracrine de la survie des cardiomyocytes

Nos recherches démontrent le rôle autocrine du récepteur PKR1 et de la voie de signalisation épicarde-PKR1 dans la protection des cardiomyocytes contre l'hypoxie. Nos résultats corroborent les précédentes études menées au sein de notre laboratoire qui ont mis en évidence que : 1) l'injection du gène *Pkr1*, lors de l'infarctus chez la souris, conduit à la baisse de la mortalité principalement grâce au rôle cardio-protecteur de la voie de signalisation PKR1 (Urayama et al., 2007) ; 2) *in vitro*, la voie de signalisation PKR1, via l'activation d'Akt, protège les cardiomyocytes et les cellules endothéliales contre le stress hypoxique (Urayama et al., 2007; Urayama et al., 2008).

Notre étude a ainsi montré que la délétion du gène *Pkr1* conduit à l'apoptose des cardiomyocytes provoquant l'apparition de cardiomyopathie dilatée. L'effet autocrine de la perte du gène *Pkr1* se traduit par l'apparition d'une hypertrophie des cardiomyocytes viables des cœurs PKR1^{-/-} (augmentation du volume) qui compense les défauts fonctionnels cardiaques à l'état basal des souris PKR1^{-/-}. L'hypertrophie est généralement décrite comme un mécanisme responsable de la compensation de la fonction cardiaque : les cardiomyocytes augmentent en taille et subissent une induction de la synthèse protéique (Selvetella et al., 2004). Néanmoins, en situation de stress, lors de l'administration de dobutamine, la dégradation rapide de la fonction cardiaque des souris PKR1^{-/-} est observée. Elle se caractérise par une réduction des fractions d'éjection et de raccourcissement. Les dysfonctions cardiaques développées après administration de la dobutamine peuvent être mises en relation avec la réduction de l'expression de la troponine cardiaque dans les cœurs PKR1^{-/-}. En effet, une étude a démontré que la mutation de la troponine provoque de faibles réponses contractiles dues à une réduction de la liaison actine-myosine lors de cardiomyopathies dilatées chez l'homme (Dweck et al., 2010). De plus, les anomalies de la fonction cardiaque sont principalement associées chez l'homme à une élévation du taux de troponine sanguine, marqueur pertinent du développement de la défaillance cardiaque. Cette libération de troponine est principalement due à une ischémie induisant la mort des cellules cardiaques. (Gerhardt, Nordin, and Ljungdahl, 1999; Katus et al., 1991; Wu et al., 1999a).

Notre étude n'est pas la seule à démontrer le rôle des facteurs angiogéniques dans la fonction cardiaque. En effet, la délétion des facteurs pro-angiogéniques cause également le développement de cardiomyopathies :

- Les souris portant une mutation nulle des isoformes 164 et 188 du VEGF développent une cardiomyopathie progressive (Carmeliet et al., 1999);
- La suppression spécifique du VEGF au niveau des cardiomyocytes conduit à une altération de l'angiogenèse, de la contractilité et à l'apparition de cardiomyopathies dilatées (Giordano et al., 2001);
- La délétion spécifique du facteur HIF1- α au niveau des cardiomyocytes cause une altération de la contractilité due à une réduction de la vascularisation (Huang et al., 2004).

Somme toutes, ces données révèlent que la voie de signalisation PKR1 est essentielle à la survie des cardiomyocytes.

B. Rôle de PKR1 dans la prolifération et la rythmicité cardiaque

L'un des processus les plus importants impliqué dans la prolifération des cardiomyocytes et le développement des parois ventriculaires est la communication entre les cellules progénitrices de l'épicaarde et les cardiomyocytes. En effet, l'ablation de l'épicaarde au niveau de la surface ventriculaire, chez l'embryon de poule, conduit à la formation d'une paroi ventriculaire considérablement aminci (Gittenberger-de Groot et al., 2000; Pennisi, Ballard, and Mikawa, 2003; Perez-Pomares et al., 2002b). En culture, les ventricules cardiaques d'embryon de poule dont l'épicaarde a été sectionné présentent également une forte réduction de la prolifération des cardiomyocytes (Stuckmann, Evans, and Lassar, 2003). La perte de PKR1 au niveau de l'épicaarde supporte que la voie de signalisation PKR1 est nécessaire pour le développement de l'épicaarde et du sous-épicaarde puisque les souris epi-PKR1^{-/-} ne présentent pas de sous-épicaarde. Ce phénomène est donc à l'origine chez les souris epi-PKR1^{-/-} d'une altération de la prolifération des cardiomyocytes révélant que la voie de signalisation épicaarde-PKR1 est essentielle pour le développement des parois ventriculaires. De plus, une étude *in vivo*, menée au sein de notre laboratoire, corrobore nos résultats puisque le milieu conditionné issu des cellules progénitrices epicardin⁺ cardiaques stimule la prolifération des cardiomyocytes dérivés de cœurs néonataux alors que le milieu conditionné provenant des cellules epi-PKR1^{-/-}

n'a aucun effet sur ce processus (observation faite par V. Tosch). Ces données suggèrent que la prolifération des cardiomyocytes est contrôlée de façon paracrine par la voie signalisation épicarde-PKR1

Nos données soutiennent d'autres études qui démontrent également l'implication de facteurs spécifique à l'épicarde dans la croissance du myocarde. En effet, la délétion épicarde-spécifique des gènes de la *Thymosine-β4* et de *Dicer* conduit à une réduction des parois ventriculaires associée à une altération de la prolifération des cardiomyocytes (Singh et al., 2011; Smart et al., 2007). Les voies de signalisation provenant de l'épicarde et associées à l'acide rétinoïque, au FGF ou au PDGF stimulent également la prolifération des cardiomyocytes (Chen et al., 2002; Merki et al., 2005; Pennisi, Ballard, and Mikawa, 2003).

La différenciation des cellules epicardin⁺ cardiaques en cardiomyocytes est également un mécanisme pouvant expliquer la perte de prolifération des cardiomyocytes. En effet, nous démontrons in vitro que les cellules epicardin⁺ dérivées de cœurs WT ont la capacité de se différencier en cardiomyocytes fonctionnels. In vivo, les cœurs epi-PKR1^{-/-} présentent une réduction du nombre de précurseurs exprimant à la fois le marqueur epicardin et celui des cardiomyocytes matures (troponine C).

Ainsi, notre étude démontre pour la première fois que les cellules epicardin⁺ après 30 jours de traitement sont capables de donner lieu à la formation de cardiomyocytes contractiles sous l'action de l'association d'un traitement approprié et de la PK2 (ou du FGF-2). Les cardiomyocytes générés dans ces conditions possèdent toutes les caractéristiques des cellules cardiaques matures : ils expriment le marqueur de l' α -actinine cardiaque ; ils ont des contractions à l'état basal ; ils répondent à un traitement à la dobutamine. Au sein de notre laboratoire, des tests avaient déjà été effectués pour mettre en évidence les capacités de différenciation des cellules epicardin⁺ en cardiomyocytes. Ces expériences n'avaient pas été concluantes et deux différences entre notre étude actuelle et l'ancienne étude sont à relever. Premièrement, la précédente étude utilisait un milieu sans sérum et sans complémentation avec ou sans traitement à la PK2 alors que dans notre cas nous avons procédé à une différenciation dans un milieu 15% FCS complétement avec des agents chimiques dont le DMX, le glycerophosphat et l'acide ascorbique. Le DMX est un agent connu pour jouer un rôle dans la régulation des protéines cardiaques : il permet l'induction de la protéine contractile α -actine, de la β -MHC, de l' α -MHC, des protéines structurales dont la desmine et la tubuline et des protéines impliquées dans le cycle du calcium (Bal, 2006; De et al., 2011).

L'acide ascorbique a été également décrit comme un facteur inducteur de la différenciation des CSE et iPS en cardiomyocytes (Cao et al., 2012; Sato et al., 2006; Takahashi et al., 2003). Deuxièmement, la durée de différenciation est également importante : notre protocole de différenciation a duré 30 jours alors que le protocole de la précédente étude durait 9 jours. Pourquoi la durée de différenciation semble importante ? Lors de l'infarctus du myocarde chez la souris, il a été montré que le prétraitement de cœurs à la thymosine- β 4, avant l'induction expérimentale de l'infarctus du myocarde, induit seulement après 28 jours des effets bénéfiques sur la fonction cardiaque. Ces effets bénéfiques sont liés à la réactivation de WT1 avant l'infarctus du myocarde et à la différenciation des cellules progénitrices de l'épicaarde en cardiomyocytes (Smart et al., 2011). Cette étude révèle que la différenciation en cardiomyocytes des cellules progénitrices de l'épicaarde est longue et notre étude confirme ces résultats puisque les contractilités des cardiomyocytes générés ne sont observées qu'après 30 jours de culture dans des conditions appropriés. Deux autres études ont déjà démontré l'implication des cellules progénitrices de l'épicaarde lors de l'embryogenèse dans la formation des cardiomyocytes *in vivo* (Cai et al., 2008; Zhou et al., 2008a). L'équipe de Rosenblatt-Velin a également révélé que le FGF-2 est essentiel à la différenciation des cellules progénitrices cardiaques endogènes Sca-1⁺ en cardiomyocytes (Rosenblatt-Velin et al., 2005). Nous sommes la première équipe à démontrer que les cellules progénitrices de l'épicaarde peuvent se différencier en cardiomyocytes fonctionnels sous l'action de la PK2.

Nous avons également démontré que les cœurs epi-PKR1^{-/-} présentent une tachycardie. Ces altérations sont dues à un défaut de communication entre l'épicaarde et les cardiomyocytes. En effet, les cardiomyocytes isolées des cœurs WT présentent une perte de la contractilité lorsqu'ils sont mis en culture avec du milieu provenant des cellules epicardin⁺ cardiaques epi-PKR1^{-/-}. De plus, les cardiomyocytes isolés de cœurs epi-PKR1^{-/-} ne répondent pas à un traitement à la dobutamine. Cependant l'expression des récepteurs β AR n'est pas altérée alors que l'expression des gènes impliqués dans la contraction cardiaque dont le *Plb*, le *Serca*, le *Ryr* et l'échangeur *Ncx* est considérablement réduite. Ainsi, ces résultats mettent en avant le rôle de la voie de signalisation épicaarde-KR1 dans la fonction contractile des cardiomyocytes. D'autres études ont déjà abordé ce sujet : l'équipe de Weeke-Klimp en 2010 révèle que les cellules progénitrices de l'épicaarde sont responsables de l'alignement et du couplage électrique de cardiomyocytes néonataux (Weeke-Klimp et al., 2010). Il faut savoir que l'alignement des cardiomyocytes est un processus important dans le couplage électrique des

myocytes cardiaques et est régit en partie par les cellules progénitrices de l'épicaire via la production des composants de la MEC (Kolditz et al., 2008; Lie-Venema et al., 2008). Dès lors, l'équipe de Weeke-Klimp met en avant que la co-culture cardiomyocytes/cellules progénitrices de l'épicaire permet l'alignement des cardiomyocytes de façon parallèle et la formation d'un syncytium fonctionnel qui présente des contractions synchrones. Ces phénomènes sont accompagnés d'une modification de l'expression des protéines impliquées dans le couplage électrique dont la connexine-43, la N-cadhérine, la Troponine C, et le Serca2a (Weeke-Klimp et al., 2010). De la même manière, l'équipe d'Eid démontre que la co-culture de myocytes cardiaques de rat avec des cellules progénitrices dérivées de l'épicaire entraîne une augmentation des contractions des myocytes cardiaques caractérisées par des contractions multicellulaires synchrones. Ces contractions s'accompagnent également d'une augmentation des jonctions cellulaires et de l'expression de l' α -MHC (Eid et al., 1992). Ainsi, notre étude vient corroborer des hypothèses déjà vérifiées sur le contrôle de la contractilité des cardiomyocytes par l'épicaire. Néanmoins, elle apporte une nouvelle information et établit le lien entre l'épicaire et la voie de signalisation PKR1 dans la régulation de la fonction des cardiomyocytes.

Sommes toutes, ces données révèlent que la voie de signalisation PKR1 est impliquée dans la communication réciproque entre l'épicaire et le myocarde qui contrôle la survie, la prolifération et la fonction des cardiomyocytes. L'ischémie observée dans les cœurs $\text{epi-PKR1}^{-/-}$ conduit également à l'apoptose des cardiomyocytes par le développement de tachycardie et des dysfonctions cardiaques.

C. Les mécanismes moléculaires responsables de la survie des cardiomyocytes dépendants de la voie de signalisation PKR1

La voie de signalisation PKR1 dans les cardiomyocytes peut directement activer la voie Akt les protégeant ainsi de l'apoptose mitochondriale. Notre étude démontre l'implication d'Akt et des mitochondries dans les mécanismes de survie dépendants de la voie de signalisation PKR1 autocrine et paracrine, en effet :

- Les cardiomyocytes des cœurs PKR1^{-/-} et epi-PKR1^{-/-} expriment la caspase-3 active : une protéase pro-apoptotique impliquée dans les phénomènes d'apoptose lors de l'infarctus du myocarde (Saraste and Pulkki, 2000).
- Les cœurs PKR1^{-/-} présentent une altération de la phosphorylation d'Akt responsable de la potentialisation de l'apoptose. En effet, diverses études ont révélé le rôle protecteur de la voie de signalisation Akt lors de cardiomyopathies (Bell and Yellon, 2003; Means et al., 2007; Miyamoto, Murphy, and Brown, 2008).
- Les cœurs PKR1^{-/-} et epi-PKR1^{-/-} développent des anomalies structurales et fonctionnelles des mitochondries : elles sont décrites par une réduction de l'activité de la succinate déshydrogénase, complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'emploi de modèles génétiques a fréquemment démontré l'association des dysfonctions mitochondriales avec le développement des cardiomyopathies. Les cardiomyopathies induites par l'inactivation du gène de la desmine, chez la souris, provoquent l'apparition d'anomalies fonctionnelles mitochondriales engendrant la libération du cytochrome C et la mort cellulaire des cardiomyocytes (Linden et al., 2001). De la même manière, la surexpression du gène c-Myc, chez la souris, cause le développement de cardiomyopathies hypertrophiques accompagnées de dysfonctions ventriculaires menant à la mort. Ces anomalies sont également associées à des altérations de la fonction mitochondriale caractérisées par un défaut des complexes I et III de la chaîne de transport d'électron (Lee et al., 2009). Chez l'homme, les cardiomyopathies dilatées ou ischémiques sont également reliées à la dégradation des capacités respiratoires des mitochondries (Lemieux et al., 2011). Par ailleurs, les acides gras libres sont la principale source d'énergie utilisée par le cœur (entre 50 et 70% chez l'adulte) et permettent la génération d'ATP par la mitochondrie (Lopaschuk et al., 2010; Saddik and Lopaschuk, 1991). De ce fait, l'altération de la fonction mitochondriale dans les cœurs PKR1^{-/-} et epi-PKR1^{-/-} conduit à l'inutilisation des acides gras par les mitochondries et à la génération de dépôts lipidiques dans les cellules cardiaques. Ainsi, nos analyses corroborent cette observation puisqu'à l'âge de 24 semaines, en plus des dysfonctions mitochondriales observées, les cœurs PKR1^{-/-} et epi-PKR1^{-/-} développent l'apparition d'accumulation de lipides. L'accumulation de lipides dans le cœur est la cause des dysfonctions cardiaques puisqu'elle est corrélée avec l'altération de la fonction ventriculaire, l'induction de la mort cellulaire et l'apparition de cardiomyopathies dilatées (Duncan et al., 2010; Kelly et al., 1992; Listenberger and Schaffer, 2002; Son et al., 2007; Young et al., 2002).

Nos recherches démontrent, pour la première fois, le rôle autocrine et paracrine de la voie de signalisation PKR1 dans la protection des cardiomyocytes : la perte de PKR1 dans les cardiomyocytes et l'épicaire conduit à une amplification de l'apoptose des cardiomyocytes par : le développement de défaut mitochondriaux et l'accumulation de lipide; l'activation de la caspase-3 ; l'altération des voies de survie.

D. PKR1 est essentiel à la vascularisation cardiaque

Nos données *in vitro* révèlent que la voie de signalisation épicaire-PKR1 joue un rôle clé dans le contrôle de la différenciation des cellules progénitrices de l'épicaire. En effet, les cœurs epi-PKR1^{-/-} présentent une altération du réseau de capillaires et de la formation des vaisseaux due à un défaut de différenciation des cellules progénitrices de l'épicaire. Diverses études ont démontré le rôle de facteurs spécifiques dans la vasculogénèse cardiaque dépendante de l'épicaire durant l'embryogénèse: les délétions épicaire-spécifiques des gènes de la *β -caténine*, de la *Thymosine- β 4*, du récepteur *Tgf- β* , de la voie de signalisation Notch1 conduisent au développement d'un réseau vasculaire coronarien anormal (del Monte et al., 2011; Smart et al., 2007; Sridurongrit et al., 2008; Zamora, Manner, and Ruiz-Lozano, 2007). L'étude de Singh est la seule à révéler le rôle des miRNA dans l'angiogénèse tardive lors de l'embryogénèse. En effet, elle révèle que l'inactivation de l'endonucléase Dicer cause un défaut des vaisseaux coronaires seulement à partir du jpc 18.5 (Singh et al., 2011).

Nos données *in vitro et in vivo* mettent également en évidence l'implication de la voie de signalisation épicaire-PKR1 dans la prolifération des cellules endothéliales qui correspond à la première étape de l'angiogénèse. La régression capillaire persiste dans les cœurs epi-PKR1^{-/-} adultes démontrant que la voie de signalisation épicaire-PKR1 est essentielle à la formation des capillaires au stade néonatal. Notre étude révèle donc le rôle essentiel de l'axe épicaire/PKR1 dans l'angiogénèse cardiaque. Plusieurs études révèlent que la mise en contact des cellules dérivées du proépicaire avec le myocarde cause la production de facteurs de croissance impliqués dans les phénomènes de morphogénèse de la vascularisation coronarienne (Guadix et al., 2006; Pennisi, Ballard, and Mikawa, 2003). Il a été récemment démontré que les cellules progénitrices de l'épicaire sont responsables de la libération de

facteurs angiogéniques tels que le VEGF-A et le FGF-2 lors de l'infarctus du myocarde chez la souris qui agissent pour stimuler l'angiogenèse (Zhou et al., 2011).

En somme, ces données suggèrent que la voie de signalisation épicarde-PKR1 régule les processus de différenciation des cellules progénitrices de l'épicaire en cellules vasculaires mais également la prolifération des cellules endothéliales pour le contrôle de la formation des capillaires épicaïques après la naissance.

Le récepteur PKR1 a déjà été décrit comme un facteur impliqué dans la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales cardiaques (Guilini et al., 2010). Dans notre modèle de souris PKR1^{-/-} on ne peut pas ignorer la contribution des effets de la délétion du récepteur PKR1 au niveau des cellules endothéliales sur la formation des capillaires. En effet, Les cœurs PKR1^{-/-} présentent une régression du réseau capillaire au stade néonatal qui est compensée dans le myocarde à l'âge adulte. Cette compensation de la formation des capillaires résulte probablement d'effets paracrines de facteurs de croissance libérés par les cardiomyocytes hypertrophiques PKR1^{-/-} et par l'hypoxie générée par la régression vasculaire. En effet, le facteur de transcription GATA4, décrit comme un stimulateur de l'hypertrophie, est capable de déclencher la réponse angiogénique de façon paracrine via la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF-A (Heineke et al., 2007; Liang et al., 2001; Oka, Xu, and Molkentin, 2007). De la même manière, l'induction expérimentale de l'hypoxie provoque la surélévation de l'expression cardiaque du VEGF (Dong et al., 2009; Hashimoto et al., 1994; Marti and Risau, 1998; Wang et al., 2010) et l'infarctus du myocarde chez l'homme est corrélé avec l'augmentation de l'expression des facteurs de croissance circulants tels que le VEGF, TGFβR, ou HGF (Devaux et al., 2011; Jimenez-Navarro et al., 2011; Ogawa et al., 2000). De façon intéressante, ces signaux ne sont pas suffisants pour compenser l'altération de la formation des capillaires sanguins dans l'épicaire des cœurs PKR1^{-/-} confirmant que la voie de signalisation épicaire-PKR1 est essentielle pour la formation des capillaires dans le sous-épicaire.

Dans les cœurs epi-PKR1^{-/-} et PKR1^{-/-} apparaissent également des phénomènes de fibrose. Ils se décrivent par la surexpression des gènes du *Collagène* et par l'apparition de dépôts fibrotiques dans le tissu cardiaque. La fibrose développée est aussi à relier à l'hypoxie cardiaque et à l'hypertrophie. En effet, l'ischémie cardiaque induit la fibrose par le recrutement des fibroblastes et des cellules hématopoïétiques circulantes (Haudek et al., 2006; Kania, Blyszczuk, and Eriksson, 2009; van Amerongen et al., 2007) et l'hypertrophie l'induit

par la libération de signaux biochimique et mécanique qui agissent pour déclencher la sécrétion de facteurs pro-fibrotiques par les cellules cardiaques non-myocytes (Teekakirikul et al., 2010).

Une étude menée au sein de notre laboratoire a également démontré que la voie de signalisation myocarde-PKR1 régule l'activation des cellules progénitrices pour induire la néo-vascularisation. En effet, les souris transgéniques surexprimant *Pkr1* spécifiquement au niveau des cardiomyocytes développent une amplification de la prolifération et de la différenciation de cellules progénitrices sans altérer la morphologie et la fonction du myocarde (Urayama et al., 2008). Il est clair que la voie de signalisation PKR1 contrôle les communications cellulaires cardiaques responsables de la régulation de l'angiogenèse, l'artériogenèse et de la fonction du myocarde (Cf. figure 59).

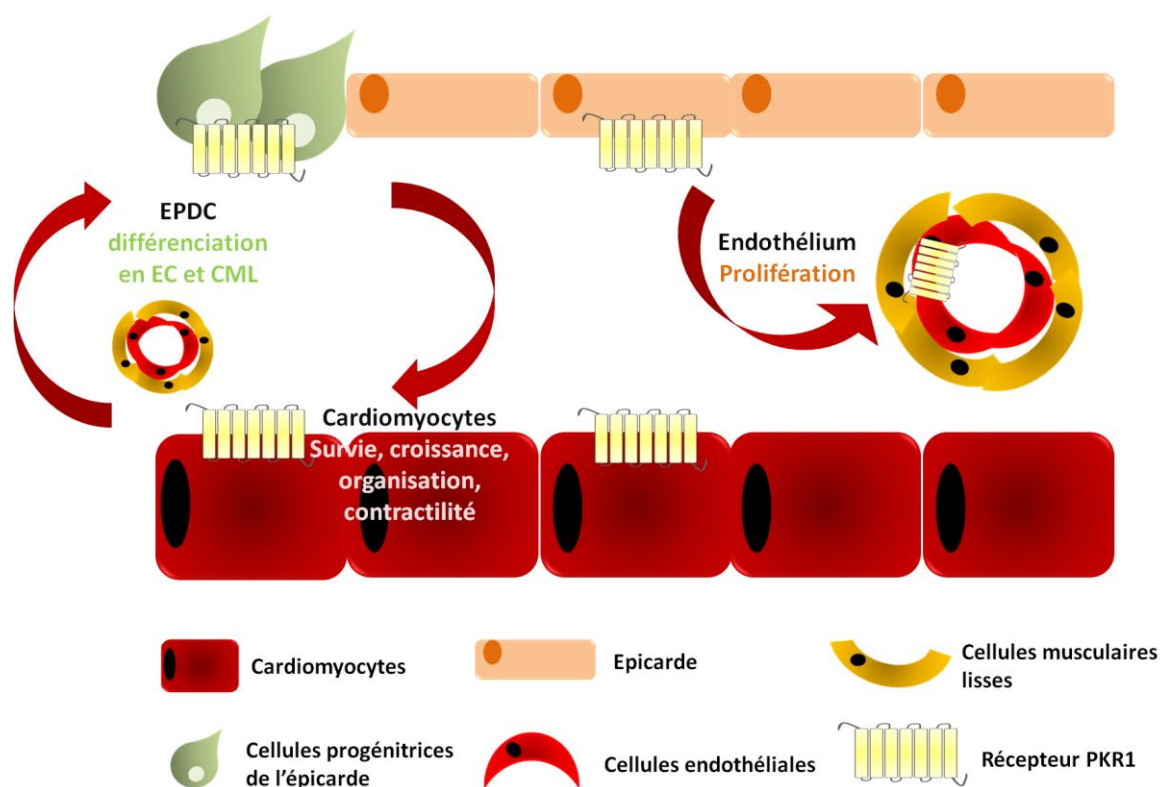


Figure 59. Rôle de la voie de signalisation dans la communication cellulaire entre : l'épicarde et le myocarde ; l'épicarde et l'endothélium vasculaire

II. Phénotype rénal : PKR1^{-/-} versus epi-PKR1^{-/-}

Nos travaux de recherches ont permis de mettre en évidence le rôle de PKR1 et de la voie de signalisation epicardin⁺/PKR1 dans la fonction rénale. Ainsi nous démontrons que la délétion systémique et épicaarde-spécifique conduit à l'altération de la fonction des cellules progénitrices epicardin⁺, à l'altération de l'angiogenèse glomérulaire et des voies de survie, et au développement d'hypoxie, de fibrose et de dysfonction tubulaire. La délétion systémique de *Pkr1* touche également la formation des capillaires interstitiels alors que la délétion épicaarde-spécifique provoque un défaut dans la formation des vaisseaux sanguins α -SMA⁺.

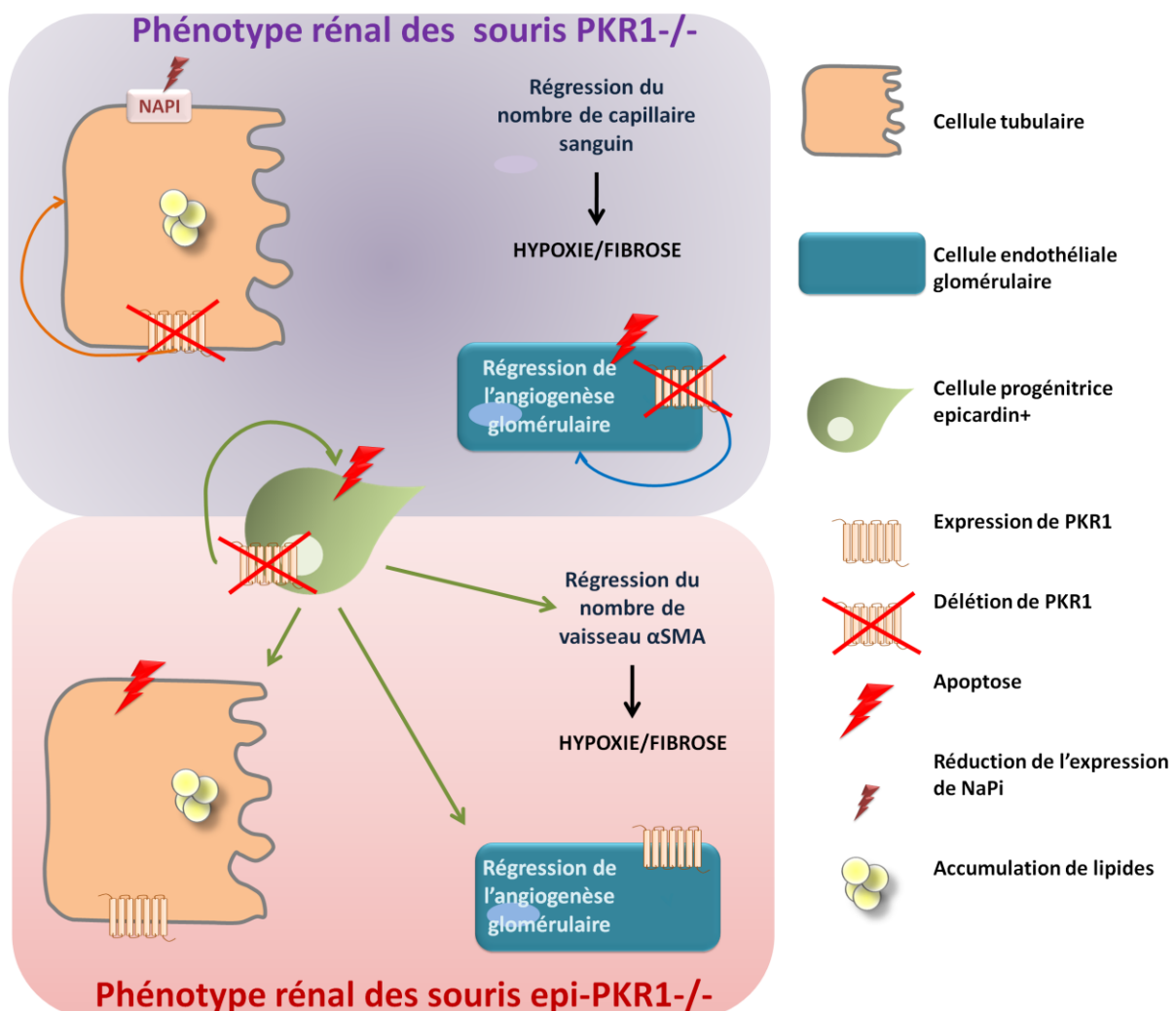


Figure 60. Effet de la délétion de *Pkr1* sur la fonction rénale

A. Les maladies cardiaques et rénales chez les souris $PKR1^{-/-}$ et $epi-PKR1^{-/-}$ sont indépendantes

L'invalidation du gène *Pkr1* chez la souris provoque le développement de pathologies à la fois au niveau du système cardiaque et rénal. Le cœur et le rein sont d'importants régulateurs de la pression artérielle, de la perfusion sanguine, de l'oxygénation des tissus et de la modulation des fluides extracellulaires. En terme médical, on utilise notamment, la notion de « syndrome cardio-rénal » pour désigner l'interdépendance pathologique entre le cœur et rein (Ronco et al., 2008). Néanmoins, nos analyses ont pu démontrer que ces anomalies se développent dès la naissance puisque les souris $PKR1^{-/-}$ et $epi-PKR1^{-/-}$ sont atteintes au jour postnatal 1 d'une cardiopathie et d'une hypoplasie du tissu rénal. Ces observations ont écarté l'interdépendance entre le développement des maladies cardiaques et rénales chez les souris $PKR1^{-/-}$ et $epi-PKR1^{-/-}$. Cependant, l'origine de l'hypoplasie rénale est associée uniquement à l'hypo perfusion dans les $PKR1^{-/-}$ alors qu'elle est associée à une baisse du nombre de vaisseaux exprimant le marqueur α -SMA et à une baisse de la prolifération des cellules rénales dans les reins $epi-PKR1^{-/-}$. Ainsi, notre étude a révélé le rôle de l'axe cellules progénitrices $epicardin^{+}/PKR1$ dans la morphogenèse rénale. De la même manière, l'inactivation des gènes *Wt1* et *Epicardin* chez la souris conduit à la formation de reins hypoplasiques (Moore et al., 1999; Quaggin et al., 1999).

B. $PKR1$ est essentiel au développement de l'angiogenèse glomérulaire

1. Contrôles autocrine et paracrine des mécanismes d'angiogenèse et d'artériogenèse du rein dépendants des cellules $epicardin^{+}$ par la voie de signalisation $PKR1$

- ***Le récepteur $PKR1$ est essentiel à l'angiogenèse glomérulaire et à l'artériogenèse rénale : $PKR1^{-/-}$ versus $epi-PKR1^{-/-}$***

Les délétions systémique et épicaarde-spécifique du récepteur *Pkr1* provoquent un phénotype vasculaire rénal différent :

- L'invalidation systémique du gène *Pkr1* touche les cellules tubulaires, les cellules endothéliales, les cellules progénitrices rénales $epicardin^{+}$. Elle provoque à la

naissance jusqu'à l'âge de 12 semaines une réduction des capillaires sanguins interstitiels PECAM-1⁺. A partir de 12 semaines, le réseau capillaire interstitiel rénal est normalisé par une élévation des phénomènes d'angiogenèse. Ces derniers sont stimulés par la surexpression des facteurs pro-angiogéniques à partir du jour postnatal 1 incluant HIF-1 α , les isoformes du VEGF, le FGF et le PDGF. Néanmoins, l'angiogenèse glomérulaire n'est pas normalisée à l'âge adulte.

- L'invalidation épicarde-spécifique de *Pkr1* touche essentiellement les cellules progénitrices epicardin⁺. Elle induit une réduction de l'angiogenèse glomérulaire qui se caractérise par une baisse du nombre de cellules endothéliales PECAM-1⁺ dans le glomérule. L'angiogenèse interstitiel n'est pas altérée à la naissance mais les reins epi-PKR1^{-/-} subissent une raréfaction vasculaire due à l'apoptose des cellules endothéliales interstitielles.

Ces deux modèles de souris développent donc un phénotype vasculaire différent. Comment peut être expliqué le phénotype vasculaire interstitiel des reins PKR1^{-/-} et epi-PKR1^{-/-} ?

Les cellules endothéliales rénales qui n'expriment plus PKR1 ont une activité réduite dans les reins PKR1^{-/-} qui se traduit par une baisse du réseau capillaire interstitiel rénal. En effet, le récepteur PKR1 a déjà été décrit comme un facteur impliqué dans la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales (Guilini et al., 2010). Le stress provoqué par la perte de *Pkr1* dans les cellules endothéliales a pour effet l'activation de deux processus : l'angiogenèse et la fibrose. La principale cause des mécanismes compensatoires observés chez les souris PKR1^{-/-} est la perte du gène *Pkr1* dans les cellules endothéliales : la perte de *Pkr1* dans les cellules endothéliales rénales conduit donc à une réduction de l'angiogenèse interstitielle à la naissance dans les reins PKR1^{-/-}. La baisse du réseau capillaire interstitiel déclenche ainsi des phénomènes d'hypoxie provoquant la libération de facteurs angiogéniques par les cellules tubulaires et les cellules endothéliales interstitielles. Dans le rein, l'expression du VEGF-A et de l'érythropoïétine est régulée par l'hypoxie via les facteurs de transcription HIF-1 α . De plus, les conditions hypoxiques stimulent également les cellules tubulaires rénales qui produisent des facteurs angiogéniques jouant sur l'activité des cellules endothéliales rénales (Nakamura et al., 2006; Tanaka et al., 2005).

Dans les reins epi-PKR1^{-/-} les cellules endothéliales interstitielles ne développent pas de stress autocrine puisque le récepteur PKR1 n'est pas inactivé. Cela se traduit par le développement d'un réseau capillaire interstitiel normal à la naissance. Cependant à l'âge adulte les reins epi-

PKR1^{-/-} développent une raréfaction vasculaire due à l'amplification de l'apoptose des cellules endothéliales interstitielles. Cet état est probablement dû à une baisse du réseau sanguin α -SMA⁺ dans les reins epi-PKR1^{-/-}. En effet les modèles d'ischémie du tissu rénal par la ligature des artères rénales causent une perte des cellules endothéliales par l'amplification des phénomènes d'apoptose (Horbelt et al., 2007). Ainsi, nous démontrons à la naissance la baisse du réseau sanguin α -SMA⁺ dans les reins epi-PKR1^{-/-}. Diverses études soutiennent nos résultats et révèlent le rôle du facteur epicardin dans la maturation du réseau sanguin rénal et dans la génération des précurseurs des CML (Cui, Schwartz, and Quaggin, 2003; Quaggin et al., 1999). Ces processus semblent également provoquer le développement dans les reins epi-PKR1^{-/-} d'un environnement hypoxique.

L'hypoxie développée par la perte de PKR1 dans les cellules endothéliales provoque également l'apparition de phénomènes de fibrose. En effet, dans le système rénal, l'hypoxie est un attracteur des cellules circulantes pro-fibrotiques (Ricardo and Deane, 2005) et contrôle la transformation des cellules épithéliales tubulaires vers un phénotype de type myofibroblaste (Haase, 2009). Il est également suggéré que l'hypoxie et la dysfonction endothéliale contribue au développement de fibrose par l'apparition de transformation endothéliale-mésenchymateuse décrite comme la transformation des cellules endothéliales en fibroblastes qui déclenche le phénotype fibrotique rénal (Piera-Velazquez, Li, and Jimenez, 2011; Zeisberg et al., 2008). Les souris PKR1^{-/-} et epi-PKR1^{-/-} développent des phénomènes de fibrose interstitielle décrits par une augmentation de l'expression des gènes du *Collagène* et l'apparition de dépôts fibrotiques à 24 semaines.

La compensation de l'angiogenèse dans les reins PKR1^{-/-} est donc dépendante de l'hypoxie induite par la baisse du réseau capillaire interstitiel. Quant est-il alors des reins epi-PKR1^{-/-} et de l'angiogenèse glomérulaire des reins PKR1^{-/-}?

Le point commun entre les reins PKR1^{-/-} et epi-PKR1^{-/-} est le défaut de l'angiogenèse glomérulaire. En effet, les reins PKR1^{-/-} et epi-PKR1^{-/-} développent dès la naissance une réduction du réseau de capillaire glomérulaire PECAM-1⁺ qui n'est pas normalisée à l'âge adulte. Notre étude démontre le rôle de la voie de signalisation PKR1 dans la maturation du glomérule et dans l'activité des cellules endothéliales glomérulaires.

Elle soutient une autre étude qui a démontré le rôle crucial des isoformes 164 et 188 du VEGF dans la fonction des cellules endothéliales glomérulaires : l'inactivation de ces isoformes chez

la souris conduit à une réduction de la vascularisation glomérulaire due à une perte des cellules endothéliales glomérulaires ; à un défaut de développement des péricytes recouvrant les capillaires péri-tubulaires et des cellules α -SMA⁺ (Mattot et al., 2002). Cette étude met en avant que l'activité des cellules endothéliales glomérulaire et interstitielle peut être régulée par différents facteurs. Ainsi, notre projet de recherche met en avant le rôle de l'axe des cellules epicardin⁺ et de PKR1 dans l'activité des cellules endothéliales glomérulaires. Diverses études ont également démontré le rôle du facteur epicardin dans les processus de glomérulogenèse (Cui, Schwartz, and Quaggin, 2003).

Nous démontrons également le rôle de l'axe cellules epicardin⁺/PKR1 dans la génération des CML rénales et les travaux de recherches décrits précédemment révèlent qu'en plus de jouer un rôle dans l'angiogenèse glomérulaire, les isoformes 164 et 188 du VEGF sont impliqués dans la formation des péricytes péri-tubulaires et des CML α -SMA⁺.

- **Rôle autocrine de la voie de signalisation PKR1 dans l'activité des cellules progénitrices rénales epicardin⁺**

L'origine des cellules endothéliales glomérulaires est assez controversée et regroupe des progéniteurs endothéliaux glomérulaires exogènes ou endogènes (Abrahamson, 2009). Nous démontrons :

- 1) *In vivo* : chez les souris PKR1^{-/-} et chez les souris epi-PKR1^{-/-} une réduction du nombre de cellules endothéliales glomérulaires qui débute dès le jour postnatal 1. L'inhibition du VEGF, chez la souris, cause l'altération de la glomérulogenèse caractérisée par l'absence des cellules endothéliales au sein du glomérule (Gerber et al., 1999; Kitamoto, Tokunaga, and Tomita, 1997). Par ailleurs, le facteur epicardin est également impliqué dans la glomérulogenèse puisqu'il est retrouvé dans les cellules mésenchymateuses rénales et les cellules épithéliales glomérulaires lors du développement (Acharya et al., 2011; Quaggin et al., 1999; Quaggin, Vanden Heuvel, and Igarashi, 1998). Nos résultats démontrent donc le rôle de la voie de signalisation epicardin⁺/PKR1 dans la maturation des glomérules rénaux ;
- 2) *In vivo* : chez les souris epi-PKR1^{-/-} une réduction du réseau sanguin α -SMA⁺. La délétion du gène *Epicardin* chez la souris, mène à l'altération du réseau capillaire interstitiel dans le métanephros caractérisée principalement par une désorganisation de

la vascularisation rénale et une perte des péricytes péri-vasculaires (Cui, Schwartz, and Quaggin, 2003) ;

- 3) *in vitro* : la PK2 via l'activation du récepteur PKR1 induit la différenciation des cellules epicardin⁺ rénales en cellules endothéliales et CML.

Ainsi, nos résultats révèlent que l'axe des cellules epicardin⁺ et de PKR1 est impliqué dans l'angiogenèse glomérulaire par les phénomènes de différenciation des cellules progénitrices rénales epicardin⁺ en cellules endothéliales et dans l'artériogenèse rénale par le biais de différenciation de ces cellules progénitrices epicardin⁺ en CML.

- **Rôle paracrine de la voie de signalisation PKR1 dans la prolifération des cellules endothéliales glomérulaires**

Nos résultats révèlent :

- 1) *In vivo* : l'altération de la prolifération des cellules endothéliales glomérulaires et des podocytes, composants essentiels de la glomérulogenèse, chez les souris epi-PKR1^{-/-} dès la naissance. La taille des glomérules et le nombre des cellules glomérulaires sont également considérablement réduits à l'âge adulte chez les souris epi-PKR1^{-/-}.
- 2) *In vitro* : l'altération de la communication paracrine entre les cellules endothéliales glomérulaires (CEG) et les cellules epicardin⁺ isolées de reins epi-PKR1^{-/-}. En effet, les CEG sont capables de proliférer en présence de milieu conditionné provenant des cellules epicardin⁺ WT. Cependant en présence de milieu conditionné provenant des cellules epicardin⁺ epi-PKR1^{-/-}, la prolifération des CEG n'est pas activée. Ces observations démontrent que les cellules epicardin⁺ epi-PKR1^{-/-} sont incapables de produire des facteurs stimulant la prolifération des CEG.

Nous avons corrélé précédemment la baisse du réseau capillaire glomérulaire à un défaut de différenciation des cellules epicardin⁺ en cellules endothéliales. L'altération de la prolifération des cellules endothéliales dans les reins epi-PKR1^{-/-} est également responsable de la baisse du réseau vasculaire glomérulaire. En effet, lors de la glomérulogenèse, les cellules endothéliales prolifèrent dans le glomérule et forment des agrégats pour donner lieu à la génération d'une boucle capillaire qui en formera 6 à 8 lors de la maturation du glomérule (Eremina et al., 2003; Kitamoto, Tokunaga, and Tomita, 1997; Reidy et al., 2009). Le VEGF joue également un rôle dans ce processus et induit la prolifération et la survie des CEG (Eremina et al., 2003).

Les podocytes issus des reins $\text{epi-PKR1}^{-/-}$ présentent également un défaut de prolifération. Ce défaut peut expliquer aussi la réduction de la prolifération des CEG. En effet, durant la glomérulogenèse les podocytes sécrètent de nombreux facteurs angiogéniques. La délétion ou la surexpression du VEGF-A dans les podocytes conduit à l'altération de la croissance, de la prolifération et de la survie des CEG. De plus, le mouvement des progéniteurs endothéliaux vers les futures structures glomérulaires lors de l'embryogenèse est dépendant de la sécrétion du VEGF-A par les podocytes (Eremina et al., 2003; Takahashi et al., 2001).

C. Rôle de PKR1 dans la survie des cellules rénales

Nos analyses mettent en avant l'implication d'altérations structurale et fonctionnelle des mitochondries dans le développement des pathologies rénales des souris $\text{PKR1}^{-/-}$ et $\text{epi-PKR1}^{-/-}$:

- 1) Les reins $\text{PKR1}^{-/-}$ développent une amplification de l'apoptose des cellules endothéliales glomérulaires caractérisée par l'activation de la caspase-3. L'apoptose est potentialisée par la réduction de la phosphorylation d'Akt. En effet, diverses études ont révélé le rôle protecteur de la voie de signalisation Akt lors de l'insuffisance rénale (Liu, Ma, and Sun, 2012; Shaik, Fifer, and Nowak, 2008) ;
- 2) Les reins $\text{epi-PKR1}^{-/-}$ présentent une dégénérescence des cellules tubulaires et l'activation de la caspase-3 dans les cellules tubulaires et endothéliales interstitielles ;
- 3) Les reins $\text{PKR1}^{-/-}$ et $\text{epi-PKR1}^{-/-}$ développent une altération de la fonction mitochondriale décrite par une réduction de l'activité de la succinate déshydrogénase. Les dysfonctions mitochondriales contribuent à la progression de l'insuffisance rénale et au déclenchement de la mort cellulaire par apoptose (Bonventre and Weinberg, 2003; Bosch, Poch, and Grau, 2009; Brooks et al., 2009; Funk and Schnellmann, 2012). Un modèle animal de pathologie mitochondriale (par mutation de l'ADN mitochondrial) conduit ainsi au développement d'insuffisance rénale principalement due à une dilatation tubulaire et une sclérose glomérulaire (Nakada, Inoue, and Hayashi, 2001).

Nos recherches démontrent, pour la première fois, le rôle autocrine et paracrine de la voie de signalisation PKR1 dépendante des cellules progénitrices epicardin^+ dans la protection des cellules tubulaires, des cellules endothéliales glomérulaires et des cellules epicardin^+ .

L'amplification de l'apoptose est en partie responsable de l'hypoplasie rénale observée à la naissance. La délétion des gènes *Epicardin* et *Wt1* cause une létalité embryonnaire en partie due au développement d'une malformation rénale (Moore et al., 1999).

D. PKR1 est essentiel à la fonction rénale

- **Rôle de PKR1 dans la morphogenèse des cellules endothéliales glomérulaires**

La structure des glomérules des reins *epi-PKR1^{-/-}* et *PKR1^{-/-}* est altérée : les glomérules *epi-PKR1^{-/-}* présentent un étalement des pédicelles de podocytes et un amincissement de la membrane basale et de l'endothélium glomérulaire ; les glomérules *PKR1^{-/-}* présentent une dilatation de la capsule de Bowman dans l'espace glomérulaire, un épaissement de la membrane basale et un étalement des pédicelles de podocytes. Nous démontrons particulièrement le rôle de l'axe des cellules *epicardin⁺* et de PKR1 dans la maturation des cellules endothéliales glomérulaires. En effet, lors de la maturation glomérulaire, les cellules endothéliales glomérulaires acquièrent une forme aplatie et deviennent fenestrées. Lorsque les capillaires glomérulaires commencent à adopter leurs structures matures, les podocytes projettent des projections cytoplasmiques appelées pédicelles (Abrahamson, 2009; Vaughan and Quaggin, 2008). Plusieurs facteurs sont impliqués dans la maturation des cellules glomérulaires :

- 1) La formation des pores endothéliaux est contrôlée de façon paracrine par les podocytes via la production de VEGF (Takemoto et al., 2006) ;
- 2) L'intégrité de l'endothélium glomérulaires est régi par le récepteur Tie1 (Puri et al., 1995)
- 3) La formation des boucles capillaires glomérulaires est contrôlée par la protéine Notch2 (McCright et al., 2001).

- **Rôle de PKR1 dans la fonction glomérulaire**

A l'âge adulte les souris *PKR1^{-/-}* et *epi-PKR1^{-/-}* présentent une dysfonction rénale caractérisée par une réduction de la diurèse des 24 heures (la prise d'eau n'est pas modifiée). Les souris *PKR1^{-/-}* et *epi-PKR1^{-/-}* présentent ainsi une réduction du débit de filtration glomérulaire

(DFG) décrite par une baisse de la clairance de la créatinine. La baisse du DFG est à relier à l'altération de l'angiogenèse glomérulaire, aux défauts structuraux des podocytes et des cellules endothéliales dans les reins $PKR1^{-/-}$ et $epi-PKR1^{-/-}$. A 24 semaines, les deux souris mutantes ne présentent pas de protéinurie mais un défaut de la structure glomérulaire. Néanmoins, à 36 semaines une protéinurie reliée au développement progressive de dysfonction endothéliale s'installe chez les souris $PKR1^{-/-}$. Cette dysfonction endothéliale est confirmée par l'amplification de l'apoptose des cellules endothéliales glomérulaires $PKR1^{-/-}$ à partir de 24 semaines. Plusieurs facteurs angiogéniques sont impliqués dans la régulation de la barrière de filtration glomérulaire : la perte podocyte-spécifique du *Vegf* cause une altération de la barrière de filtration glomérulaire dépendante d'un défaut de la survie, de la migration et de la différenciation des cellules endothéliales (Eremina et al., 2003) ; la surexpression du *Vegf* podocyte-spécifique conduit au développement d'une protéinurie associée à l'apoptose des cellules endothéliales glomérulaires (Davis et al., 2007).

A côté de ces anomalies de la fonction du glomérule, les reins $PKR1^{-/-}$ sont atteints d'une dilatation de leurs tubules et d'une hyperphosphaturie accompagnée d'une hypophosphatémie. Ainsi, nous mettons en évidence le rôle de la voie de signalisation $PKR1$ dans l'homéostasie tubulaire et plus particulièrement dans la régulation de la réabsorption du phosphate. Il semble que le récepteur $PKR1$ contrôle de façon autocrine l'expression transcriptionnelle et protéique du co-transporteur $NaPi$ puisque la délétion systémique de $PKR1$ cause une réduction de son expression. Les souris $epi-PKR1^{-/-}$ présentent également une réduction de l'excrétion des ions Na^+ , Cl^- et K^+ . Cette réduction est liée :

- 1) A l'apoptose des cellules tubulaires rénales exprimant le co-transporteur $NaPi$;
- 2) A la perte de la polarité cellulaire des cellules tubulaires $epi-PKR1^{-/-}$ dès la naissance pouvant ainsi provoquer la mauvaise localisation membranaire des transporteurs impliqués dans l'absorption du Na^+ , Cl^- et du K^+ .

Les reins $epi-PKR1^{-/-}$ présentent également dès la naissance une altération de la structure des cellules tubulaires caractérisée par une perte des invaginations membranaires, un défaut de la structure mitochondriale et une accumulation de lipides. Il est important de rappeler que les premiers édifices tubulaires appelés vésicules rénales se forment à partir de signaux cellulaires provenant des cellules mésenchymateuses du sinus uro-génital. Il n'a pas été montré le rôle exact des cellules $epicardin^+$ dans la libération de ces signaux cellulaires mais le facteur $epicardin$ est exprimé par les cellules mésenchymateuses du sinus uro-génital dès le

jpc 13.5 (Quaggin, Vanden Heuvel, and Igarashi, 1998). Il a également été récemment mis en avant que les facteurs produits par les cellules mésenchymateuses rénales sont capables de réduire la progression de l'insuffisance rénale et de stimuler la prolifération des cellules endothéliales glomérulaires (van Koppen et al., 2012).

PARTIE 6 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces travaux de recherche ont permis de mettre en évidence le rôle de la voie de signalisation PKR1 dans la survie des cellules cardiaques et rénales, la morphogenèse des tissus cardiaques et rénaux, les phénomènes de vascularisation propre au cœur et au rein et dans la communication cellulaire régissant la morphogenèse et la fonction cardio-rénale.

Ces résultats ont été mis en avant par un modèle d'étude utilisant la recombinaise Cre sous le promoteur *Gata5*. Ce dernier est un facteur de transcription qui est normalement retrouvé au niveau de l'épicaarde. Néanmoins, son expression a également été détectée au niveau des cardiomyocytes en bordure de l'épicaarde. Pourtant nous n'avons pas détecté de réduction de l'expression de PKR1 dans le myocarde des souris *epi-PKR1^{-/-}*. Cette découverte réduit la spécificité de GATA5 pour l'épicaarde rendant l'interprétation de nos résultats plus compliqués et il serait plus prudent de notre part de compléter cette étude par l'utilisation d'autres modèles de souris pouvant cibler l'inactivation de *Pkr1* dans l'épicaarde : à savoir l'utilisation de la recombinaise Cre sous le contrôle des promoteurs *Wt1* et *Epicardin*. En effet, des études ont déjà démontré l'efficacité de ces modèles. Cependant, encore récemment une équipe a dévoilé les limites de l'utilisation du contrôle de l'expression de la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur *Wt1* (Rudat and Kispert, 2012). Il faut donc garder à l'esprit que chaque modèle connaît ses limites et que la meilleure façon de les contourner est de compléter l'étude avec différents modèles.

Nos travaux de recherche ont également mis, pour la première fois, en évidence une méthode d'extraction des cellules *epicardin⁺* cardiaques et rénales. Plusieurs études ont révélé que les cellules progénitrices de l'épicaarde ont une forte plasticité et nous sommes la seule équipe à avoir démontré que les cellules *epicardin⁺* dérivées des cœurs peuvent subir des différenciations en cardiomyocytes sous l'action de la PK2. Cette observation augmente l'attractivité des cellules progénitrices de l'épicaarde pour la médecine régénérative. De plus la PK2 semble être un candidat idéal pour la médecine régénérative puisqu'elle permet l'induction de la différenciation des cellules souches de l'épicaarde en cellules vasculaires et en cardiomyocytes. En effet, les deux aspects importants de la médecine régénérative cardiaque sont la néo-vascularisation et le remplacement des cardiomyocytes. En plus de cela, nous avons également démontré que la voie de signalisation PK2/PKR1 contrôle le devenir cellulaire des cellules progénitrices de l'épicaarde en adipocytes. En effet, dans un milieu pro-adipogénique, elles sont capables de se différencier en adipocytes par la surexpression des gènes de l'adipogenèse. La PK2 inhibe ce processus et permet dans le même temps d'induire

leur différenciation en cellules vasculaires (Cf. figure 61). L'intérêt de la voie de signalisation des prokinétines est encore plus frappante puisque la lipotoxicité lors de cardiomyopathies dilatées est l'une des causes des dysfonctions cardiaques.

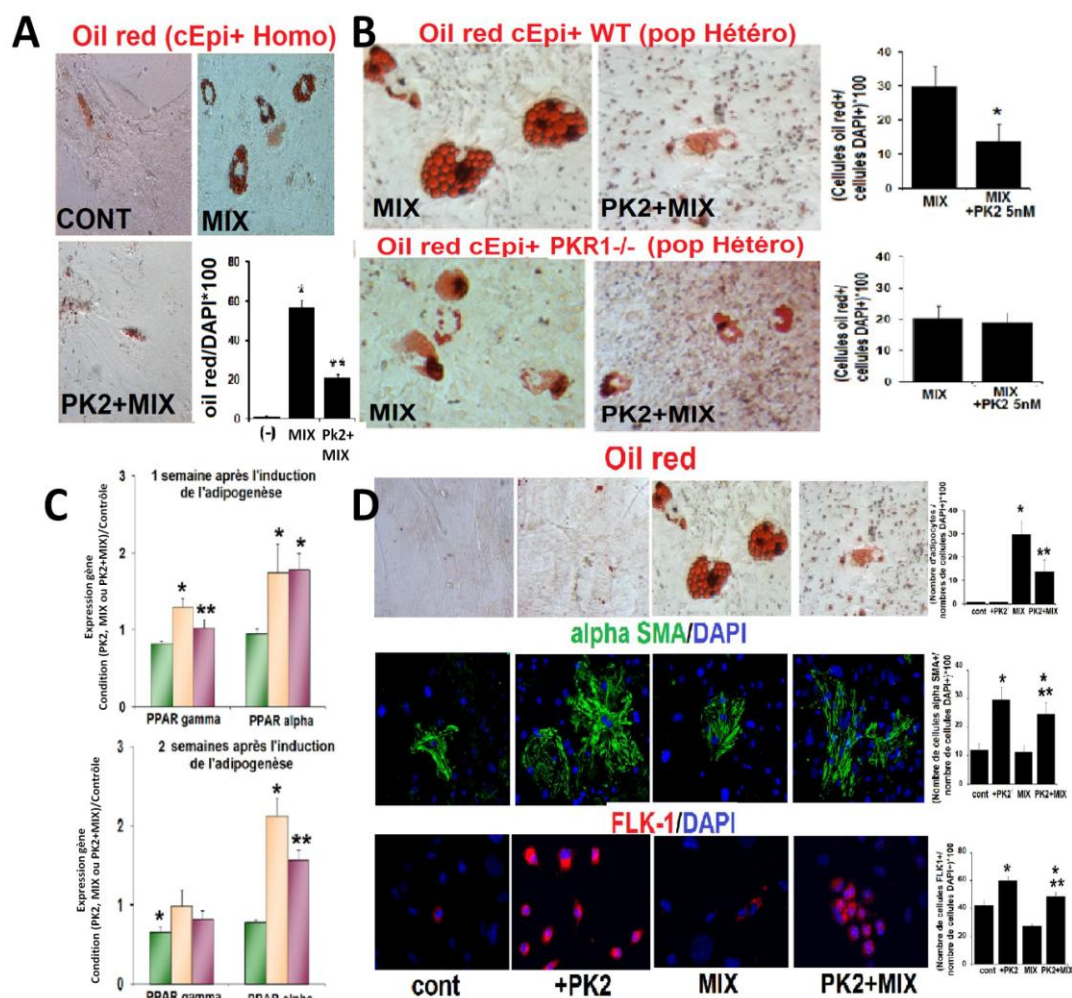


Figure 61. Contrôle du devenir des cellules progénitrices de l'épicarde en adipocytes et cellules vasculaires.

A) Marquage à l'oil red de cellules epicardin⁺ cardiaques traitées par un milieu pro-adipogénique seul pendant deux semaines (MIX) ou accompagné d'un prétraitement à la PK2 durant 12 heures (PK2+MIX). Les résultats démontrent que les cellules epicardin⁺ ont la capacité de se différencier en adipocytes et que la PK2 inhibe ce phénomène. B) Différenciation des cellules epicardin⁺ provenant d'explants cardiaques WT et PKR1^{-/-} démontrant que la PK2 agit via PKR1 pour inhiber l'adipogenèse des cellules epicardin⁺. C)

Analyse de l'expression de Ppar γ et Ppara après une et deux semaines de traitement pro-adipogénique révélant que le traitement à la PK2 empêche l'adipogenèse des cellules epicardin⁺ en inhibant l'expression de Ppar γ dans les premiers stades de l'adipogenèse et de Ppara dans les stades tardifs. D) Test du devenir des cellules epicardin⁺ sous l'action de la PK2 en condition pro-adipogénique. Nos résultats démontrent que : la PK2 seule n'entraîne pas la différenciation des cellules epicardin⁺ en adipocytes mais induit leur différenciation en cellules endothéliales et CML ; le traitement pro-adipogénique conduit à la différenciation des cellules epicardin⁺ en adipocytes et inhibent leur différenciation en cellules vasculaires ; le prétraitement à la PK2 suivi d'un traitement pro-adipogénique entraîne une amplification de la différenciation des cellules epicardin⁺ en cellules vasculaires et une inhibition de leur différenciation en adipocytes.

Nos résultats ont également démontré pour la première fois la présence des cellules epicardin⁺ dans les reins et le rôle de la voie de signalisation PK2/PKR1 dans leur différenciation en cellules vasculaires. Au vu de la plasticité des cellules epicardin⁺ cardiaques, il serait intéressant d'étudier les capacités de différenciation de celles résidant dans le rein et plus particulièrement en lignée de podocytes et de cellules tubulaires.

Sommes toutes, nos travaux de recherche ont permis de mettre en évidence l'implication d'un nouveau facteur régissant à la fois le système cardiovasculaire et rénal : le récepteur PKR1. Il représente ainsi un facteur potentiel pour le traitement des maladies cardiaques et rénales de types ischémiques.

REFERENCE

- Abbott, J. D., Huang, Y., Liu, D., Hickey, R., Krause, D. S., and Giordano, F. J. (2004). Stromal cell-derived factor-1 α plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* **110**(21), 3300-5.
- Abdel-Latif, A., Bolli, R., Tleyjeh, I. M., Montori, V. M., Perin, E. C., Hornung, C. A., Zuba-Surma, E. K., Al-Mallah, M., and Dawn, B. (2007). Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* **167**(10), 989-97.
- Abrahamson, D. R. (2009). Development of kidney glomerular endothelial cells and their role in basement membrane assembly. *Organogenesis* **5**(1), 275-87.
- Abreu, A. P., Trarbach, E. B., de Castro, M., Frade Costa, E. M., Versiani, B., Matias Baptista, M. T., Garmes, H. M., Mendonca, B. B., and Latronico, A. C. (2008). Loss-of-function mutations in the genes encoding prokineticin-2 or prokineticin receptor-2 cause autosomal recessive Kallmann syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **93**(10), 4113-8.
- Acharya, A., Baek, S. T., Banfi, S., Eskiocak, B., and Tallquist, M. D. (2011). Efficient inducible Cre-mediated recombination in Tcf21 cell lineages in the heart and kidney. *Genesis* **49**(11), 870-7.
- Acharya, A., Baek, S. T., Huang, G., Eskiocak, B., Goetsch, S., Sung, C. Y., Banfi, S., Sauer, M. F., Olsen, G. S., Duffield, J. S., Olson, E. N., and Tallquist, M. D. (2012). The bHLH transcription factor Tcf21 is required for lineage-specific EMT of cardiac fibroblast progenitors. *Development* **139**(12), 2139-49.
- Agras, P. I., Tarcana, A., Baskin, E., Cengiz, N., Gurakan, B., and Saatci, U. (2004). Acute renal failure in the neonatal period. *Ren Fail* **26**(3), 305-9.
- Ahn, S., Kim, J., Hara, M. R., Ren, X. R., and Lefkowitz, R. J. (2009). {beta}-Arrestin-2 Mediates Anti-apoptotic Signaling through Regulation of BAD Phosphorylation. *J Biol Chem* **284**(13), 8855-65.
- Ahn, S. E., Kim, S., Park, K. H., Moon, S. H., Lee, H. J., Kim, G. J., Lee, Y. J., Cha, K. Y., and Chung, H. M. (2006). Primary bone-derived cells induce osteogenic differentiation without exogenous factors in human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **340**(2), 403-8.
- Ai, X., Curran, J. W., Shannon, T. R., Bers, D. M., and Pogwizd, S. M. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure. *Circ Res* **97**(12), 1314-22.
- Airik, R., Bussen, M., Singh, M. K., Petry, M., and Kispert, A. (2006). Tbx18 regulates the development of the ureteral mesenchyme. *J Clin Invest* **116**(3), 663-74.
- Albrecht, F. E., Xu, J., Moe, O. W., Hopfer, U., Simonds, W. F., Orlowski, J., and Jose, P. A. (2000). Regulation of NHE3 activity by G protein subunits in renal brush-border membranes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278**(4), R1064-73.
- Alcorn, D., Maric, C., and McCausland, J. (1999). Development of the renal interstitium. *Pediatr Nephrol* **13**(4), 347-54.
- Andersson, D. C., Fauconnier, J., Yamada, T., Lacampagne, A., Zhang, S. J., Katz, A., and Westerblad, H. (2011). Mitochondrial production of reactive oxygen species contributes to the beta-adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes. *J Physiol* **589**(Pt 7), 1791-801.
- Andreoli, S. P. (2004). Acute renal failure in the newborn. *Semin Perinatol* **28**(2), 112-23.
- Anthony, D. F., Sin, Y. Y., Vadrevu, S., Advant, N., Day, J. P., Byrne, A. M., Lynch, M. J., Milligan, G., Houslay, M. D., and Baillie, G. S. (2011). beta-Arrestin 1 inhibits the

- GTPase-activating protein function of ARHGAP21, promoting activation of RhoA following angiotensin II type 1A receptor stimulation. *Mol Cell Biol* **31**(5), 1066-75.
- Aoki, Y., Albrecht, F. E., Bergman, K. R., and Jose, P. A. (1996). Stimulation of Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-2Cl⁻ cotransport in rat medullary thick ascending limb by dopamine. *Am J Physiol* **271**(6 Pt 2), R1561-7.
- Aperia, A., Bertorello, A., and Seri, I. (1987). Dopamine causes inhibition of Na⁺-K⁺-ATPase activity in rat proximal convoluted tubule segments. *Am J Physiol* **252**(1 Pt 2), F39-45.
- Aplin, M., Christensen, G. L., Schneider, M., Heydorn, A., Gammeltoft, S., Kjolbye, A. L., Sheikh, S. P., and Hansen, J. L. (2007). Differential extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 activation by the angiotensin type 1 receptor supports distinct phenotypes of cardiac myocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **100**(5), 296-301.
- Appert-Collin, A., Cotecchia, S., Nenniger-Tosato, M., Pedrazzini, T., and Diviani, D. (2007). The A-kinase anchoring protein (AKAP)-Lbc-signaling complex mediates alpha1 adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(24), 10140-5.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J. M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**(5302), 964-7.
- Asano, K., Bohlmeier, T. J., Westcott, J. Y., Zisman, L., Kinugawa, K., Good, M., Minobe, W. A., Roden, R., Wolfel, E. E., Lindenfeld, J., David Port, J., Perryman, M. B., Cleveland, J., Lowes, B. D., and Bristow, M. R. (2002). Altered expression of endothelin receptors in failing human left ventricles. *J Mol Cell Cardiol* **34**(7), 833-46.
- Azacie, A., Fineman, J. R., and He, Y. (2006). Myocardial transcription factors are modulated during pathologic cardiac hypertrophy in vivo. *J Thorac Cardiovasc Surg* **132**(6), 1262-71.
- Bacic, D., Capuano, P., Baum, M., Zhang, J., Stange, G., Biber, J., Kaissling, B., Moe, O. W., Wagner, C. A., and Murer, H. (2005). Activation of dopamine D1-like receptors induces acute internalization of the renal Na⁺/phosphate cotransporter NaPi-IIa in mouse kidney and OK cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **288**(4), F740-7.
- Bacic, D., Kaissling, B., McLeroy, P., Zou, L., Baum, M., and Moe, O. W. (2003). Dopamine acutely decreases apical membrane Na/H exchanger NHE3 protein in mouse renal proximal tubule. *Kidney Int* **64**(6), 2133-41.
- Baek, S. T., and Tallquist, M. D. (2012). Nf1 limits epicardial derivative expansion by regulating epithelial to mesenchymal transition and proliferation. *Development* **139**(11), 2040-9.
- Baines, C. P., and Molkentin, J. D. (2005). STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *J Mol Cell Cardiol* **38**(1), 47-62.
- Bal, M. P. (2006). NEONATAL GLUCOCORTICOID TREATMENT OF RATS INDUCES LIFE-LONG CHANGES IN EXPRESSION OF CARDIAC CONTRACTILE PROTEINS.
- Baldwin, J. M. (1994). Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr Opin Cell Biol* **6**(2), 180-90.
- Barberi, T., Willis, L. M., Socci, N. D., and Studer, L. (2005). Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Med* **2**(6), e161.
- Bardswell, S. C., Cuello, F., Rowland, A. J., Sadayappan, S., Robbins, J., Gautel, M., Walker, J. W., Kentish, J. C., and Avkiran, M. (2010). Distinct sarcomeric substrates are responsible for protein kinase D-mediated regulation of cardiac myofilament Ca²⁺ sensitivity and cross-bridge cycling. *J Biol Chem* **285**(8), 5674-82.

- Barki-Harrington, L., Luttrell, L. M., and Rockman, H. A. (2003). Dual inhibition of beta-adrenergic and angiotensin II receptors by a single antagonist: a functional role for receptor-receptor interaction in vivo. *Circulation* **108**(13), 1611-8.
- Barnes, W. G., Reiter, E., Violin, J. D., Ren, X. R., Milligan, G., and Lefkowitz, R. J. (2005). beta-Arrestin 1 and Galphaq/11 coordinately activate RhoA and stress fiber formation following receptor stimulation. *J Biol Chem* **280**(9), 8041-50.
- Bartelds, B., Gratama, J. W., Knoester, H., Takens, J., Smid, G. B., Aarnoudse, J. G., Heymans, H. S., and Kuipers, J. R. (1998). Perinatal changes in myocardial supply and flux of fatty acids, carbohydrates, and ketone bodies in lambs. *Am J Physiol* **274**(6 Pt 2), H1962-9.
- Basile, D. P. (2007). The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney Int* **72**(2), 151-6.
- Battersby, S., Critchley, H. O., Morgan, K., Millar, R. P., and Jabbour, H. N. (2004). Expression and regulation of the prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bv8) and their receptors in the human endometrium across the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* **89**(5), 2463-9.
- Bearzi, C., Rota, M., Hosoda, T., Tillmanns, J., Nascimbene, A., De Angelis, A., Yasuzawa-Amano, S., Trofimova, I., Siggins, R. W., Lecapitaine, N., Cascapera, S., Beltrami, A. P., D'Alessandro, D. A., Zias, E., Quaini, F., Urbanek, K., Michler, R. E., Bolli, R., Kajstura, J., Leri, A., and Anversa, P. (2007). Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(35), 14068-73.
- Belema Bedada, F., Technau, A., Ebelt, H., Schulze, M., and Braun, T. (2005). Activation of myogenic differentiation pathways in adult bone marrow-derived stem cells. *Mol Cell Biol* **25**(21), 9509-19.
- Bell, R. M., and Yellon, D. M. (2003). Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS. *J Mol Cell Cardiol* **35**(2), 185-93.
- Bellomo, D., Headrick, J. P., Silins, G. U., Paterson, C. A., Thomas, P. S., Gartside, M., Mould, A., Cahill, M. M., Tonks, I. D., Grimmond, S. M., Townson, S., Wells, C., Little, M., Cummings, M. C., Hayward, N. K., and Kay, G. F. (2000). Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (Vegfb) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res* **86**(2), E29-35.
- Beltrami, A. P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B., and Anversa, P. (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* **114**(6), 763-76.
- Beltrami, A. P., Urbanek, K., Kajstura, J., Yan, S. M., Finato, N., Bussani, R., Nadal-Ginard, B., Silvestri, F., Leri, A., Beltrami, C. A., and Anversa, P. (2001). Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* **344**(23), 1750-7.
- Bergmann, O., Bhardwaj, R. D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabe-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B. A., Druid, H., Jovinge, S., and Frisen, J. (2009). Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* **324**(5923), 98-102.
- Bernstein, E., Kim, S. Y., Carmell, M. A., Murchison, E. P., Alcorn, H., Li, M. Z., Mills, A. A., Elledge, S. J., Anderson, K. V., and Hannon, G. J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* **35**(3), 215-7.
- Bertorello, A., and Aperia, A. (1990). Inhibition of proximal tubule Na(+)-K(+)-ATPase activity requires simultaneous activation of DA1 and DA2 receptors. *Am J Physiol* **259**(6 Pt 2), F924-8.

- Biber, J., Gisler, S. M., Hernando, N., Wagner, C. A., and Murer, H. (2004). PDZ interactions and proximal tubular phosphate reabsorption. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**(5), F871-5.
- Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (1993). Molecular aspects of mesenchymal-epithelial interactions. *Annu Rev Cell Biol* **9**, 511-40.
- Bobulescu, I. A., Quinones, H., Gisler, S. M., Di Sole, F., Hu, M. C., Shi, M., Zhang, J., Fuster, D. G., Wright, N., Mumby, M., and Moe, O. W. (2010). Acute Regulation of Renal Na⁺/H⁺ Exchanger NHE3 by Dopamine: Role of Protein Phosphatase 2A. *Am J Physiol Renal Physiol*.
- Bock-Marquette, I., Shrivastava, S., Pipes, G. C., Thatcher, J. E., Blystone, A., Shelton, J. M., Galindo, C. L., Melegh, B., Srivastava, D., Olson, E. N., and DiMaio, J. M. (2009). Thymosin beta4 mediated PKC activation is essential to initiate the embryonic coronary developmental program and epicardial progenitor cell activation in adult mice in vivo. *J Mol Cell Cardiol* **46**(5), 728-38.
- Bogers, A. J., Gittenberger-de Groot, A. C., Poelmann, R. E., Peault, B. M., and Huysmans, H. A. (1989). Development of the origin of the coronary arteries, a matter of ingrowth or outgrowth? *Anat Embryol (Berl)* **180**(5), 437-41.
- Boie, Y., Rushmore, T. H., Darmon-Goodwin, A., Grygorczyk, R., Slipetz, D. M., Metters, K. M., and Abramovitz, M. (1994). Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid IP receptor. *J Biol Chem* **269**(16), 12173-8.
- Boisbouvier, J., Albrand, J. P., Blackledge, M., Jaquinod, M., Schweitz, H., Lazdunski, M., and Marion, D. (1998). A structural homologue of colipase in black mamba venom revealed by NMR floating disulphide bridge analysis. *J Mol Biol* **283**(1), 205-19.
- Boknik, P., Grote-Wessels, S., Barteska, G., Jiang, M., Muller, F. U., Schmitz, W., Neumann, J., and Birnbaumer, L. (2009). Genetic disruption of G proteins, G(i2)alpha or G(o)alpha, does not abolish inotropic and chronotropic effects of stimulating muscarinic cholinceptors in atrium. *Br J Pharmacol* **158**(6), 1557-64.
- Bonilla-Felix, M. (2004). Development of water transport in the collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**(6), F1093-101.
- Bonventre, J. V., and Weinberg, J. M. (2003). Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* **14**(8), 2199-210.
- Bosch, R. J., Rojo-Linares, P., Torrecillas-Casamayor, G., Iglesias-Cruz, M. C., Rodriguez-Puyol, D., and Rodriguez-Puyol, M. (1999). Effects of parathyroid hormone-related protein on human mesangial cells in culture. *Am J Physiol* **277**(6 Pt 1), E990-5.
- Bosch, X., Poch, E., and Grau, J. M. (2009). Rhabdomyolysis and acute kidney injury. *N Engl J Med* **361**(1), 62-72.
- Bourne, H. R. (1997). How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* **9**(2), 134-42.
- Bouzamondo, A., Hulot, J. S., Sanchez, P., and Lechat, P. (2003). Beta-blocker benefit according to severity of heart failure. *Eur J Heart Fail* **5**(3), 281-9.
- Bowman, J. C., Steinberg, S. F., Jiang, T., Geenen, D. L., Fishman, G. I., and Buttrick, P. M. (1997). Expression of protein kinase C beta in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates. *J Clin Invest* **100**(9), 2189-95.
- Braitsch, C. M., Combs, M. D., Quaggin, S. E., and Yutzey, K. E. (2012). Pod1/Tcf21 is regulated by retinoic acid signaling and inhibits differentiation of epicardium-derived cells into smooth muscle in the developing heart. *Dev Biol*.
- Brannan, C. I., Perkins, A. S., Vogel, K. S., Ratner, N., Nordlund, M. L., Reid, S. W., Buchberg, A. M., Jenkins, N. A., Parada, L. F., and Copeland, N. G. (1994). Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues. *Genes Dev* **8**(9), 1019-29.

- Braz, J. C., Gregory, K., Pathak, A., Zhao, W., Sahin, B., Klevitsky, R., Kimball, T. F., Lorenz, J. N., Nairn, A. C., Liggett, S. B., Bodi, I., Wang, S., Schwartz, A., Lakatta, E. G., DePaoli-Roach, A. A., Robbins, J., Hewett, T. E., Bibb, J. A., Westfall, M. V., Kranias, E. G., and Molkentin, J. D. (2004). PKC- α regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med* **10**(3), 248-54.
- Breitbart, M., Bostani, T., Roell, W., Xia, Y., Dewald, O., Nygren, J. M., Fries, J. W., Tiemann, K., Bohlen, H., Hescheler, J., Welz, A., Bloch, W., Jacobsen, S. E., and Fleischmann, B. K. (2007). Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood* **110**(4), 1362-9.
- Breyer, J. A., Hunsicker, L. G., Bain, R. P., and Lewis, E. J. (1994). Angiotensin converting enzyme inhibition in diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *Kidney Int Suppl* **45**, S156-60.
- Breyer, M. D., and Ando, Y. (1994). Hormonal signaling and regulation of salt and water transport in the collecting duct. *Annu Rev Physiol* **56**, 711-39.
- Breyer, M. D., Jacobson, H. R., Davis, L. S., and Breyer, R. M. (1993). In situ hybridization and localization of mRNA for the rabbit prostaglandin EP3 receptor. *Kidney Int* **44**(6), 1372-8.
- Bristow, M. R., Hershberger, R. E., Port, J. D., Minobe, W., and Rasmussen, R. (1989). Beta 1- and beta 2-adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Mol Pharmacol* **35**(3), 295-303.
- Brodde, O. E., and Michel, M. C. (1999). Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* **51**(4), 651-90.
- Brooks, C., Wei, Q., Cho, S. G., and Dong, Z. (2009). Regulation of mitochondrial dynamics in acute kidney injury in cell culture and rodent models. *J Clin Invest* **119**(5), 1275-85.
- Brouillet, S., Hoffmann, P., Benharouga, M., Salomon, A., Schaal, J. P., Feige, J. J., and Alfaidy, N. (2010). Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Mol Biol Cell* **21**(16), 2832-43.
- Brouillet, S., Hoffmann, P., Chauvet, S., Salomon, A., Chamboredon, S., Sergent, F., Benharouga, M., Feige, J. J., and Alfaidy, N. (2012). Revisiting the role of hCG: new regulation of the angiogenic factor EG-VEGF and its receptors. *Cell Mol Life Sci* **69**(9), 1537-50.
- Brown, E. M., Gamba, G., Riccardi, D., Lombardi, M., Butters, R., Kifor, O., Sun, A., Hediger, M. A., Lytton, J., and Hebert, S. C. (1993). Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* **366**(6455), 575-80.
- Bullock, C. M., Li, J. D., and Zhou, Q. Y. (2004). Structural determinants required for the bioactivities of prokineticins and identification of prokineticin receptor antagonists. *Mol Pharmacol* **65**(3), 582-8.
- Cai, C. L., Martin, J. C., Sun, Y., Cui, L., Wang, L., Ouyang, K., Yang, L., Bu, L., Liang, X., Zhang, X., Stallcup, W. B., Denton, C. P., McCulloch, A., Chen, J., and Evans, S. M. (2008). A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature* **454**(7200), 104-8.
- Cannell, M. B., Cheng, H., and Lederer, W. J. (1995). The control of calcium release in heart muscle. *Science* **268**(5213), 1045-9.
- Canto, P., Munguia, P., Soderlund, D., Castro, J. J., and Mendez, J. P. (2009). Genetic analysis in patients with Kallmann syndrome: coexistence of mutations in prokineticin receptor 2 and KAL1. *J Androl* **30**(1), 41-5.
- Cao, N., Liu, Z., Chen, Z., Wang, J., Chen, T., Zhao, X., Ma, Y., Qin, L., Kang, J., Wei, B., Wang, L., Jin, Y., and Yang, H. T. (2012). Ascorbic acid enhances the cardiac

- differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells. *Cell Res* **22**(1), 219-36.
- Capuano, P., Bacic, D., Roos, M., Gisler, S. M., Stange, G., Biber, J., Kaissling, B., Weinman, E. J., Shenolikar, S., Wagner, C. A., and Murer, H. (2007). Defective coupling of apical PTH receptors to phospholipase C prevents internalization of the Na⁺-phosphate cotransporter NaPi-IIa in Nherf1-deficient mice. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**(2), C927-34.
- Cariolato, L., Cavin, S., and Diviani, D. (2011). A-kinase anchoring protein (AKAP)-Lbc anchors a PKN-based signaling complex involved in alpha1-adrenergic receptor-induced p38 activation. *J Biol Chem* **286**(10), 7925-37.
- Carmeliet, P., Ng, Y. S., Nuyens, D., Theilmeier, G., Brusselmans, K., Cornelissen, I., Ehler, E., Kakkar, V. V., Stalmans, I., Mattot, V., Perriard, J. C., Dewerchin, M., Flameng, W., Nagy, A., Lupu, F., Moons, L., Collen, D., D'Amore, P. A., and Shima, D. T. (1999). Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med* **5**(5), 495-502.
- Castaneda-Bueno, M., Cervantes-Perez, L. G., Vazquez, N., Uribe, N., Kantesaria, S., Morla, L., Bobadilla, N. A., Doucet, A., Alessi, D. R., and Gamba, G. (2012). Activation of the renal Na⁺:Cl⁻ cotransporter by angiotensin II is a WNK4-dependent process. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(20), 7929-34.
- Cataldi, L., Leone, R., Moretti, U., De Mitri, B., Fanos, V., Ruggeri, L., Sabatino, G., Torcasio, F., Zannardo, V., Attardo, G., Riccobene, F., Martano, C., Benini, D., and Cuzzolin, L. (2005). Potential risk factors for the development of acute renal failure in preterm newborn infants: a case-control study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **90**(6), F514-9.
- Cavalli, A., Lattion, A. L., Hummler, E., Nenniger, M., Pedrazzini, T., Aubert, J. F., Michel, M. C., Yang, M., Lembo, G., Vecchione, C., Mostardini, M., Schmidt, A., Beermann, F., and Cotecchia, S. (1997). Decreased blood pressure response in mice deficient of the alpha1b-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21), 11589-94.
- Cazorla, O., Lucas, A., Poirier, F., Lacampagne, A., and Lezoualc'h, F. (2009). The cAMP binding protein Epac regulates cardiac myofilament function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(33), 14144-9.
- Cervantes, D., Crosby, C., and Xiang, Y. (2010). Arrestin orchestrates crosstalk between G protein-coupled receptors to modulate the spatiotemporal activation of ERK MAPK. *Circ Res* **106**(1), 79-88.
- Challice, C. E., and Viragh, S. (1974). The architectural development of the early mammalian heart. *Tissue Cell* **6**(3), 447-62.
- Chen, J., Kuei, C., Sutton, S., Wilson, S., Yu, J., Kamme, F., Mazur, C., Lovenberg, T., and Liu, C. (2005). Identification and pharmacological characterization of prokineticin 2 beta as a selective ligand for prokineticin receptor 1. *Mol Pharmacol* **67**(6), 2070-6.
- Chen, T. H., Chang, T. C., Kang, J. O., Choudhary, B., Makita, T., Tran, C. M., Burch, J. B., Eid, H., and Sucov, H. M. (2002). Epicardial induction of fetal cardiomyocyte proliferation via a retinoic acid-inducible trophic factor. *Dev Biol* **250**(1), 198-207.
- Cheng, M. Y., Bittman, E. L., Hattar, S., and Zhou, Q. Y. (2005). Regulation of prokineticin 2 expression by light and the circadian clock. *BMC Neurosci* **6**, 17.
- Cheng, M. Y., Lee, A. G., Culbertson, C., Sun, G., Talati, R. K., Manley, N. C., Li, X., Zhao, H., Lyons, D. M., Zhou, Q. Y., Steinberg, G. K., and Sapolsky, R. M. (2012). Prokineticin 2 is an endangering mediator of cerebral ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(14), 5475-80.

- Cheung, P. Y., Barrington, K. J., Pearson, R. J., Bigam, D. L., Finer, N. N., and Van Aerde, J. E. (1997). Systemic, pulmonary and mesenteric perfusion and oxygenation effects of dopamine and epinephrine. *Am J Respir Crit Care Med* **155**(1), 32-7.
- Chien, K. R., Zhu, H., Knowlton, K. U., Miller-Hance, W., van-Bilsen, M., O'Brien, T. X., and Evans, S. M. (1993). Transcriptional regulation during cardiac growth and development. *Annu Rev Physiol* **55**, 77-95.
- Christ, T., Molenaar, P., Klenowski, P. M., Ravens, U., and Kaumann, A. J. (2011). Human atrial beta(1L)-adrenoceptor but not beta(3)-adrenoceptor activation increases force and Ca(2+) current at physiological temperature. *Br J Pharmacol* **162**(4), 823-39.
- Christensen, G. L., Knudsen, S., Schneider, M., Aplin, M., Gammeltoft, S., Sheikh, S. P., and Hansen, J. L. (2011). AT(1) receptor Galphaq protein-independent signalling transcriptionally activates only a few genes directly, but robustly potentiates gene regulation from the beta2-adrenergic receptor. *Mol Cell Endocrinol* **331**(1), 49-56.
- Christoffels, V. M., Mommersteeg, M. T., Trowe, M. O., Prall, O. W., de Gier-de Vries, C., Soufan, A. T., Bussen, M., Schuster-Gossler, K., Harvey, R. P., Moorman, A. F., and Kispert, A. (2006). Formation of the venous pole of the heart from an Nkx2-5-negative precursor population requires Tbx18. *Circ Res* **98**(12), 1555-63.
- Chruscinski, A. J., Rohrer, D. K., Schauble, E., Desai, K. H., Bernstein, D., and Kobilka, B. K. (1999). Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene. *J Biol Chem* **274**(24), 16694-700.
- Clapham, D. E., and Neer, E. J. (1997). G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**, 167-203.
- Cleutjens, J. P., and Creemers, E. E. (2002). Integration of concepts: cardiac extracellular matrix remodeling after myocardial infarction. *J Card Fail* **8**(6 Suppl), S344-8.
- Cohn, J. N., Ferrari, R., and Sharpe, N. (2000). Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* **35**(3), 569-82.
- Cole, L. W., Sidis, Y., Zhang, C., Quinton, R., Plummer, L., Pignatelli, D., Hughes, V. A., Dwyer, A. A., Raivio, T., Hayes, F. J., Seminara, S. B., Huot, C., Alos, N., Speiser, P., Takeshita, A., Van Vliet, G., Pearce, S., Crowley, W. F., Jr., Zhou, Q. Y., and Pitteloud, N. (2008). Mutations in prokineticin 2 and prokineticin receptor 2 genes in human gonadotrophin-releasing hormone deficiency: molecular genetics and clinical spectrum. *J Clin Endocrinol Metab* **93**(9), 3551-9.
- Combs, M. D., Braitsch, C. M., Lange, A. W., James, J. F., and Yutzey, K. E. (2011). NFATC1 promotes epicardium-derived cell invasion into myocardium. *Development* **138**(9), 1747-57.
- Communal, C., Singh, K., Pimentel, D. R., and Colucci, W. S. (1998). Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. *Circulation* **98**(13), 1329-34.
- Compton, L. A., Potash, D. A., Brown, C. B., and Barnett, J. V. (2007). Coronary vessel development is dependent on the type III transforming growth factor beta receptor. *Circ Res* **101**(8), 784-91.
- Conklin, B. R., and Bourne, H. R. (1993). Structural elements of G alpha subunits that interact with G beta gamma, receptors, and effectors. *Cell* **73**(4), 631-41.
- Conn, P. J., and Pin, J. P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**, 205-37.
- Cook, I. H., Evans, J., Maldonado-Perez, D., Critchley, H. O., Sales, K. J., and Jabbour, H. N. (2010). Prokineticin-1 (PROK1) modulates interleukin (IL)-11 expression via

- prokineticin receptor 1 (PROKR1) and the calcineurin/NFAT signalling pathway. *Mol Hum Reprod* **16**(3), 158-69.
- Corcione, A., Ottonello, L., Tortolina, G., Facchetti, P., Airoidi, I., Guglielmino, R., Dadati, P., Truini, M., Sozzani, S., Dallegri, F., and Pistoia, V. (2000). Stromal cell-derived factor-1 as a chemoattractant for follicular center lymphoma B cells. *J Natl Cancer Inst* **92**(8), 628-35.
- Corde, S., Mebazaa, A., Gandolfini, M. P., Fitting, C., Marotte, F., Peynet, J., Charlemagne, D., Cavaillon, J. M., Payen, D., Rappaport, L., and Samuel, J. L. (1997). Trophic effect of human pericardial fluid on adult cardiac myocytes. Differential role of fibroblast growth factor-2 and factors related to ventricular hypertrophy. *Circ Res* **81**(5), 679-87.
- Cui, S., Schwartz, L., and Quaggin, S. E. (2003). Pod1 is required in stromal cells for glomerulogenesis. *Dev Dyn* **226**(3), 512-22.
- Curran, J., Brown, K. H., Santiago, D. J., Pogwizd, S., Bers, D. M., and Shannon, T. R. (2010). Spontaneous Ca waves in ventricular myocytes from failing hearts depend on Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II. *J Mol Cell Cardiol* **49**(1), 25-32.
- Daaka, Y., Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J. (1997). Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**(6655), 88-91.
- Davis, B., Dei Cas, A., Long, D. A., White, K. E., Hayward, A., Ku, C. H., Woolf, A. S., Bilous, R., Viberti, G., and Gnudi, L. (2007). Podocyte-specific expression of angiopoietin-2 causes proteinuria and apoptosis of glomerular endothelia. *J Am Soc Nephrol* **18**(8), 2320-9.
- De Felice, M., Melchiorri, P., Ossipov, M. H., Vanderah, T. W., Porreca, F., and Negri, L. (2012). Mechanisms of Bv8-induced biphasic hyperalgesia: Increased excitatory transmitter release and expression. *Neurosci Lett* **521**(1), 40-5.
- De, P., Roy, S. G., Kar, D., and Bandyopadhyay, A. (2011). Excess of glucocorticoid induces myocardial remodeling and alteration of calcium signaling in cardiomyocytes. *J Endocrinol* **209**(1), 105-14.
- de Peppo, G. M., Svensson, S., Lenneras, M., Synnergren, J., Stenberg, J., Strehl, R., Hyllner, J., Thomsen, P., and Karlsson, C. (2010). Human embryonic mesodermal progenitors highly resemble human mesenchymal stem cells and display high potential for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part A* **16**(7), 2161-82.
- DeGeorge, B. R., Jr., Gao, E., Boucher, M., Vinge, L. E., Martini, J. S., Raake, P. W., Chuprun, J. K., Harris, D. M., Kim, G. W., Soltys, S., Eckhart, A. D., and Koch, W. J. (2008). Targeted inhibition of cardiomyocyte Gi signaling enhances susceptibility to apoptotic cell death in response to ischemic stress. *Circulation* **117**(11), 1378-87.
- Dehaan, R. L. (1964). Cell Interactions and Oriented Movements during Development. *J Exp Zool* **157**, 127-38.
- del Monte, G., Casanova, J. C., Guadix, J. A., MacGrogan, D., Burch, J. B., Perez-Pomares, J. M., and de la Pompa, J. L. (2011). Differential Notch signaling in the epicardium is required for cardiac inflow development and coronary vessel morphogenesis. *Circ Res* **108**(7), 824-36.
- DeRuiter, M. C., Poelmann, R. E., VanderPlas-de Vries, I., Mentink, M. M., and Gittenberger-de Groot, A. C. (1992). The development of the myocardium and endocardium in mouse embryos. Fusion of two heart tubes? *Anat Embryol (Berl)* **185**(5), 461-73.
- Deswal, A., Petersen, N. J., Feldman, A. M., Young, J. B., White, B. G., and Mann, D. L. (2001). Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation* **103**(16), 2055-9.

- Dettman, R. W., Denetclaw, W., Jr., Ordahl, C. P., and Bristow, J. (1998). Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart. *Dev Biol* **193**(2), 169-81.
- Devaux, Y., Bousquenaud, M., Rodius, S., Marie, P. Y., Maskali, F., Zhang, L., Azuaje, F., and Wagner, D. R. (2011). Transforming growth factor beta receptor 1 is a new candidate prognostic biomarker after acute myocardial infarction. *BMC Med Genomics* **4**, 83.
- DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J., and Shenoy, S. K. (2007). Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol* **69**, 483-510.
- DeWire, S. M., Kim, J., Whalen, E. J., Ahn, S., Chen, M., and Lefkowitz, R. J. (2008). Beta-arrestin-mediated signaling regulates protein synthesis. *J Biol Chem* **283**(16), 10611-20.
- Dode, C., Teixeira, L., Levilliers, J., Fouveaut, C., Bouchard, P., Kottler, M. L., Lespinasse, J., Lienhardt-Roussie, A., Mathieu, M., Moerman, A., Morgan, G., Murat, A., Toubanc, J. E., Wolczynski, S., Delpech, M., Petit, C., Young, J., and Hardelin, J. P. (2006). Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet* **2**(10), e175.
- Dohlman, H. G., Thorner, J., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1991). Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* **60**, 653-88.
- Donato, M., and Gelpi, R. J. (2003). Adenosine and cardioprotection during reperfusion--an overview. *Mol Cell Biochem* **251**(1-2), 153-9.
- Dong, H., Wang, Q., Zhang, Y., Jiang, B., Xu, X., and Zhang, Z. (2009). Angiogenesis induced by hVEGF165 gene controlled by hypoxic response elements in rabbit ischemia myocardium. *Exp Biol Med (Maywood)* **234**(12), 1417-24.
- Dorn, G. W., 2nd, and Force, T. (2005). Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* **115**(3), 527-37.
- Dorsch, M., Qiu, Y., Soler, D., Frank, N., Duong, T., Goodearl, A., O'Neil, S., Lora, J., and Fraser, C. C. (2005). PK1/EG-VEGF induces monocyte differentiation and activation. *J Leukoc Biol* **78**(2), 426-34.
- Duan, J., Gherghe, C., Liu, D., Hamlett, E., Srikantha, L., Rodgers, L., Regan, J. N., Rojas, M., Willis, M., Leask, A., Majesky, M., and Deb, A. (2012). Wnt1/betacatenin injury response activates the epicardium and cardiac fibroblasts to promote cardiac repair. *EMBO J* **31**(2), 429-42.
- Duffield, J. S., and Bonventre, J. V. (2005). Kidney tubular epithelium is restored without replacement with bone marrow-derived cells during repair after ischemic injury. *Kidney Int* **68**(5), 1956-61.
- Duncan, J. G., Bharadwaj, K. G., Fong, J. L., Mitra, R., Sambandam, N., Courtois, M. R., Lavine, K. J., Goldberg, I. J., and Kelly, D. P. (2010). Rescue of cardiomyopathy in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha transgenic mice by deletion of lipoprotein lipase identifies sources of cardiac lipids and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators. *Circulation* **121**(3), 426-35.
- Dweck, D., Reynaldo, D. P., Pinto, J. R., and Potter, J. D. (2010). A dilated cardiomyopathy troponin C mutation lowers contractile force by reducing strong myosin-actin binding. *J Biol Chem* **285**(23), 17371-9.
- Dzau, V. J., Gibbons, G. H., and Pratt, R. E. (1991). Molecular mechanisms of vascular renin-angiotensin system in myointimal hyperplasia. *Hypertension* **18**(4 Suppl), II100-5.
- Eaton, L. W., Weiss, J. L., Bulkley, B. H., Garrison, J. B., and Weisfeldt, M. L. (1979). Regional cardiac dilatation after acute myocardial infarction: recognition by two-dimensional echocardiography. *N Engl J Med* **300**(2), 57-62.
- Eddy, A. A. (2000). Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol* **15**(3-4), 290-301.

- Eid, H., de Bold, M. L., Chen, J. H., and de Bold, A. J. (1994). Epicardial mesothelial cells synthesize and release endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* **24**(5), 715-20.
- Eid, H., Larson, D. M., Springhorn, J. P., Attawia, M. A., Nayak, R. C., Smith, T. W., and Kelly, R. A. (1992). Role of epicardial mesothelial cells in the modification of phenotype and function of adult rat ventricular myocytes in primary coculture. *Circ Res* **71**(1), 40-50.
- Endo, J., Sano, M., Fujita, J., Hayashida, K., Yuasa, S., Aoyama, N., Takehara, Y., Kato, O., Makino, S., Ogawa, S., and Fukuda, K. (2007). Bone marrow derived cells are involved in the pathogenesis of cardiac hypertrophy in response to pressure overload. *Circulation* **116**(10), 1176-84.
- Engelhardt, S., Hein, L., Wiesmann, F., and Lohse, M. J. (1999). Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12), 7059-64.
- Eralp, I., Lie-Venema, H., Bax, N. A., Wijffels, M. C., Van Der Laarse, A., Deruiter, M. C., Bogers, A. J., Van Den Akker, N. M., Gourdie, R. G., Schalij, M. J., Poelmann, R. E., and Gittenberger-De Groot, A. C. (2006). Epicardium-derived cells are important for correct development of the Purkinje fibers in the avian heart. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **288**(12), 1272-80.
- Erbs, S., Linke, A., Adams, V., Lenk, K., Thiele, H., Diederich, K. W., Emmrich, F., Kluge, R., Kendziorra, K., Sabri, O., Schuler, G., and Hambrecht, R. (2005). Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study. *Circ Res* **97**(8), 756-62.
- Eremina, V., Sood, M., Haigh, J., Nagy, A., Lajoie, G., Ferrara, N., Gerber, H. P., Kikkawa, Y., Miner, J. H., and Quaggin, S. E. (2003). Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest* **111**(5), 707-16.
- Erlebacher, J. A., Weiss, J. L., Eaton, L. W., Kallman, C., Weisfeldt, M. L., and Bulkley, B. H. (1982). Late effects of acute infarct dilation on heart size: a two dimensional echocardiographic study. *Am J Cardiol* **49**(5), 1120-6.
- Ernsberger, P., Zhou, J., Damon, T. H., and Douglas, J. G. (1992). Angiotensin II receptor subtypes in cultured rat renal mesangial cells. *Am J Physiol* **263**(3 Pt 2), F411-6.
- Esposito, G., Perrino, C., Cannavo, A., Schiattarella, G. G., Borgia, F., Sannino, A., Pironti, G., Gargiulo, G., Di Serafino, L., Franzone, A., Scudiero, L., Grieco, P., Indolfi, C., and Chiariello, M. (2011). EGFR trans-activation by urotensin II receptor is mediated by beta-arrestin recruitment and confers cardioprotection in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Basic Res Cardiol* **106**(4), 577-89.
- Evans, J., Catalano, R. D., Brown, P., Sherwin, R., Critchley, H. O., Fazleabas, A. T., and Jabbour, H. N. (2009). Prokineticin 1 mediates fetal-maternal dialogue regulating endometrial leukemia inhibitory factor. *FASEB J* **23**(7), 2165-75.
- Evans, J., Catalano, R. D., Morgan, K., Critchley, H. O., Millar, R. P., and Jabbour, H. N. (2008). Prokineticin 1 signaling and gene regulation in early human pregnancy. *Endocrinology* **149**(6), 2877-87.
- Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**(5819), 154-6.
- Everett, A. W. (1986). Isomyosin expression in human heart in early pre- and post-natal life. *J Mol Cell Cardiol* **18**(6), 607-15.
- Fabiato, A., and Fabiato, F. (1979). Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. *Annu Rev Physiol* **41**, 473-84.

- Fanni, D., Fanos, V., Monga, G., Gerosa, C., Locci, A., Nemolato, S., Van Eyken, P., and Faa, G. (2011). Expression of WT1 during normal human kidney development. *J Matern Fetal Neonatal Med* **24 Suppl 2**, 44-7.
- Fedorova, L. V., Raju, V., El-Okdi, N., Shidyak, A., Kennedy, D. J., Vetteth, S., Giovannucci, D. R., Bagrov, A. Y., Fedorova, O. V., Shapiro, J. I., and Malhotra, D. (2009). The cardiotonic steroid hormone marinobufagenin induces renal fibrosis: implication of epithelial-to-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol* **296**(4), F922-34.
- Felder, C. C., Campbell, T., Albrecht, F., and Jose, P. A. (1990). Dopamine inhibits Na(+)-H+ exchanger activity in renal BBMV by stimulation of adenylate cyclase. *Am J Physiol* **259**(2 Pt 2), F297-303.
- Felder, R. A., Blecher, M., Calcagno, P. L., and Jose, P. A. (1984a). Dopamine receptors in the proximal tubule of the rabbit. *Am J Physiol* **247**(3 Pt 2), F499-505.
- Felder, R. A., Blecher, M., Eisner, G. M., and Jose, P. A. (1984b). Cortical tubular and glomerular dopamine receptors in the rat kidney. *Am J Physiol* **246**(5 Pt 2), F557-68.
- Ferrara, N., Frantz, G., LeCouter, J., Dillard-Telm, L., Pham, T., Draksharapu, A., Giordano, T., and Peale, F. (2003). Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. *Am J Pathol* **162**(6), 1881-93.
- Filtz, T. M., Grubb, D. R., McLeod-Dryden, T. J., Luo, J., and Woodcock, E. A. (2009). Gq-initiated cardiomyocyte hypertrophy is mediated by phospholipase C β 1b. *FASEB J* **23**(10), 3564-70.
- Fisher, D. J., Heymann, M. A., and Rudolph, A. M. (1980). Myocardial oxygen and carbohydrate consumption in fetal lambs in utero and in adult sheep. *Am J Physiol* **238**(3), H399-405.
- Fishman, M. C., and Chien, K. R. (1997). Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions. *Development* **124**(11), 2099-117.
- Flaherty, M. P., Abdel-Latif, A., Li, Q., Hunt, G., Ranjan, S., Ou, Q., Tang, X. L., Johnson, R. K., Bolli, R., and Dawn, B. (2008). Noncanonical Wnt11 signaling is sufficient to induce cardiomyogenic differentiation in unfractionated bone marrow mononuclear cells. *Circulation* **117**(17), 2241-52.
- Fujii, T., Onohara, N., Maruyama, Y., Tanabe, S., Kobayashi, H., Fukutomi, M., Nagamatsu, Y., Nishihara, N., Inoue, R., Sumimoto, H., Shibasaki, F., Nagao, T., Nishida, M., and Kurose, H. (2005). Galpha12/13-mediated production of reactive oxygen species is critical for angiotensin receptor-induced NFAT activation in cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* **280**(24), 23041-7.
- Funk, J. A., and Schnellmann, R. G. (2012). Persistent disruption of mitochondrial homeostasis after acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **302**(7), F853-64.
- Garcia-Ocana, A., De Miguel, F., Penaranda, C., Albar, J. P., Sarasa, J. L., and Esbrit, P. (1995). Parathyroid hormone-related protein is an autocrine modulator of rabbit proximal tubule cell growth. *J Bone Miner Res* **10**(12), 1875-84.
- Garcia-Ocana, A., Galbraith, S. C., Van Why, S. K., Yang, K., Golovyan, L., Dann, P., Zager, R. A., Stewart, A. F., Siegel, N. J., and Orloff, J. J. (1999). Expression and role of parathyroid hormone-related protein in human renal proximal tubule cells during recovery from ATP depletion. *J Am Soc Nephrol* **10**(2), 238-44.
- Gardiner, J. V., Bataveljic, A., Patel, N. A., Bewick, G. A., Roy, D., Campbell, D., Greenwood, H. C., Murphy, K. G., Hameed, S., Jethwa, P. H., Ebling, F. J., Vickers, S. P., Cheetham, S., Ghatei, M. A., Bloom, S. R., and Dhillon, W. S. (2010). Prokineticin 2 is a hypothalamic neuropeptide that potently inhibits food intake. *Diabetes* **59**(2), 397-406.

- Garg, R., and Yusuf, S. (1995). Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure. Collaborative Group on ACE Inhibitor Trials. *JAMA* **273**(18), 1450-6.
- Gaudin, C., Ishikawa, Y., Wight, D. C., Mahdavi, V., Nadal-Ginard, B., Wagner, T. E., Vatner, D. E., and Homcy, C. J. (1995). Overexpression of Gs alpha protein in the hearts of transgenic mice. *J Clin Invest* **95**(4), 1676-83.
- Gerber, H. P., Hillan, K. J., Ryan, A. M., Kowalski, J., Keller, G. A., Rangell, L., Wright, B. D., Radtke, F., Aguet, M., and Ferrara, N. (1999). VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* **126**(6), 1149-59.
- Gerhardt, W., Nordin, G., and Ljungdahl, L. (1999). Can troponin T replace CK MBmass as "gold standard" for acute myocardial infarction ("AMI")? *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **230**, 83-9.
- Giannini, E., Lattanzi, R., Nicotra, A., Campese, A. F., Grazioli, P., Screpanti, I., Balboni, G., Salvadori, S., Sacerdote, P., and Negri, L. (2009). The chemokine Bv8/prokineticin 2 is up-regulated in inflammatory granulocytes and modulates inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(34), 14646-51.
- Giordano, F. J., Gerber, H. P., Williams, S. P., VanBruggen, N., Bunting, S., Ruiz-Lozano, P., Gu, Y., Nath, A. K., Huang, Y., Hickey, R., Dalton, N., Peterson, K. L., Ross, J., Jr., Chien, K. R., and Ferrara, N. (2001). A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(10), 5780-5.
- Gittenberger-de Groot, A. C., Mahtab, E. A., Hahurij, N. D., Wisse, L. J., Deruiter, M. C., Wijffels, M. C., and Poelmann, R. E. (2007). Nkx2.5-negative myocardium of the posterior heart field and its correlation with podoplanin expression in cells from the developing cardiac pacemaking and conduction system. *Anat Rec (Hoboken)* **290**(1), 115-22.
- Gittenberger-de Groot, A. C., Vrancken Peeters, M. P., Bergwerff, M., Mentink, M. M., and Poelmann, R. E. (2000). Epicardial outgrowth inhibition leads to compensatory mesothelial outflow tract collar and abnormal cardiac septation and coronary formation. *Circ Res* **87**(11), 969-71.
- Gittenberger-de Groot, A. C., Vrancken Peeters, M. P., Mentink, M. M., Gourdie, R. G., and Poelmann, R. E. (1998). Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions. *Circ Res* **82**(10), 1043-52.
- Goi, T., Fujioka, M., Satoh, Y., Tabata, S., Koneri, K., Nagano, H., Hirono, Y., Katayama, K., Hirose, K., and Yamaguchi, A. (2004). Angiogenesis and tumor proliferation/metastasis of human colorectal cancer cell line SW620 transfected with endocrine glands-derived-vascular endothelial growth factor, as a new angiogenic factor. *Cancer Res* **64**(6), 1906-10.
- Gomes, P., and Soares-da-Silva, P. (2002). Role of cAMP-PKA-PLC signaling cascade on dopamine-induced PKC-mediated inhibition of renal Na(+)-K(+)-ATPase activity. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**(6), F1084-96.
- Gonzales, C., and Pedrazzini, T. (2009). Progenitor cell therapy for heart disease. *Exp Cell Res* **315**(18), 3077-85.
- Gonzalez-Rosa, J. M., Martin, V., Peralta, M., Torres, M., and Mercader, N. (2011). Extensive scar formation and regression during heart regeneration after cryoinjury in zebrafish. *Development* **138**(9), 1663-74.
- Goodall, M. H., Wardlow, R. D., 2nd, Goldblum, R. R., Ziman, A., Lederer, W. J., Randall, W., and Rogers, T. B. (2010). Novel function of cardiac protein kinase D1 as a dynamic regulator of Ca²⁺ sensitivity of contraction. *J Biol Chem* **285**(53), 41686-700.

- Gorowiec, M. R., Catalano, R. D., Norman, J. E., Denison, F. C., and Jabbour, H. N. (2011). Prokineticin 1 induces inflammatory response in human myometrium: a potential role in initiating term and preterm parturition. *Am J Pathol* **179**(6), 2709-19.
- Gottlieb, R. A., Burleson, K. O., Kloner, R. A., Babior, B. M., and Engler, R. L. (1994). Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* **94**(4), 1621-8.
- Gourdie, R. G., Harris, B. S., Bond, J., Justus, C., Hewett, K. W., O'Brien, T. X., Thompson, R. P., and Sedmera, D. (2003). Development of the cardiac pacemaking and conduction system. *Birth Defects Res C Embryo Today* **69**(1), 46-57.
- Griffin, S. A., Brown, W. C., MacPherson, F., McGrath, J. C., Wilson, V. G., Korsgaard, N., Mulvany, M. J., and Lever, A. F. (1991). Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension* **17**(5), 626-35.
- Grobstein, C. (1955). Tissue disaggregation in relation to determination and stability of cell type. *Ann N Y Acad Sci* **60**(7), 1095-107.
- Gruber, P. J., Kubalak, S. W., Pexieder, T., Sucov, H. M., Evans, R. M., and Chien, K. R. (1996). RXR alpha deficiency confers genetic susceptibility for aortic sac, conotruncal, atrioventricular cushion, and ventricular muscle defects in mice. *J Clin Invest* **98**(6), 1332-43.
- Guadix, J. A., Carmona, R., Munoz-Chapuli, R., and Perez-Pomares, J. M. (2006). In vivo and in vitro analysis of the vasculogenic potential of avian proepicardial and epicardial cells. *Dev Dyn* **235**(4), 1014-26.
- Guadix, J. A., Ruiz-Villalba, A., Lettice, L., Velecela, V., Munoz-Chapuli, R., Hastie, N. D., Perez-Pomares, J. M., and Martinez-Estrada, O. M. (2011). Wt1 controls retinoic acid signalling in embryonic epicardium through transcriptional activation of Raldh2. *Development* **138**(6), 1093-7.
- Guilini, C., Urayama, K., Turkeri, G., Dedeoglu, D. B., Kurose, H., Messaddeq, N., and Nebigil, C. G. (2010). Divergent roles of prokineticin receptors in the endothelial cells: angiogenesis and fenestration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**(3), H844-52.
- Haase, V. H. (2009). Oxygen regulates epithelial-to-mesenchymal transition: insights into molecular mechanisms and relevance to disease. *Kidney Int* **76**(5), 492-9.
- Hahn, H. S., Marreez, Y., Odley, A., Sterbling, A., Yussman, M. G., Hilty, K. C., Bodi, I., Liggett, S. B., Schwartz, A., and Dorn, G. W., 2nd (2003). Protein kinase Calpha negatively regulates systolic and diastolic function in pathological hypertrophy. *Circ Res* **93**(11), 1111-9.
- Hall, C. E., Hurtado, R., Hewett, K. W., Shulimovich, M., Poma, C. P., Reckova, M., Justus, C., Pennisi, D. J., Tobita, K., Sedmera, D., Gourdie, R. G., and Mikawa, T. (2004). Hemodynamic-dependent patterning of endothelin converting enzyme 1 expression and differentiation of impulse-conducting Purkinje fibers in the embryonic heart. *Development* **131**(3), 581-92.
- Hall, P. A., and Watt, F. M. (1989). Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* **106**(4), 619-33.
- Hamacher-Brady, A., Brady, N. R., and Gottlieb, R. A. (2006). The interplay between pro-death and pro-survival signaling pathways in myocardial ischemia/reperfusion injury: apoptosis meets autophagy. *Cardiovasc Drugs Ther* **20**(6), 445-62.
- Han, J. Y., Heo, J. S., Lee, Y. J., Lee, J. H., Taub, M., and Han, H. J. (2007). Dopamine stimulates 45Ca^{2+} uptake through cAMP, PLC/PKC, and MAPKs in renal proximal tubule cells. *J Cell Physiol* **211**(2), 486-94.
- Harada, K., Komuro, I., Shiojima, I., Hayashi, D., Kudoh, S., Mizuno, T., Kijima, K., Matsubara, H., Sugaya, T., Murakami, K., and Yazaki, Y. (1998a). Pressure overload

- induces cardiac hypertrophy in angiotensin II type 1A receptor knockout mice. *Circulation* **97**(19), 1952-9.
- Harada, K., Komuro, I., Zou, Y., Kudoh, S., Kijima, K., Matsubara, H., Sugaya, T., Murakami, K., and Yazaki, Y. (1998b). Acute pressure overload could induce hypertrophic responses in the heart of angiotensin II type 1a knockout mice. *Circ Res* **82**(7), 779-85.
- Harada, K., Sugaya, T., Murakami, K., Yazaki, Y., and Komuro, I. (1999). Angiotensin II type 1A receptor knockout mice display less left ventricular remodeling and improved survival after myocardial infarction. *Circulation* **100**(20), 2093-9.
- Hashimoto, E., Ogita, T., Nakaoka, T., Matsuoka, R., Takao, A., and Kira, Y. (1994). Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart. *Am J Physiol* **267**(5 Pt 2), H1948-54.
- Hatcher, C. J., Diman, N. Y., Kim, M. S., Pennisi, D., Song, Y., Goldstein, M. M., Mikawa, T., and Basson, C. T. (2004). A role for Tbx5 in proepicardial cell migration during cardiogenesis. *Physiol Genomics* **18**(2), 129-40.
- Hatini, V., Huh, S. O., Herzlinger, D., Soares, V. C., and Lai, E. (1996). Essential role of stromal mesenchyme in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of Winged Helix transcription factor BF-2. *Genes Dev* **10**(12), 1467-78.
- Haudek, S. B., Xia, Y., Huebener, P., Lee, J. M., Carlson, S., Crawford, J. R., Pilling, D., Gomer, R. H., Trial, J., Frangogiannis, N. G., and Entman, M. L. (2006). Bone marrow-derived fibroblast precursors mediate ischemic cardiomyopathy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(48), 18284-9.
- He, J. Q., Ma, Y., Lee, Y., Thomson, J. A., and Kamp, T. J. (2003). Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res* **93**(1), 32-9.
- Hebert, R. L., Jacobson, H. R., and Breyer, M. D. (1991). Prostaglandin E2 inhibits sodium transport in rabbit cortical collecting duct by increasing intracellular calcium. *J Clin Invest* **87**(6), 1992-8.
- Heineke, J., Auger-Messier, M., Xu, J., Oka, T., Sargent, M. A., York, A., Klevitsky, R., Vaikunth, S., Duncan, S. A., Aronow, B. J., Robbins, J., Crombleholme, T. M., and Molkentin, J. D. (2007). Cardiomyocyte GATA4 functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in the murine heart. *J Clin Invest* **117**(11), 3198-210.
- Hellstrom, M., Kalen, M., Lindahl, P., Abramsson, A., and Betsholtz, C. (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* **126**(14), 3047-55.
- Hendrikx, M., Hensen, K., Clijsters, C., Jongen, H., Koninckx, R., Bijmens, E., Ingels, M., Jacobs, A., Geukens, R., Dendale, P., Vijgen, J., Dilling, D., Steels, P., Mees, U., and Rummens, J. L. (2006). Recovery of regional but not global contractile function by the direct intramyocardial autologous bone marrow transplantation: results from a randomized controlled clinical trial. *Circulation* **114**(1 Suppl), I101-7.
- Heymans S, L. A., Nuyens D, et al. (1999). Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med* **5**(10), 1135-1142.
- Hidai, H., Bardales, R., Goodwin, R., Quertermous, T., and Quertermous, E. E. (1998). Cloning of capsulin, a basic helix-loop-helix factor expressed in progenitor cells of the pericardium and the coronary arteries. *Mech Dev* **73**(1), 33-43.
- Hirakow, R. (1983). Development of the cardiac blood vessels in staged human embryos. *Acta Anat (Basel)* **115**(3), 220-30.

- Hiruma, T., and Hirakow, R. (1989). Epicardial formation in embryonic chick heart: computer-aided reconstruction, scanning, and transmission electron microscopic studies. *Am J Anat* **184**(2), 129-38.
- Ho, E., and Shimada, Y. (1978). Formation of the epicardium studied with the scanning electron microscope. *Dev Biol* **66**(2), 579-85.
- Hoffmann, P., Feige, J. J., and Alfaidy, N. (2006). Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy. *Endocrinology* **147**(4), 1675-84.
- Hoffmann, P., Feige, J. J., and Alfaidy, N. (2007). Placental expression of EG-VEGF and its receptors PKR1 (prokineticin receptor-1) and PKR2 throughout mouse gestation. *Placenta* **28**(10), 1049-58.
- Horbelt, M., Lee, S. Y., Mang, H. E., Knipe, N. L., Sado, Y., Kribben, A., and Sutton, T. A. (2007). Acute and chronic microvascular alterations in a mouse model of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **293**(3), F688-95.
- Hsieh, P. C., Segers, V. F., Davis, M. E., MacGillivray, C., Gannon, J., Molkentin, J. D., Robbins, J., and Lee, R. T. (2007). Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med* **13**(8), 970-4.
- Hu, W. P., Li, J. D., Zhang, C., Boehmer, L., Siegel, J. M., and Zhou, Q. Y. (2007). Altered circadian and homeostatic sleep regulation in prokineticin 2-deficient mice. *Sleep* **30**(3), 247-56.
- Huang, Y., Hickey, R. P., Yeh, J. L., Liu, D., Dadak, A., Young, L. H., Johnson, R. S., and Giordano, F. J. (2004). Cardiac myocyte-specific HIF-1alpha deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart. *FASEB J* **18**(10), 1138-40.
- Hui Stickley S., B. E. D., Goldstein S.L. (2005). Pediatric ARF epidemiology at a tertiary care center from 1999 to 2001 *Am. J. Kidney Dis* **45**, 96-101.
- Huke, S., Desantiago, J., Kaetzel, M. A., Mishra, S., Brown, J. H., Dedman, J. R., and Bers, D. M. (2011). SR-targeted CaMKII inhibition improves SR Ca(2)+ handling, but accelerates cardiac remodeling in mice overexpressing CaMKIIdeltaC. *J Mol Cell Cardiol* **50**(1), 230-8.
- Hussain, T., Abdul-Wahab, R., and Lokhandwala, M. F. (1997). Bromocriptine stimulates Na⁺, K⁺-ATPase in renal proximal tubules via the cAMP pathway. *Eur J Pharmacol* **321**(2), 259-63.
- Hwang, Y. S., Polak, J. M., and Mantalaris, A. (2008). In vitro direct osteogenesis of murine embryonic stem cells without embryoid body formation. *Stem Cells Dev* **17**(5), 963-70.
- Hyer, J., Johansen, M., Prasad, A., Wessels, A., Kirby, M. L., Gourdie, R. G., and Mikawa, T. (1999). Induction of Purkinje fiber differentiation by coronary arterialization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(23), 13214-8.
- Icardo, J. M. (1989). Changes in endocardial cell morphology during development of the endocardial cushions. *Anat Embryol (Berl)* **179**(5), 443-8.
- Ijpenberg, A., Perez-Pomares, J. M., Guadix, J. A., Carmona, R., Portillo-Sanchez, V., Macias, D., Hohenstein, P., Miles, C. M., Hastie, N. D., and Munoz-Chapuli, R. (2007). Wt1 and retinoic acid signaling are essential for stellate cell development and liver morphogenesis. *Dev Biol* **312**(1), 157-70.
- Imanishi, T., Moriwaki, C., Hano, T., and Nishio, I. (2005). Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental hypertensive rats and patients with essential hypertension. *J Hypertens* **23**(10), 1831-7.

- Inagaki, K., Chen, L., Ikeno, F., Lee, F. H., Imahashi, K., Bouley, D. M., Rezaee, M., Yock, P. G., Murphy, E., and Mochly-Rosen, D. (2003). Inhibition of delta-protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo. *Circulation* **108**(19), 2304-7.
- Inagaki, K., Churchill, E., and Mochly-Rosen, D. (2006). Epsilon protein kinase C as a potential therapeutic target for the ischemic heart. *Cardiovasc Res* **70**(2), 222-30.
- Ingves, M. V., and Ferguson, A. V. (2010). Prokineticin 2 modulates the excitability of area postrema neurons in vitro in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **298**(3), R617-26.
- Ishii, Y., Garriock, R. J., Navetta, A. M., Coughlin, L. E., and Mikawa, T. (2010). BMP signals promote proepicardial protrusion necessary for recruitment of coronary vessel and epicardial progenitors to the heart. *Dev Cell* **19**(2), 307-16.
- Iwase, M., Bishop, S. P., Uechi, M., Vatner, D. E., Shannon, R. P., Kudej, R. K., Wight, D. C., Wagner, T. E., Ishikawa, Y., Homcy, C. J., and Vatner, S. F. (1996). Adverse effects of chronic endogenous sympathetic drive induced by cardiac GS alpha overexpression. *Circ Res* **78**(4), 517-24.
- Izumo, S., Lompre, A. M., Matsuoka, R., Koren, G., Schwartz, K., Nadal-Ginard, B., and Mahdavi, V. (1987). Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. *J Clin Invest* **79**(3), 970-7.
- James, D., Nam, H. S., Seandel, M., Nolan, D., Janovitz, T., Tomishima, M., Studer, L., Lee, G., Lyden, D., Benezra, R., Zaninovic, N., Rosenwaks, Z., Rabbany, S. Y., and Rafii, S. (2010). Expansion and maintenance of human embryonic stem cell-derived endothelial cells by TGFbeta inhibition is Id1 dependent. *Nat Biotechnol* **28**(2), 161-6.
- James, L. R., Ingram, A., Ly, H., Thai, K., Cai, L., and Scholey, J. W. (2001). Angiotensin II activates the GFAT promoter in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **281**(1), F151-62.
- Jenkins, S. J., Hutson, D. R., and Kubalak, S. W. (2005). Analysis of the proepicardium-epicardium transition during the malformation of the RXRalpha-/- epicardium. *Dev Dyn* **233**(3), 1091-101.
- Jennings, R. B., Sommers, H. M., Smyth, G. A., Flack, H. A., and Linn, H. (1960). Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol* **70**, 68-78.
- Jhun, B. S., J, O. U., Wang, W., Ha, C. H., Zhao, J., Kim, J. Y., Wong, C., Dirksen, R. T., Lopes, C. M., and Jin, Z. G. (2012). Adrenergic signaling controls RSK-dependent trafficking of cardiac voltage-gated L-type Ca²⁺ channels through PKD1. *Circ Res* **110**(1), 59-70.
- Jiang, B., and Liao, R. (2010). The paradoxical role of inflammation in cardiac repair and regeneration. *J Cardiovasc Transl Res* **3**(4), 410-6.
- Jimenez-Navarro, M. F., Gonzalez, F. J., Caballero-Borrego, J., Marchal, J. A., Rodriguez-Losada, N., Carrillo, E., Garcia-Pinilla, J. M., Hernandez-Garcia, J. M., Perez-Gonzalez, R., Ramirez, G., Aranega, A., and de Teresa Galvan, E. (2011). [Coronary disease extension determines mobilization of endothelial progenitor cells and cytokines after a first myocardial infarction with ST elevation]. *Rev Esp Cardiol* **64**(12), 1123-9.
- Jong, P., Demers, C., McKelvie, R. S., and Liu, P. P. (2002). Angiotensin receptor blockers in heart failure: meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Coll Cardiol* **39**(3), 463-70.

- Joubert, F. J., and Strydom, D. J. (1980). Snake venom. The amino acid sequence of protein A from *Dendroaspis polylepis polylepis* (black mamba) venom. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **361**(12), 1787-94.
- Jujo, K., Ii, M., and Losordo, D. W. (2008). Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* **45**(4), 530-44.
- Kajstura, J., Cheng, W., Reiss, K., Clark, W. A., Sonnenblick, E. H., Krajewski, S., Reed, J. C., Olivetti, G., and Anversa, P. (1996a). Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* **74**(1), 86-107.
- Kajstura, J., Cheng, W., Sarangarajan, R., Li, P., Li, B., Nitahara, J. A., Chapnick, S., Reiss, K., Olivetti, G., and Anversa, P. (1996b). Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats. *Am J Physiol* **271**(3 Pt 2), H1215-28.
- Kajstura, J., Rota, M., Whang, B., Cascapera, S., Hosoda, T., Bearzi, C., Nurzynska, D., Kasahara, H., Zias, E., Bonafe, M., Nadal-Ginard, B., Torella, D., Nascimbene, A., Quaini, F., Urbanek, K., Leri, A., and Anversa, P. (2005). Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res* **96**(1), 127-37.
- Kang, D. H., Anderson, S., Kim, Y. G., Mazzalli, M., Suga, S., Jefferson, J. A., Gordon, K. L., Oyama, T. T., Hughes, J., Hugo, C., Kerjaschki, D., Schreiner, G. F., and Johnson, R. J. (2001a). Impaired angiogenesis in the aging kidney: vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease. *Am J Kidney Dis* **37**(3), 601-11.
- Kang, D. H., Hughes, J., Mazzali, M., Schreiner, G. F., and Johnson, R. J. (2001b). Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: II. Vascular endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. *J Am Soc Nephrol* **12**(7), 1448-57.
- Kang, H. J., Lee, H. Y., Na, S. H., Chang, S. A., Park, K. W., Kim, H. K., Kim, S. Y., Chang, H. J., Lee, W., Kang, W. J., Koo, B. K., Kim, Y. J., Lee, D. S., Sohn, D. W., Han, K. S., Oh, B. H., Park, Y. B., and Kim, H. S. (2006). Differential effect of intracoronary infusion of mobilized peripheral blood stem cells by granulocyte colony-stimulating factor on left ventricular function and remodeling in patients with acute myocardial infarction versus old myocardial infarction: the MAGIC Cell-3-DES randomized, controlled trial. *Circulation* **114**(1 Suppl), I145-51.
- Kania, G., Blyszczuk, P., and Eriksson, U. (2009). Mechanisms of cardiac fibrosis in inflammatory heart disease. *Trends Cardiovasc Med* **19**(8), 247-52.
- Kantele, J. M., Kurk, S., and Jutila, M. A. (2000). Effects of continuous exposure to stromal cell-derived factor-1 alpha on T cell rolling and tight adhesion to monolayers of activated endothelial cells. *J Immunol* **164**(10), 5035-40.
- Kaser, A., Winklmayr, M., Lepperdinger, G., and Kreil, G. (2003). The AVIT protein family. Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions. *EMBO Rep* **4**(5), 469-73.
- Kastner, P., Grondona, J. M., Mark, M., Gansmuller, A., LeMeur, M., Decimo, D., Vonesch, J. L., Dolle, P., and Chambon, P. (1994). Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* **78**(6), 987-1003.
- Kattan, J., Dettman, R. W., and Bristow, J. (2004). Formation and remodeling of the coronary vascular bed in the embryonic avian heart. *Dev Dyn* **230**(1), 34-43.
- Katus, H. A., Remppis, A., Neumann, F. J., Scheffold, T., Diederich, K. W., Vinar, G., Noe, A., Matern, G., and Kuebler, W. (1991). Diagnostic efficiency of troponin T measurements in acute myocardial infarction. *Circulation* **83**(3), 902-12.

- Katz, T. C., Singh, M. K., Degenhardt, K., Rivera-Feliciano, J., Johnson, R. L., Epstein, J. A., and Tabin, C. J. (2012). Distinct compartments of the proepicardial organ give rise to coronary vascular endothelial cells. *Dev Cell* **22**(3), 639-50.
- Kaufman, M. H., and Navaratnam, V. (1981). Early differentiation of the heart in mouse embryos. *J Anat* **133**(Pt 2), 235-46.
- Kaupmann, K., Huggel, K., Heid, J., Flor, P. J., Bischoff, S., Mickel, S. J., McMaster, G., Angst, C., Bittiger, H., Froestl, W., and Bettler, B. (1997). Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* **386**(6622), 239-46.
- Kawamoto, A., Tkebuchava, T., Yamaguchi, J., Nishimura, H., Yoon, Y. S., Milliken, C., Uchida, S., Masuo, O., Iwaguro, H., Ma, H., Hanley, A., Silver, M., Kearney, M., Losordo, D. W., Isner, J. M., and Asahara, T. (2003). Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* **107**(3), 461-8.
- Kehat, I., Davis, J., Tiburcy, M., Accornero, F., Saba-El-Leil, M. K., Maillet, M., York, A. J., Lorenz, J. N., Zimmermann, W. H., Meloche, S., and Molkentin, J. D. (2011). Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 regulate the balance between eccentric and concentric cardiac growth. *Circ Res* **108**(2), 176-83.
- Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J., and Gepstein, L. (2001). Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* **108**(3), 407-14.
- Kehat, I., and Molkentin, J. D. (2010). Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation* **122**(25), 2727-35.
- Kelly, D. P., Hale, D. E., Rutledge, S. L., Ogden, M. L., Whelan, A. J., Zhang, Z., and Strauss, A. W. (1992). Molecular basis of inherited medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency causing sudden child death. *J Inherit Metab Dis* **15**(2), 171-80.
- Kennea, N. L., and Mehmet, H. (2002). Neural stem cells. *J Pathol* **197**(4), 536-50.
- Khundmiri, S. J., Ameen, M., Delamere, N. A., and Lederer, E. D. (2008). PTH-mediated regulation of Na⁺-K⁺-ATPase requires Src kinase-dependent ERK phosphorylation. *Am J Physiol Renal Physiol* **295**(2), F426-37.
- Khundmiri, S. J., Bertorello, A. M., Delamere, N. A., and Lederer, E. D. (2004). Clathrin-mediated endocytosis of Na⁺,K⁺-ATPase in response to parathyroid hormone requires ERK-dependent phosphorylation of Ser-11 within the alpha1-subunit. *J Biol Chem* **279**(17), 17418-27.
- Khundmiri, S. J., Dean, W. L., McLeish, K. R., and Lederer, E. D. (2005). Parathyroid hormone-mediated regulation of Na⁺-K⁺-ATPase requires ERK-dependent translocation of protein kinase Calpha. *J Biol Chem* **280**(10), 8705-13.
- Khundmiri, S. J., and Lederer, E. (2002). PTH and DA regulate Na-K ATPase through divergent pathways. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**(3), F512-22.
- Kikuchi, K., Gupta, V., Wang, J., Holdway, J. E., Wills, A. A., Fang, Y., and Poss, K. D. (2011a). tcf21⁺ epicardial cells adopt non-myocardial fates during zebrafish heart development and regeneration. *Development* **138**(14), 2895-902.
- Kikuchi, K., Holdway, J. E., Major, R. J., Blum, N., Dahn, R. D., Begemann, G., and Poss, K. D. (2011b). Retinoic acid production by endocardium and epicardium is an injury response essential for zebrafish heart regeneration. *Dev Cell* **20**(3), 397-404.
- Kikuchi, K., Holdway, J. E., Werdich, A. A., Anderson, R. M., Fang, Y., Egnaczyk, G. F., Evans, T., Macrae, C. A., Stainier, D. Y., and Poss, K. D. (2010). Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes. *Nature* **464**(7288), 601-5.

- Kim, J., Ahn, S., Rajagopal, K., and Lefkowitz, R. J. (2009a). Independent beta-arrestin2 and Gq/protein kinase C pathways for ERK stimulated by angiotensin type 1A receptors in vascular smooth muscle cells converge on transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **284**(18), 11953-62.
- Kim, J., Wu, Q., Zhang, Y., Wiens, K. M., Huang, Y., Rubin, N., Shimada, H., Handin, R. I., Chao, M. Y., Tuan, T. L., Starnes, V. A., and Lien, C. L. (2010). PDGF signaling is required for epicardial function and blood vessel formation in regenerating zebrafish hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(40), 17206-10.
- Kim, Y. S., Park, H. J., Hong, M. H., Kang, P. M., Morgan, J. P., Jeong, M. H., Cho, J. G., Park, J. C., and Ahn, Y. (2009b). TNF-alpha enhances engraftment of mesenchymal stem cells into infarcted myocardium. *Front Biosci* **14**, 2845-56.
- Kinoshita, S., Ohlstein, E. H., and Felder, R. A. (1990). Dopamine-1 receptors in rat proximal convoluted tubule: regulation by intrarenal dopamine. *Am J Physiol* **258**(4 Pt 2), F1068-74.
- Kishi, T., Kitajima, T., Tsunoka, T., Okumura, T., Ikeda, M., Okochi, T., Kinoshita, Y., Kawashima, K., Yamanouchi, Y., Ozaki, N., and Iwata, N. (2009). Possible association of prokineticin 2 receptor gene (PROKR2) with mood disorders in the Japanese population. *Neuromolecular Med* **11**(2), 114-22.
- Kisliouk, T., Friedman, A., Klipper, E., Zhou, Q. Y., Schams, D., Alfaidy, N., and Meidan, R. (2007). Expression pattern of prokineticin 1 and its receptors in bovine ovaries during the estrous cycle: involvement in corpus luteum regression and follicular atresia. *Biol Reprod* **76**(5), 749-58.
- Kisliouk, T., Podlovni, H., and Meidan, R. (2005). Unique expression and regulatory mechanisms of EG-VEGF/prokineticin-1 and its receptors in the corpus luteum. *Ann Anat* **187**(5-6), 529-37.
- Kisliouk, T., Podlovni, H., Spanel-Borowski, K., Ovadia, O., Zhou, Q. Y., and Meidan, R. (2005). Prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and BV8) in the bovine ovary: expression and role as mitogens and survival factors for corpus luteum-derived endothelial cells. *Endocrinology* **146**(9), 3950-8.
- Kitamoto, Y., Tokunaga, H., and Tomita, K. (1997). Vascular endothelial growth factor is an essential molecule for mouse kidney development: glomerulogenesis and nephrogenesis. *J Clin Invest* **99**(10), 2351-7.
- Kluge, B., and Fischer, A. (1990). The pronephros of the early ammocoete larva of lampreys (Cyclostomata, Petromyzontes): fine structure of the external glomus. *Cell Tissue Res* **260**, 249-259.
- Kocher, A. A., Schuster, M. D., Szabolcs, M. J., Takuma, S., Burkhoff, D., Wang, J., Homma, S., Edwards, N. M., and Itescu, S. (2001). Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* **7**(4), 430-6.
- Kolditz, D. P., Wijffels, M. C., Blom, N. A., van der Laarse, A., Hahurij, N. D., Lie-Venema, H., Markwald, R. R., Poelmann, R. E., Schalij, M. J., and Gittenberger-de Groot, A. C. (2008). Epicardium-derived cells in development of annulus fibrosis and persistence of accessory pathways. *Circulation* **117**(12), 1508-17.
- Konstam, M. A., Kramer, D. G., Patel, A. R., Maron, M. S., and Udelson, J. E. (2011). Left ventricular remodeling in heart failure: current concepts in clinical significance and assessment. *JACC Cardiovasc Imaging* **4**(1), 98-108.
- Kooij, V., Boontje, N., Zaremba, R., Jaquet, K., dos Remedios, C., Stienen, G. J., and van der Velden, J. (2010). Protein kinase C alpha and epsilon phosphorylation of troponin and myosin binding protein C reduce Ca²⁺ sensitivity in human myocardium. *Basic Res Cardiol* **105**(2), 289-300.

- Koyanagi, M., Bushoven, P., Iwasaki, M., Urbich, C., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S. (2007). Notch signaling contributes to the expression of cardiac markers in human circulating progenitor cells. *Circ Res* **101**(11), 1139-45.
- Kreidberg, J. A., Sariola, H., Loring, J. M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., and Jaenisch, R. (1993). WT-1 is required for early kidney development. *Cell* **74**(4), 679-91.
- Krupnick, J. G., Gurevich, V. V., and Benovic, J. L. (1997). Mechanism of quenching of phototransduction. Binding competition between arrestin and transducin for phosphorhodopsin. *J Biol Chem* **272**(29), 18125-31.
- Kubin, A. M., Skoumal, R., Tavi, P., Konyi, A., Perjes, A., Leskinen, H., Ruskoaho, H., and Szokodi, I. (2011). Role of reactive oxygen species in the regulation of cardiac contractility. *J Mol Cell Cardiol* **50**(5), 884-93.
- Kucia, M., Jankowski, K., Reca, R., Wysoczynski, M., Bandura, L., Allendorf, D. J., Zhang, J., Ratajczak, J., and Ratajczak, M. Z. (2004). CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol* **35**(3), 233-45.
- Kurabayashi, M., Tsuchimochi, H., Komuro, I., Takaku, F., and Yazaki, Y. (1988). Molecular cloning and characterization of human cardiac alpha- and beta-form myosin heavy chain complementary DNA clones. Regulation of expression during development and pressure overload in human atrium. *J Clin Invest* **82**(2), 524-31.
- Kuznetsov, S. A., Cherman, N., and Robey, P. G. (2011). In vivo bone formation by progeny of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* **20**(2), 269-87.
- Kwee, L., Baldwin, H. S., Shen, H. M., Stewart, C. L., Buck, C., Buck, C. A., and Labow, M. A. (1995). Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. *Development* **121**(2), 489-503.
- Kwon, T. H., Nielsen, J., Knepper, M. A., Frokiaer, J., and Nielsen, S. (2005). Angiotensin II AT1 receptor blockade decreases vasopressin-induced water reabsorption and AQP2 levels in NaCl-restricted rats. *Am J Physiol Renal Physiol* **288**(4), F673-84.
- Laburthe, M., Couvineau, A., Gaudin, P., Maoret, J. J., Rouyer-Fessard, C., and Nicole, P. (1996). Receptors for VIP, PACAP, secretin, GRF, glucagon, GLP-1, and other members of their new family of G protein-linked receptors: structure-function relationship with special reference to the human VIP-1 receptor. *Ann N Y Acad Sci* **805**, 94-109; discussion 110-1.
- Laffel, L. M., McGill, J. B., and Gans, D. J. (1995). The beneficial effect of angiotensin-converting enzyme inhibition with captopril on diabetic nephropathy in normotensive IDDM patients with microalbuminuria. North American Microalbuminuria Study Group. *Am J Med* **99**(5), 497-504.
- Laforest, B., and Nemer, M. (2011). GATA5 interacts with GATA4 and GATA6 in outflow tract development. *Dev Biol* **358**(2), 368-78.
- Lambert, C., Massillon, Y., and Meloche, S. (1995). Upregulation of cardiac angiotensin II AT1 receptors in congenital cardiomyopathic hamsters. *Circ Res* **77**(5), 1001-7.
- Lambert, C. M., Machida, K. K., Smale, L., Nunez, A. A., and Weaver, D. R. (2005). Analysis of the prokineticin 2 system in a diurnal rodent, the unstriped Nile grass rat (*Arvicanthis niloticus*). *J Biol Rhythms* **20**(3), 206-18.
- Landeen, L. K., Dederko, D. A., Kondo, C. S., Hu, B. S., Aroonsakool, N., Haga, J. H., and Giles, W. R. (2008). Mechanisms of the negative inotropic effects of sphingosine-1-phosphate on adult mouse ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**(2), H736-49.
- Laugwitz, K. L., Moretti, A., Lam, J., Gruber, P., Chen, Y., Woodard, S., Lin, L. Z., Cai, C. L., Lu, M. M., Reth, M., Platoshyn, O., Yuan, J. X., Evans, S., and Chien, K. R.

- (2005). Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* **433**(7026), 647-53.
- Lavine, K. J., Long, F., Choi, K., Smith, C., and Ornitz, D. M. (2008). Hedgehog signaling to distinct cell types differentially regulates coronary artery and vein development. *Development* **135**(18), 3161-71.
- Lavine, K. J., White, A. C., Park, C., Smith, C. S., Choi, K., Long, F., Hui, C. C., and Ornitz, D. M. (2006). Fibroblast growth factor signals regulate a wave of Hedgehog activation that is essential for coronary vascular development. *Genes Dev* **20**(12), 1651-66.
- Lavine, K. J., Yu, K., White, A. C., Zhang, X., Smith, C., Partanen, J., and Ornitz, D. M. (2005). Endocardial and epicardial derived FGF signals regulate myocardial proliferation and differentiation in vivo. *Dev Cell* **8**(1), 85-95.
- Lazzeri, E., Crescioli, C., Ronconi, E., Mazzinghi, B., Sagrinati, C., Netti, G. S., Angelotti, M. L., Parente, E., Ballerini, L., Cosmi, L., Maggi, L., Gesualdo, L., Rotondi, M., Annunziato, F., Maggi, E., Lasagni, L., Serio, M., Romagnani, S., Vannelli, G. B., and Romagnani, P. (2007). Regenerative potential of embryonic renal multipotent progenitors in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* **18**(12), 3128-38.
- LeCouter, J., Kowalski, J., Foster, J., Hass, P., Zhang, Z., Dillard-Telm, L., Frantz, G., Rangell, L., DeGuzman, L., Keller, G. A., Peale, F., Gurney, A., Hillan, K. J., and Ferrara, N. (2001). Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* **412**(6850), 877-84.
- LeCouter, J., Lin, R., Tejada, M., Frantz, G., Peale, F., Hillan, K. J., and Ferrara, N. (2003). The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: Localization of Bv8 receptors to endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5), 2685-90.
- LeCouter, J., Zlot, C., Tejada, M., Peale, F., and Ferrara, N. (2004). Bv8 and endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(48), 16813-8.
- Lee, H., Shamy, G. A., Elkabetz, Y., Schofield, C. M., Harrision, N. L., Panagiotakos, G., Socci, N. D., Tabar, V., and Studer, L. (2007). Directed differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived motoneurons. *Stem Cells* **25**(8), 1931-9.
- Lee, H. G., Chen, Q., Wolfram, J. A., Richardson, S. L., Liner, A., Siedlak, S. L., Zhu, X., Ziats, N. P., Fujioka, H., Felsher, D. W., Castellani, R. J., Valencik, M. L., McDonald, J. A., Hoit, B. D., Lesnefsky, E. J., and Smith, M. A. (2009). Cell cycle re-entry and mitochondrial defects in myc-mediated hypertrophic cardiomyopathy and heart failure. *PLoS One* **4**(9), e7172.
- Lee, K., Brown, D., Urena, P., Ardaillou, N., Ardaillou, R., Deeds, J., and Segre, G. V. (1996). Localization of parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor mRNA in kidney. *Am J Physiol* **270**(1 Pt 2), F186-91.
- Lemieux, H., Semsroth, S., Antretter, H., Hofer, D., and Gnaiger, E. (2011). Mitochondrial respiratory control and early defects of oxidative phosphorylation in the failing human heart. *Int J Biochem Cell Biol* **43**(12), 1729-38.
- Lepilina, A., Coon, A. N., Kikuchi, K., Holdway, J. E., Roberts, R. W., Burns, C. G., and Poss, K. D. (2006). A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell* **127**(3), 607-19.
- Leroy, C., Fouveaut, C., Leclercq, S., Jacquemont, S., Boullay, H. D., Lespinasse, J., Delpech, M., Dupont, J. M., Hardelin, J. P., and Dode, C. (2008). Biallelic mutations in the prokineticin-2 gene in two sporadic cases of Kallmann syndrome. *Eur J Hum Genet* **16**(7), 865-8.

- Leveen, P., Pekny, M., Gebre-Medhin, S., Swolin, B., Larsson, E., and Betsholtz, C. (1994). Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev* **8**(16), 1875-87.
- Lewis, E. J., Hunsicker, L. G., Bain, R. P., and Rohde, R. D. (1993). The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* **329**(20), 1456-62.
- Li, J. D., Hu, W. P., Boehmer, L., Cheng, M. Y., Lee, A. G., Jilek, A., Siegel, J. M., and Zhou, Q. Y. (2006). Attenuated circadian rhythms in mice lacking the prokineticin 2 gene. *J Neurosci* **26**(45), 11615-23.
- Li, L., and Schafer, J. A. (1998). Dopamine inhibits vasopressin-dependent cAMP production in the rat cortical collecting duct. *Am J Physiol* **275**(1 Pt 2), F62-7.
- Li, M., Bullock, C. M., Knauer, D. J., Ehlert, F. J., and Zhou, Q. Y. (2001). Identification of two prokineticin cDNAs: recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. *Mol Pharmacol* **59**(4), 692-8.
- Li, Z., Wu, J. C., Sheikh, A. Y., Kraft, D., Cao, F., Xie, X., Patel, M., Gambhir, S. S., Robbins, R. C., and Cooke, J. P. (2007). Differentiation, survival, and function of embryonic stem cell derived endothelial cells for ischemic heart disease. *Circulation* **116**(11 Suppl), I46-54.
- Liang, Q., De Windt, L. J., Witt, S. A., Kimball, T. R., Markham, B. E., and Molkentin, J. D. (2001). The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **276**(32), 30245-53.
- Lie-Venema, H., Eralp, I., Maas, S., Gittenberger-De Groot, A. C., Poelmann, R. E., and DeRuiter, M. C. (2005). Myocardial heterogeneity in permissiveness for epicardium-derived cells and endothelial precursor cells along the developing heart tube at the onset of coronary vascularization. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **282**(2), 120-9.
- Lie-Venema, H., Eralp, I., Markwald, R. R., van den Akker, N. M., Wijffels, M. C., Kolditz, D. P., van der Laarse, A., Schalij, M. J., Poelmann, R. E., Bogers, A. J., and Gittenberger-de Groot, A. C. (2008). Periostin expression by epicardium-derived cells is involved in the development of the atrioventricular valves and fibrous heart skeleton. *Differentiation* **76**(7), 809-19.
- Limana, F., Bertolami, C., Mangoni, A., Di Carlo, A., Avitabile, D., Mocini, D., Iannelli, P., De Mori, R., Marchetti, C., Pozzoli, O., Gentili, C., Zacheo, A., Germani, A., and Capogrossi, M. C. (2010). Myocardial infarction induces embryonic reprogramming of epicardial c-kit(+) cells: role of the pericardial fluid. *J Mol Cell Cardiol* **48**(4), 609-18.
- Limana, F., Zacheo, A., Mocini, D., Mangoni, A., Borsellino, G., Diamantini, A., De Mori, R., Battistini, L., Vigna, E., Santini, M., Loiaconi, V., Pompilio, G., Germani, A., and Capogrossi, M. C. (2007). Identification of myocardial and vascular precursor cells in human and mouse epicardium. *Circ Res* **101**(12), 1255-65.
- Lin, F., Moran, A., and Igarashi, P. (2005). Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney. *J Clin Invest* **115**(7), 1756-64.
- Lin, F., Owens, W. A., Chen, S., Stevens, M. E., Kesteven, S., Arthur, J. F., Woodcock, E. A., Feneley, M. P., and Graham, R. M. (2001). Targeted alpha(1A)-adrenergic receptor overexpression induces enhanced cardiac contractility but not hypertrophy. *Circ Res* **89**(4), 343-50.
- Lin, S. C., Dolle, P., Ryckebusch, L., Nosedá, M., Zaffran, S., Schneider, M. D., and Niederreither, K. (2010). Endogenous retinoic acid regulates cardiac progenitor differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(20), 9234-9.

- Lindahl, P., Johansson, B. R., Leveen, P., and Betsholtz, C. (1997). Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* **277**(5323), 242-5.
- Linden, M., Li, Z., Paulin, D., Gotow, T., and Leterrier, J. F. (2001). Effects of desmin gene knockout on mice heart mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **33**(4), 333-41.
- Ling, H., Zhang, T., Pereira, L., Means, C. K., Cheng, H., Gu, Y., Dalton, N. D., Peterson, K. L., Chen, J., Bers, D., and Brown, J. H. (2009). Requirement for Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice. *J Clin Invest* **119**(5), 1230-40.
- Listenberger, L. L., and Schaffer, J. E. (2002). Mechanisms of lipoapoptosis: implications for human heart disease. *Trends Cardiovasc Med* **12**(3), 134-8.
- Liu, C. M., Ma, J. Q., and Sun, Y. Z. (2012). Puerarin protects rat kidney from lead-induced apoptosis by modulating the PI3K/Akt/eNOS pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* **258**(3), 330-42.
- Liu, Y. (2006). Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* **69**(2), 213-7.
- Liu, Z., Xie, J., Wu, T., Truong, T., Auchus, R. J., and Huang, C. L. (2011). Downregulation of NCC and NKCC2 cotransporters by kidney-specific WNK1 revealed by gene disruption and transgenic mouse models. *Hum Mol Genet* **20**(5), 855-66.
- Logothetis, D. E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, E. J., and Clapham, D. E. (1987). The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* **325**(6102), 321-6.
- Long, J. E., Garel, S., Alvarez-Dolado, M., Yoshikawa, K., Osumi, N., Alvarez-Buylla, A., and Rubenstein, J. L. (2007). Dlx-dependent and -independent regulation of olfactory bulb interneuron differentiation. *J Neurosci* **27**(12), 3230-43.
- Loo, C. K., Algar, E. M., Payton, D. J., Perry-Keene, J., Pereira, T. N., and Ramm, G. A. (2012). Possible role of WT1 in a human fetus with evolving bronchial atresia, pulmonary malformation and renal agenesis. *Pediatr Dev Pathol* **15**(1), 39-44.
- Loo, C. K., Pereira, T. N., and Ramm, G. A. (2012). Abnormal WT1 expression in human fetuses with bilateral renal agenesis and cardiac malformations. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* **94**(2), 116-22.
- Lopaschuk, G. D., Ussher, J. R., Folmes, C. D., Jaswal, J. S., and Stanley, W. C. (2010). Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev* **90**(1), 207-58.
- Lowes, B. D., Minobe, W., Abraham, W. T., Rizeq, M. N., Bohlmeier, T. J., Quaife, R. A., Roden, R. L., Dutcher, D. L., Robertson, A. D., Voelkel, N. F., Badesch, D. B., Groves, B. M., Gilbert, E. M., and Bristow, M. R. (1997). Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest* **100**(9), 2315-24.
- Lu, J., Richardson, J. A., and Olson, E. N. (1998). Capsulin: a novel bHLH transcription factor expressed in epicardial progenitors and mesenchyme of visceral organs. *Mech Dev* **73**(1), 23-32.
- Lyman, S. D., and Jacobsen, S. E. (1998). c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* **91**(4), 1101-34.
- MacNeill, C., French, R., Evans, T., Wessels, A., and Burch, J. B. (2000). Modular regulation of cGATA-5 gene expression in the developing heart and gut. *Dev Biol* **217**(1), 62-76.
- Maeda, Y., Terada, Y., Nonoguchi, H., and Knepper, M. A. (1992). Hormone and autacoid regulation of cAMP production in rat IMCD subsegments. *Am J Physiol* **263**(2 Pt 2), F319-27.
- Maeshima, A., Yamashita, S., and Nojima, Y. (2003). Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. *J Am Soc Nephrol* **14**(12), 3138-46.

- Mahtab, E. A., Wijffels, M. C., Van Den Akker, N. M., Hahurij, N. D., Lie-Venema, H., Wisse, L. J., Deruiter, M. C., Uhrin, P., Zaujec, J., Binder, B. R., Schali, M. J., Poelmann, R. E., and Gittenberger-De Groot, A. C. (2008). Cardiac malformations and myocardial abnormalities in podoplanin knockout mouse embryos: Correlation with abnormal epicardial development. *Dev Dyn* **237**(3), 847-57.
- Makita, N., Iwai, N., Inagami, T., and Badr, K. F. (1992). Two distinct pathways in the down-regulation of type-1 angiotension II receptor gene in rat glomerular mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **185**(1), 142-6.
- Maldonado-Perez, D., Brown, P., Morgan, K., Millar, R. P., Thompson, E. A., and Jabbour, H. N. (2009). Prokineticin 1 modulates IL-8 expression via the calcineurin/NFAT signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* **1793**(7), 1315-24.
- Malek, S., Kaplan, E., Wang, J. F., Ke, Q., Rana, J. S., Chen, Y., Rahim, B. G., Li, M., Huang, Q., Xiao, Y. F., Verheugt, F. W., Morgan, J. P., and Min, J. Y. (2006). Successful implantation of intravenously administered stem cells correlates with severity of inflammation in murine myocarditis. *Pflugers Arch* **452**(3), 268-75.
- Manasek, F. J. (1969). Embryonic development of the heart. II. Formation of the epicardium. *J Embryol Exp Morphol* **22**(3), 333-48.
- Mangmool, S., Shukla, A. K., and Rockman, H. A. (2010). beta-Arrestin-dependent activation of Ca(2+)/calmodulin kinase II after beta(1)-adrenergic receptor stimulation. *J Cell Biol* **189**(3), 573-87.
- Manner, J. (1999). Does the subepicardial mesenchyme contribute myocardioblasts to the myocardium of the chick embryo heart? A quail-chick chimera study tracing the fate of the epicardial primordium. *Anat Rec* **255**(2), 212-26.
- Manner, J., Schlueter, J., and Brand, T. (2005). Experimental analyses of the function of the proepicardium using a new microsurgical procedure to induce loss-of-proepicardial-function in chick embryos. *Dev Dyn* **233**(4), 1454-63.
- Marfella, R., Di Filippo, C., Portoghese, M., Barbieri, M., Ferraraccio, F., Siniscalchi, M., Cacciapuoti, F., Rossi, F., D'Amico, M., and Paolisso, G. (2009). Myocardial lipid accumulation in patients with pressure-overloaded heart and metabolic syndrome. *J Lipid Res* **50**(11), 2314-23.
- Marguerie, A., Bajolle, F., Zaffran, S., Brown, N. A., Dickson, C., Buckingham, M. E., and Kelly, R. G. (2006). Congenital heart defects in Fgfr2-IIIb and Fgf10 mutant mice. *Cardiovasc Res* **71**(1), 50-60.
- Maric, C., Ryan, G. B., and Alcorn, D. (1997). Embryonic and postnatal development of the rat renal interstitium. *Anat Embryol (Berl)* **195**(6), 503-14.
- Markou, T., Cieslak, D., Gaitanaki, C., and Lazou, A. (2009). Differential roles of MAPKs and MSK1 signalling pathways in the regulation of c-Jun during phenylephrine-induced cardiac myocyte hypertrophy. *Mol Cell Biochem* **322**(1-2), 103-12.
- Marks, A. R. (2001). Ryanodine receptors/calcium release channels in heart failure and sudden cardiac death. *J Mol Cell Cardiol* **33**(4), 615-24.
- Marks, A. R. (2002). Clinical implications of cardiac ryanodine receptor/calcium release channel mutations linked to sudden cardiac death. *Circulation* **106**(1), 8-10.
- Markwald RR, F. T., Smith WN. (1965). Sturctural analysis of endocardial cytodifferentiation. *Dev Biol* **42**(1), 160-180.
- Marsango, S., di Patti, M. C., Barra, D., and Miele, R. (2009). The Bv8 gene from *Bombina orientalis*: molecular cloning, genomic organization and functional characterization of the promoter. *Peptides* **30**(12), 2182-90.
- Marti, H. H., and Risau, W. (1998). Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26), 15809-14.

- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(12), 7634-8.
- Martinez-Estrada, O. M., Lettice, L. A., Essafi, A., Guadix, J. A., Slight, J., Velecela, V., Hall, E., Reichmann, J., Devenney, P. S., Hohenstein, P., Hosen, N., Hill, R. E., Munoz-Chapuli, R., and Hastie, N. D. (2010). Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nat Genet* **42**(1), 89-93.
- Maruyama, Y., Nishida, M., Sugimoto, Y., Tanabe, S., Turner, J. H., Kozasa, T., Wada, T., Nagao, T., and Kurose, H. (2002). Galpha(12/13) mediates alpha(1)-adrenergic receptor-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res* **91**(10), 961-9.
- Massfelder, T., Parekh, N., Endlich, K., Saussine, C., Steinhausen, M., and Helwig, J. J. (1996a). Effect of intrarenally infused parathyroid hormone-related protein on renal blood flow and glomerular filtration rate in the anaesthetized rat. *Br J Pharmacol* **118**(8), 1995-2000.
- Massfelder, T., Stewart, A. F., Endlich, K., Soifer, N., Judes, C., and Helwig, J. J. (1996b). Parathyroid hormone-related protein detection and interaction with NO and cyclic AMP in the renovascular system. *Kidney Int* **50**(5), 1591-603.
- Massfelder, T., Taesch, N., Endlich, N., Eichinger, A., Escande, B., Endlich, K., Barthelmebs, M., and Helwig, J. J. (2001). Paradoxical actions of exogenous and endogenous parathyroid hormone-related protein on renal vascular smooth muscle cell proliferation: reversion in the SHR model of genetic hypertension. *FASEB J* **15**(3), 707-18.
- Masuda, Y., Takatsu, Y., Terao, Y., Kumano, S., Ishibashi, Y., Suenaga, M., Abe, M., Fukusumi, S., Watanabe, T., Shintani, Y., Yamada, T., Hinuma, S., Inatomi, N., Ohtaki, T., Onda, H., and Fujino, M. (2002). Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun* **293**(1), 396-402.
- Masumoto, K. H., Nagano, M., Takashima, N., Hayasaka, N., Hiyama, H., Matsumoto, S., Inouye, S. T., and Shigeyoshi, Y. (2006). Distinct localization of prokineticin 2 and prokineticin receptor 2 mRNAs in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* **23**(11), 2959-70.
- Matsui, Y., Takagi, H., Qu, X., Abdellatif, M., Sakoda, H., Asano, T., Levine, B., and Sadoshima, J. (2007). Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res* **100**(6), 914-22.
- Matsuura, K., Nagai, T., Nishigaki, N., Oyama, T., Nishi, J., Wada, H., Sano, M., Toko, H., Akazawa, H., Sato, T., Nakaya, H., Kasanuki, H., and Komuro, I. (2004). Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem* **279**(12), 11384-91.
- Mattot, V., Moons, L., Lupu, F., Chernavvsky, D., Gomez, R. A., Collen, D., and Carmeliet, P. (2002). Loss of the VEGF(164) and VEGF(188) isoforms impairs postnatal glomerular angiogenesis and renal arteriogenesis in mice. *J Am Soc Nephrol* **13**(6), 1548-60.
- Mazhari, R., and Hare, J. M. (2007). Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **4 Suppl 1**, S21-6.
- McCright, B., Gao, X., Shen, L., Lozier, J., Lan, Y., Maguire, M., Herzlinger, D., Weinmaster, G., Jiang, R., and Gridley, T. (2001). Defects in development of the

- kidney, heart and eye vasculature in mice homozygous for a hypomorphic Notch2 mutation. *Development* **128**(4), 491-502.
- McKay, R. G., Pfeffer, M. A., Pasternak, R. C., Markis, J. E., Come, P. C., Nakao, S., Alderman, J. D., Ferguson, J. J., Safian, R. D., and Grossman, W. (1986). Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation* **74**(4), 693-702.
- Means, C. K., Miyamoto, S., Chun, J., and Brown, J. H. (2008). S1P1 receptor localization confers selectivity for Gi-mediated cAMP and contractile responses. *J Biol Chem* **283**(18), 11954-63.
- Means, C. K., Xiao, C. Y., Li, Z., Zhang, T., Omens, J. H., Ishii, I., Chun, J., and Brown, J. H. (2007). Sphingosine 1-phosphate S1P2 and S1P3 receptor-mediated Akt activation protects against in vivo myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**(6), H2944-51.
- Meggs, L. G., Coupet, J., Huang, H., Cheng, W., Li, P., Capasso, J. M., Homcy, C. J., and Anversa, P. (1993). Regulation of angiotensin II receptors on ventricular myocytes after myocardial infarction in rats. *Circ Res* **72**(6), 1149-62.
- Mellgren, A. M., Smith, C. L., Olsen, G. S., Eskiocak, B., Zhou, B., Kazi, M. N., Ruiz, F. R., Pu, W. T., and Tallquist, M. D. (2008). Platelet-derived growth factor receptor beta signaling is required for efficient epicardial cell migration and development of two distinct coronary vascular smooth muscle cell populations. *Circ Res* **103**(12), 1393-401.
- Mercader, J. M. G.-R. a. N. (2009). The epicardium: development, differentiation and its role during heart regeneration. *NATURE REVIEWS* **6**, 67-72.
- Merki, E., Zamora, M., Raya, A., Kawakami, Y., Wang, J., Zhang, X., Burch, J., Kubalak, S. W., Kaliman, P., Izpisua Belmonte, J. C., Chien, K. R., and Ruiz-Lozano, P. (2005). Epicardial retinoid X receptor alpha is required for myocardial growth and coronary artery formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(51), 18455-60.
- Messina, E., De Angelis, L., Frati, G., Morrone, S., Chimenti, S., Fiordaliso, F., Salio, M., Battaglia, M., Latronico, M. V., Coletta, M., Vivarelli, E., Frati, L., Cossu, G., and Giacomello, A. (2004). Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* **95**(9), 911-21.
- Metrich, M., Laurent, A. C., Breckler, M., Duquesnes, N., Hmitou, I., Courillau, D., Blondeau, J. P., Crozatier, B., Lezoualc'h, F., and Morel, E. (2010). Epac activation induces histone deacetylase nuclear export via a Ras-dependent signalling pathway. *Cell Signal* **22**(10), 1459-68.
- Metrich, M., Lucas, A., Gastineau, M., Samuel, J. L., Heymes, C., Morel, E., and Lezoualc'h, F. (2008). Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* **102**(8), 959-65.
- Mikawa, T., and Fischman, D. A. (1992). Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(20), 9504-8.
- Mikawa, T., and Gourdie, R. G. (1996). Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Dev Biol* **174**(2), 221-32.
- Mishra, P. K. (2008). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of heart failure: is it all paracrine actions and immunomodulation? *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* **9**(2), 122-8.
- Mishra, S., Ling, H., Grimm, M., Zhang, T., Bers, D. M., and Brown, J. H. (2010). Cardiac hypertrophy and heart failure development through Gq and CaM kinase II signaling. *J Cardiovasc Pharmacol* **56**(6), 598-603.

- Miyahara, Y., Nagaya, N., Kataoka, M., Yanagawa, B., Tanaka, K., Hao, H., Ishino, K., Ishida, H., Shimizu, T., Kangawa, K., Sano, S., Okano, T., Kitamura, S., and Mori, H. (2006). Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* **12**(4), 459-65.
- Miyamoto, S., Murphy, A. N., and Brown, J. H. (2008). Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death Differ* **15**(3), 521-9.
- Mohl, M. C., Iismaa, S. E., Xiao, X. H., Friedrich, O., Wagner, S., Nikolova-Krstevski, V., Wu, J., Yu, Z. Y., Feneley, M., Fatkin, D., Allen, D. G., and Graham, R. M. (2011). Regulation of murine cardiac contractility by activation of alpha(1A)-adrenergic receptor-operated Ca(2+) entry. *Cardiovasc Res* **91**(2), 310-9.
- Molin, D. G., Bartram, U., Van der Heiden, K., Van Iperen, L., Speer, C. P., Hierck, B. P., Poelmann, R. E., and Gittenberger-de-Groot, A. C. (2003). Expression patterns of Tgfbeta1-3 associate with myocardialisation of the outflow tract and the development of the epicardium and the fibrous heart skeleton. *Dev Dyn* **227**(3), 431-44.
- Mollay, C., Wechselberger, C., Mignogna, G., Negri, L., Melchiorri, P., Barra, D., and Kreil, G. (1999). Bv8, a small protein from frog skin and its homologue from snake venom induce hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol* **374**(2), 189-96.
- Molnar, A., Borbely, A., Czuriga, D., Ivetta, S. M., Szilagyi, S., Hertelendi, Z., Pasztor, E. T., Balogh, A., Galajda, Z., Szerafin, T., Jaquet, K., Papp, Z., Edes, I., and Toth, A. (2009). Protein kinase C contributes to the maintenance of contractile force in human ventricular cardiomyocytes. *J Biol Chem* **284**(2), 1031-9.
- Monnier, J., Quillien, V., Piquet-Pellorce, C., Leberre, C., Preisser, L., Gascan, H., and Samson, M. (2008). Prokineticin 1 induces CCL4, CXCL1 and CXCL8 in human monocytes but not in macrophages and dendritic cells. *Eur Cytokine Netw* **19**(4), 166-75.
- Moore, A. W., McInnes, L., Kreidberg, J., Hastie, N. D., and Schedl, A. (1999). YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development* **126**(9), 1845-57.
- Morabito, C. J., Dettman, R. W., Kattan, J., Collier, J. M., and Bristow, J. (2001). Positive and negative regulation of epicardial-mesenchymal transformation during avian heart development. *Dev Biol* **234**(1), 204-15.
- Moretti, A., Caron, L., Nakano, A., Lam, J. T., Bernshausen, A., Chen, Y., Qyang, Y., Bu, L., Sasaki, M., Martin-Puig, S., Sun, Y., Evans, S. M., Laugwitz, K. L., and Chien, K. R. (2006). Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell* **127**(6), 1151-65.
- Morisco, C., Marrone, C., Galeotti, J., Shao, D., Vatner, D. E., Vatner, S. F., and Sadoshima, J. (2008). Endocytosis machinery is required for beta1-adrenergic receptor-induced hypertrophy in neonatal rat cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* **78**(1), 36-44.
- Mosca, S. M., Gelpi, R. J., and Cingolani, H. E. (1994). Adenosine and dipyridamole mimic the effects of ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* **26**(10), 1403-9.
- Moss, J. B., Xavier-Neto, J., Shapiro, M. D., Nayeem, S. M., McCaffery, P., Drager, U. C., and Rosenthal, N. (1998). Dynamic patterns of retinoic acid synthesis and response in the developing mammalian heart. *Dev Biol* **199**(1), 55-71.
- Munoz-Chapuli, R., Gonzalez-Iriarte, M., Carmona, R., Atencia, G., Macias, D., and Perez-Pomares, J. M. (2002). Cellular precursors of the coronary arteries. *Tex Heart Inst J* **29**(4), 243-9.
- Murry, C. E., Soonpaa, M. H., Reinecke, H., Nakajima, H., Nakajima, H. O., Rubart, M., Pasumarthi, K. B., Virag, J. I., Bartelmez, S. H., Poppa, V., Bradford, G., Dowell, J. D., Williams, D. A., and Field, L. J. (2004). Haematopoietic stem cells do not

- transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* **428**(6983), 664-8.
- Mutig, K., Saritas, T., Uchida, S., Kahl, T., Borowski, T., Paliege, A., Bohlick, A., Bleich, M., Shan, Q., and Bachmann, S. (2010). Short-term stimulation of the thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter by vasopressin involves phosphorylation and membrane translocation. *Am J Physiol Renal Physiol* **298**(3), F502-9.
- Nagano, H., Goi, T., Koneri, K., Hirono, Y., Katayama, K., and Yamaguchi, A. (2007). Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) expression in colorectal cancer. *J Surg Oncol* **96**(7), 605-10.
- Nagase, H., Miyamasu, M., Yamaguchi, M., Fujisawa, T., Kawasaki, H., Ohta, K., Yamamoto, K., Morita, Y., and Hirai, K. (2001). Regulation of chemokine receptor expression in eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* **125 Suppl 1**, 29-32.
- Nagata, K., Ye, C., Jain, M., Milstone, D. S., Liao, R., and Mortensen, R. M. (2000). Galpha(i2) but not Galpha(i3) is required for muscarinic inhibition of contractility and calcium currents in adult cardiomyocytes. *Circ Res* **87**(10), 903-9.
- Nakada, K., Inoue, K., and Hayashi, J. I. (2001). Mito-mice: animal models for mitochondrial DNA-based diseases. *Semin Cell Dev Biol* **12**(6), 459-65.
- Nakamura, M., Yamabe, H., Osawa, H., Nakamura, N., Shimada, M., Kumasaka, R., Murakami, R., Fujita, T., Osanai, T., and Okumura, K. (2006). Hypoxic conditions stimulate the production of angiogenin and vascular endothelial growth factor by human renal proximal tubular epithelial cells in culture. *Nephrol Dial Transplant* **21**(6), 1489-95.
- Nakao, K., Minobe, W., Roden, R., Bristow, M. R., and Leinwand, L. A. (1997). Myosin heavy chain gene expression in human heart failure. *J Clin Invest* **100**(9), 2362-70.
- Namba, T., Oida, H., Sugimoto, Y., Kakizuka, A., Negishi, M., Ichikawa, A., and Narumiya, S. (1994). cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor. Multiple signaling pathways and expression in thymic medulla. *J Biol Chem* **269**(13), 9986-92.
- Narine, K., De Wever, O., Van Valckenborgh, D., Francois, K., Bracke, M., DeSmet, S., Mareel, M., and Van Nooten, G. (2006). Growth factor modulation of fibroblast proliferation, differentiation, and invasion: implications for tissue valve engineering. *Tissue Eng* **12**(10), 2707-16.
- Narkar, V., Hussain, T., and Lokhandwala, M. (2002). Role of tyrosine kinase and p44/42 MAPK in D(2)-like receptor-mediated stimulation of Na⁺, K⁺-ATPase in kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**(4), F697-702.
- Neer, E. J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**(2), 249-57.
- Negri, L., Lattanzi, R., Giannini, E., Colucci, M., Margheriti, F., Melchiorri, P., Vellani, V., Tian, H., De Felice, M., and Porreca, F. (2006). Impaired nociception and inflammatory pain sensation in mice lacking the prokineticin receptor PKR1: focus on interaction between PKR1 and the capsaicin receptor TRPV1 in pain behavior. *J Neurosci* **26**(25), 6716-27.
- Negri, L., Lattanzi, R., Giannini, E., Metere, A., Colucci, M., Barra, D., Kreil, G., and Melchiorri, P. (2002). Nociceptive sensitization by the secretory protein Bv8. *Br J Pharmacol* **137**(8), 1147-54.
- Ng, K. L., Li, J. D., Cheng, M. Y., Leslie, F. M., Lee, A. G., and Zhou, Q. Y. (2005). Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science* **308**(5730), 1923-7.
- Ngan, E. S., Lee, K. Y., Sit, F. Y., Poon, H. C., Chan, J. K., Sham, M. H., Lui, V. C., and Tam, P. K. (2007a). Prokineticin-1 modulates proliferation and differentiation of enteric neural crest cells. *Biochim Biophys Acta* **1773**(4), 536-45.

- Ngan, E. S., Lee, K. Y., Yeung, W. S., Ngan, H. Y., Ng, E. H., and Ho, P. C. (2006). Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor is expressed in human peri-implantation endometrium, but not in endometrial carcinoma. *Endocrinology* **147**(1), 88-95.
- Ngan, E. S., Shum, C. K., Poon, H. C., Sham, M. H., Garcia-Barcelo, M. M., Lui, V. C., and Tam, P. K. (2008). Prokineticin-1 (Prok-1) works coordinately with glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) to mediate proliferation and differentiation of enteric neural crest cells. *Biochim Biophys Acta* **1783**(3), 467-78.
- Ngan, E. S., Sit, F. Y., Lee, K., Miao, X., Yuan, Z., Wang, W., Nicholls, J. M., Wong, K. K., Garcia-Barcelo, M., Lui, V. C., and Tam, P. K. (2007b). Implications of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 signaling in human neuroblastoma progression. *Clin Cancer Res* **13**(3), 868-75.
- Nie, X., Sun, J., Gordon, R. E., Cai, C. L., and Xu, P. X. (2010). SIX1 acts synergistically with TBX18 in mediating ureteral smooth muscle formation. *Development* **137**(5), 755-65.
- Nishida, M., Onohara, N., Sato, Y., Suda, R., Ogushi, M., Tanabe, S., Inoue, R., Mori, Y., and Kurose, H. (2007). Galpha12/13-mediated up-regulation of TRPC6 negatively regulates endothelin-1-induced cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis through nuclear factor of activated T cells activation. *J Biol Chem* **282**(32), 23117-28.
- Nishida, M., Tanabe, S., Maruyama, Y., Mangmool, S., Urayama, K., Nagamatsu, Y., Takagahara, S., Turner, J. H., Kozasa, T., Kobayashi, H., Sato, Y., Kawanishi, T., Inoue, R., Nagao, T., and Kurose, H. (2005). G alpha 12/13- and reactive oxygen species-dependent activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase by angiotensin receptor stimulation in rat neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem* **280**(18), 18434-41.
- Noguchi, H., Ueda, M., Matsumoto, S., Kobayashi, N., and Hayashi, S. (2007). BETA2/NeuroD protein transduction requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Hum Gene Ther* **18**(1), 10-7.
- Norman, J. T., and Fine, L. G. (2006). Intrarenal oxygenation in chronic renal failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **33**(10), 989-96.
- Nunn, C., Zou, M. X., Sobiesiak, A. J., Roy, A. A., Kirshenbaum, L. A., and Chidiac, P. (2010). RGS2 inhibits beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Cell Signal* **22**(8), 1231-9.
- Nury, D., Neri, T., and Puceat, M. (2009). Human embryonic stem cells and cardiac cell fate. *J Cell Physiol* **218**(3), 455-9.
- O'Connell, T. D., Ishizaka, S., Nakamura, A., Swigart, P. M., Rodrigo, M. C., Simpson, G. L., Cotecchia, S., Rokosh, D. G., Grossman, W., Foster, E., and Simpson, P. C. (2003). The alpha(1A/C)- and alpha(1B)-adrenergic receptors are required for physiological cardiac hypertrophy in the double-knockout mouse. *J Clin Invest* **111**(11), 1783-91.
- O'Connell, T. D., Swigart, P. M., Rodrigo, M. C., Ishizaka, S., Joho, S., Turnbull, L., Tecott, L. H., Baker, A. J., Foster, E., Grossman, W., and Simpson, P. C. (2006). Alpha1-adrenergic receptors prevent a maladaptive cardiac response to pressure overload. *J Clin Invest* **116**(4), 1005-15.
- O'Donoghue, K., and Fisk, N. M. (2004). Fetal stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **18**(6), 853-75.
- Oestreich, E. A., Malik, S., Goonasekera, S. A., Blaxall, B. C., Kelley, G. G., Dirksen, R. T., and Smrcka, A. V. (2009). Epac and phospholipase Cepsilon regulate Ca²⁺ release in the heart by activation of protein kinase Cepsilon and calcium-calmodulin kinase II. *J Biol Chem* **284**(3), 1514-22.

- Ogawa, H., Suefuji, H., Soejima, H., Nishiyama, K., Misumi, K., Takazoe, K., Miyamoto, S., Kajiwar, I., Sumida, H., Sakamoto, T., Yoshimura, M., Kugiyama, K., Yasue, H., and Matsuo, K. (2000). Increased blood vascular endothelial growth factor levels in patients with acute myocardial infarction. *Cardiology* **93**(1-2), 93-9.
- Ogawa, T., Miura, T., Shimamoto, K., and Iimura, O. (1996). Activation of adenosine receptors before ischemia enhances tolerance against myocardial stunning in the rabbit heart. *J Am Coll Cardiol* **27**(1), 225-33.
- Oh, H., Chi, X., Bradfute, S. B., Mishina, Y., Pocius, J., Michael, L. H., Behringer, R. R., Schwartz, R. J., Entman, M. L., and Schneider, M. D. (2004). Cardiac muscle plasticity in adult and embryo by heart-derived progenitor cells. *Ann N Y Acad Sci* **1015**, 182-9.
- Oh, H., Wang, S. C., Prahsh, A., Sano, M., Moravec, C. S., Taffet, G. E., Michael, L. H., Youker, K. A., Entman, M. L., and Schneider, M. D. (2003). Telomere attrition and Chk2 activation in human heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9), 5378-83.
- Ohnishi, S., Sumiyoshi, H., Kitamura, S., and Nagaya, N. (2007). Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. *FEBS Lett* **581**(21), 3961-6.
- Oka, T., Xu, J., and Molkentin, J. D. (2007). Re-employment of developmental transcription factors in adult heart disease. *Semin Cell Dev Biol* **18**(1), 117-31.
- Olafsson, B., Forman, M. B., Puett, D. W., Pou, A., Cates, C. U., Friesinger, G. C., and Virmani, R. (1987). Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon. *Circulation* **76**(5), 1135-45.
- Oldershaw, R. A., Baxter, M. A., Lowe, E. T., Bates, N., Grady, L. M., Soncin, F., Brison, D. R., Hardingham, T. E., and Kimber, S. J. (2010). Directed differentiation of human embryonic stem cells toward chondrocytes. *Nat Biotechnol* **28**(11), 1187-94.
- Olivetti, G., Abbi, R., Quaini, F., Kajstura, J., Cheng, W., Nitahara, J. A., Quaini, E., Di Loreto, C., Beltrami, C. A., Krajewski, S., Reed, J. C., and Anversa, P. (1997). Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* **336**(16), 1131-41.
- Olivey, H. E., Mundell, N. A., Austin, A. F., and Barnett, J. V. (2006). Transforming growth factor-beta stimulates epithelial-mesenchymal transformation in the proepicardium. *Dev Dyn* **235**(1), 50-9.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Bodine, D. M., Leri, A., and Anversa, P. (2001a). Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci* **938**, 221-9; discussion 229-30.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Limana, F., Jakoniuk, I., Quaini, F., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A., and Anversa, P. (2001b). Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(18), 10344-9.
- Orr-Urtreger, A., Bedford, M. T., Do, M. S., Eisenbach, L., and Lonai, P. (1992). Developmental expression of the alpha receptor for platelet-derived growth factor, which is deleted in the embryonic lethal Patch mutation. *Development* **115**(1), 289-303.
- Paces-Fessy, M., Fabre, M., Lesaulnier, C., and Cereghini, S. (2012). Hnf1b and Pax2 cooperate to control different pathways in kidney and ureter morphogenesis. *Hum Mol Genet* **21**(14), 3143-55.
- Paliege, A., Roeschel, T., Neymeyer, H., Seidel, S., Kahl, T., Daigeler, A. L., Mutig, K., Mrowka, R., Ferreri, N. R., Wilson, B. S., Himmerkus, N., Bleich, M., and Bachmann, S. (2012). Group VIA phospholipase A2 is a target for vasopressin signaling in the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol* **302**(7), F865-74.

- Paradis, P., Dali-Youcef, N., Paradis, F. W., Thibault, G., and Nemer, M. (2000). Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(2), 931-6.
- Pasquali, D., Rossi, V., Staibano, S., De Rosa, G., Chieffi, P., Prezioso, D., Mirone, V., Mascolo, M., Tramontano, D., Bellastella, A., and Sinisi, A. A. (2006). The endocrine-gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF)/prokineticin 1 and 2 and receptor expression in human prostate: Up-regulation of EG-VEGF/prokineticin 1 with malignancy. *Endocrinology* **147**(9), 4245-51.
- Pasquali, D., Santoro, A., Bufo, P., Conzo, G., Deery, W. J., Renzullo, A., Accardo, G., Sacco, V., Bellastella, A., and Pannone, G. (2011). Upregulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor in papillary thyroid cancers displaying infiltrative patterns, lymph node metastases, and BRAF mutation. *Thyroid* **21**(4), 391-9.
- Patel, R., and Kos, L. (2005). Endothelin-1 and Neuregulin-1 convert embryonic cardiomyocytes into cells of the conduction system in the mouse. *Dev Dyn* **233**(1), 20-8.
- Pedemonte, C. H., Efendiev, R., and Bertorello, A. M. (2005). Inhibition of Na,K-ATPase by dopamine in proximal tubule epithelial cells. *Semin Nephrol* **25**(5), 322-7.
- Penn, M. S. (2009). Importance of the SDF-1:CXCR4 axis in myocardial repair. *Circ Res* **104**(10), 1133-5.
- Penn, M. S. (2010). SDF-1:CXCR4 axis is fundamental for tissue preservation and repair. *Am J Pathol* **177**(5), 2166-8.
- Pennisi, D. J., Ballard, V. L., and Mikawa, T. (2003). Epicardium is required for the full rate of myocyte proliferation and levels of expression of myocyte mitogenic factors FGF2 and its receptor, FGFR-1, but not for transmural myocardial patterning in the embryonic chick heart. *Dev Dyn* **228**(2), 161-72.
- Pennisi, D. J., and Mikawa, T. (2005). Normal patterning of the coronary capillary plexus is dependent on the correct transmural gradient of FGF expression in the myocardium. *Dev Biol* **279**(2), 378-90.
- Pennisi, D. J., and Mikawa, T. (2009). FGFR-1 is required by epicardium-derived cells for myocardial invasion and correct coronary vascular lineage differentiation. *Dev Biol* **328**(1), 148-59.
- Pereira, L., Metrich, M., Fernandez-Velasco, M., Lucas, A., Leroy, J., Perrier, R., Morel, E., Fischmeister, R., Richard, S., Benitah, J. P., Lezoualc'h, F., and Gomez, A. M. (2007). The cAMP binding protein Epac modulates Ca²⁺ sparks by a Ca²⁺/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes. *J Physiol* **583**(Pt 2), 685-94.
- Perez-Pomares, J. M., Carmona, R., Gonzalez-Iriarte, M., Atencia, G., Wessels, A., and Munoz-Chapuli, R. (2002a). Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos. *Int J Dev Biol* **46**(8), 1005-13.
- Perez-Pomares, J. M., Phelps, A., Sedmerova, M., Carmona, R., Gonzalez-Iriarte, M., Munoz-Chapuli, R., and Wessels, A. (2002b). Experimental studies on the spatiotemporal expression of WT1 and RALDH2 in the embryonic avian heart: a model for the regulation of myocardial and valvuloseptal development by epicardially derived cells (EPDCs). *Dev Biol* **247**(2), 307-26.
- Pernot, E., Terryn, S., Cheong, S. C., Markadieu, N., Janas, S., Blockmans, M., Jacoby, M., Pouillon, V., Gayral, S., Rossier, B. C., Beauwens, R., Erneux, C., Devuyst, O., and Schurmans, S. (2011). The inositol Inpp5k 5-phosphatase affects osmoregulation through the vasopressin-aquaporin 2 pathway in the collecting system. *Pflugers Arch* **462**(6), 871-83.

- Petrov, V. V., van Pelt, J. F., Vermeesch, J. R., Van Duppen, V. J., Vekemans, K., Fagard, R. H., and Lijnen, P. J. (2008). TGF-beta1-induced cardiac myofibroblasts are nonproliferating functional cells carrying DNA damages. *Exp Cell Res* **314**(7), 1480-94.
- Pfeilschifter, J. (1990). Angiotensin II B-type receptor mediates phosphoinositide hydrolysis in mesangial cells. *Eur J Pharmacol* **184**(1), 201-2.
- Pfister, M. F., Lederer, E., Forgo, J., Ziegler, U., Lotscher, M., Quabius, E. S., Biber, J., and Murer, H. (1997). Parathyroid hormone-dependent degradation of type II Na⁺/Pi cotransporters. *J Biol Chem* **272**(32), 20125-30.
- Piera-Velazquez, S., Li, Z., and Jimenez, S. A. (2011). Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *Am J Pathol* **179**(3), 1074-80.
- Pitarsy, C. J., 2nd, Virmani, R., Vildibill, H. D., Jr., Jackson, E. K., and Forman, M. B. (1991). Reduction of myocardial reperfusion injury by intravenous adenosine administered during the early reperfusion period. *Circulation* **83**(1), 237-47.
- Pitteloud, N., Zhang, C., Pignatelli, D., Li, J. D., Raivio, T., Cole, L. W., Plummer, L., Jacobson-Dickman, E. E., Mellon, P. L., Zhou, Q. Y., and Crowley, W. F., Jr. (2007). Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(44), 17447-52.
- Plageman, T. F., Jr., and Yutzey, K. E. (2004). Differential expression and function of Tbx5 and Tbx20 in cardiac development. *J Biol Chem* **279**(18), 19026-34.
- Plotkin, M., and Mudunuri, V. (2008). Pod1 induces myofibroblast differentiation in mesenchymal progenitor cells from mouse kidney. *J Cell Biochem* **103**(2), 675-90.
- Poelmann, R. E., Gittenberger-de Groot, A. C., Mentink, M. M., Bokenkamp, R., and Hogers, B. (1993). Development of the cardiac coronary vascular endothelium, studied with antiendothelial antibodies, in chicken-quail chimeras. *Circ Res* **73**(3), 559-68.
- Polette, M., Mestdagt, M., Bindels, S., Nawrocki-Raby, B., Hunziker, W., Foidart, J. M., Birembaut, P., and Gilles, C. (2007). Beta-catenin and ZO-1: shuttle molecules involved in tumor invasion-associated epithelial-mesenchymal transition processes. *Cells Tissues Organs* **185**(1-3), 61-5.
- Pombal, M. A., Carmona, R., Megias, M., Ruiz, A., Perez-Pomares, J. M., and Munoz-Chapuli, R. (2008). Epicardial development in lamprey supports an evolutionary origin of the vertebrate epicardium from an ancestral pronephric external glomerulus. *Evol Dev* **10**(2), 210-6.
- Prosser, H. M., Bradley, A., and Caldwell, M. A. (2007). Olfactory bulb hypoplasia in Prokr2 null mice stems from defective neuronal progenitor migration and differentiation. *Eur J Neurosci* **26**(12), 3339-44.
- Prosser, H. M., Bradley, A., Chesham, J. E., Ebling, F. J., Hastings, M. H., and Maywood, E. S. (2007). Prokineticin receptor 2 (Prokr2) is essential for the regulation of circadian behavior by the suprachiasmatic nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(2), 648-53.
- Puceat, M. (2008). Human embryonic stem cell: is it a realistic cell source for regenerative therapy of heart failure? *Pathol Biol (Paris)* **56**(2), 47-9.
- Puri, M. C., Rossant, J., Alitalo, K., Bernstein, A., and Partanen, J. (1995). The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *EMBO J* **14**(23), 5884-91.
- Qiu, C. Y., Liu, Y. Q., Qiu, F., Wu, J., Zhou, Q. Y., and Hu, W. P. (2012). Prokineticin 2 potentiates acid-sensing ion channel activity in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neuroinflammation* **9**(1), 108.

- Qu, X., Zhuang, G., Yu, L., Meng, G., and Ferrara, N. (2012). Induction of Bv8 Expression by Granulocyte Colony-stimulating Factor in CD11b+Gr1+ Cells: KEY ROLE OF Stat3 SIGNALING. *J Biol Chem* **287**(23), 19574-84.
- Quaggin, S. E., Schwartz, L., Cui, S., Igarashi, P., Deimling, J., Post, M., and Rossant, J. (1999). The basic-helix-loop-helix protein pod1 is critically important for kidney and lung organogenesis. *Development* **126**(24), 5771-83.
- Quaggin, S. E., Vanden Heuvel, G. B., and Igarashi, P. (1998). Pod-1, a mesoderm-specific basic-helix-loop-helix protein expressed in mesenchymal and glomerular epithelial cells in the developing kidney. *Mech Dev* **71**(1-2), 37-48.
- Rabelink, T. J., de Boer, H. C., and van Zonneveld, A. J. (2010). Endothelial activation and circulating markers of endothelial activation in kidney disease. *Nat Rev Nephrol* **6**(7), 404-14.
- Rajabi, M., Kassiotis, C., Razeghi, P., and Taegtmeyer, H. (2007). Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis. *Heart Fail Rev* **12**(3-4), 331-43.
- Rajagopal, K., Whalen, E. J., Violin, J. D., Stiber, J. A., Rosenberg, P. B., Premont, R. T., Coffman, T. M., Rockman, H. A., and Lefkowitz, R. J. (2006). Beta-arrestin2-mediated inotropic effects of the angiotensin II type 1A receptor in isolated cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(44), 16284-9.
- Ramon Muñoz-Chápuli, D. M., Casto Ramos, Alejandro Gallego and Victoria De Andrés (1996). Development of the subepicardial mesenchyme and the early cardiac vessels in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *J Exp Zool* **275**(2-3), 95-111.
- Ratajska, A., Czarnowska, E., and Ciszek, B. (2008). Embryonic development of the proepicardium and coronary vessels. *Int J Dev Biol* **52**(2-3), 229-36.
- Ratajska, A., and Fiejka, E. (1999). Prenatal development of coronary arteries in the rat: morphologic patterns. *Anat Embryol (Berl)* **200**(5), 533-40.
- Red-Horse, K., Ueno, H., Weissman, I. L., and Krasnow, M. A. (2010). Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature* **464**(7288), 549-53.
- Regitz-Zagrosek, V., Fielitz, J., Dreyse, R., Hildebrandt, A. G., and Fleck, E. (1997). Angiotensin receptor type 1 mRNA in human right ventricular endomyocardial biopsies: downregulation in heart failure. *Cardiovasc Res* **35**(1), 99-105.
- Regitz-Zagrosek, V., Friedel, N., Heymann, A., Bauer, P., Neuss, M., Rolfs, A., Steffen, C., Hildebrandt, A., Hetzer, R., and Fleck, E. (1995). Regulation, chamber localization, and subtype distribution of angiotensin II receptors in human hearts. *Circulation* **91**(5), 1461-71.
- Reidy, K. J., Villegas, G., Teichman, J., Veron, D., Shen, W., Jimenez, J., Thomas, D., and Tufro, A. (2009). Semaphorin3a regulates endothelial cell number and podocyte differentiation during glomerular development. *Development* **136**(23), 3979-89.
- Reiser, P. J., Portman, M. A., Ning, X. H., and Schomisch Moravec, C. (2001). Human cardiac myosin heavy chain isoforms in fetal and failing adult atria and ventricles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**(4), H1814-20.
- Ren, G., Dewald, O., and Frangogiannis, N. G. (2003). Inflammatory mechanisms in myocardial infarction. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **2**(3), 242-56.
- Ren, P., Zhang, H., Qiu, F., Liu, Y. Q., Gu, H., O'Dowd, D. K., Zhou, Q. Y., and Hu, W. P. (2011). Prokineticin 2 regulates the electrical activity of rat suprachiasmatic nuclei neurons. *PLoS One* **6**(6), e20263.
- Rens-Domiano, S., and Hamm, H. E. (1995). Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. *FASEB J* **9**(11), 1059-66.
- Ricardo, S. D., and Deane, J. A. (2005). Adult stem cells in renal injury and repair. *Nephrology (Carlton)* **10**(3), 276-82.

- Roca-Cusachs, A., DiPette, D. J., and Nickols, G. A. (1991). Regional and systemic hemodynamic effects of parathyroid hormone-related protein: preservation of cardiac function and coronary and renal flow with reduced blood pressure. *J Pharmacol Exp Ther* **256**(1), 110-8.
- Rogg, H., de Gasparo, M., Graedel, E., Stulz, P., Burkart, F., Eberhard, M., and Erne, P. (1996). Angiotensin II-receptor subtypes in human atria and evidence for alterations in patients with cardiac dysfunction. *Eur Heart J* **17**(7), 1112-20.
- Ronco, C., Haapio, M., House, A. A., Anavekar, N., and Bellomo, R. (2008). Cardiorenal syndrome. *J Am Coll Cardiol* **52**(19), 1527-39.
- Rongish, B. J., Torry, R. J., Tucker, D. C., and Tomanek, R. J. (1994). Neovascularization of embryonic rat hearts cultured in oculo closely mimics in utero coronary vessel development. *J Vasc Res* **31**(4), 205-15.
- Rosenblatt-Velin, N., Lepore, M. G., Cartoni, C., Beermann, F., and Pedrazzini, T. (2005). FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes. *J Clin Invest* **115**(7), 1724-33.
- Ruan, H., Mitchell, S., Vainoriene, M., Lou, Q., Xie, L. H., Ren, S., Goldhaber, J. I., and Wang, Y. (2007). Gi alpha 1-mediated cardiac electrophysiological remodeling and arrhythmia in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* **116**(6), 596-605.
- Rudat, C., and Kispert, A. (2012). Wt1 and epicardial fate mapping. *Circ Res* **111**(2), 165-9.
- Ruiz-Ferrer, M., Torroglosa, A., Nunez-Torres, R., de Agustin, J. C., Antinolo, G., and Borrego, S. (2011). Expression of PROKR1 and PROKR2 in human enteric neural precursor cells and identification of sequence variants suggest a role in HSCR. *PLoS One* **6**(8), e23475.
- Rumberger, J. A., Behrenbeck, T., Breen, J. R., Reed, J. E., and Gersh, B. J. (1993). Nonparallel changes in global left ventricular chamber volume and muscle mass during the first year after transmural myocardial infarction in humans. *J Am Coll Cardiol* **21**(3), 673-82.
- Rychter, Z., Jirasek, J. E., Rychterova, V., and Uher, J. (1975). Vascularization of heart in human embryo: location and shape of non-vascularized part of cardiac wall. *Folia Morphol (Praha)* **23**(1), 88-96.
- Saddik, M., and Lopaschuk, G. D. (1991). Myocardial triglyceride turnover and contribution to energy substrate utilization in isolated working rat hearts. *J Biol Chem* **266**(13), 8162-70.
- Sagrinati, C., Netti, G. S., Mazzinghi, B., Lazzeri, E., Liotta, F., Frosali, F., Ronconi, E., Meini, C., Gacci, M., Squecco, R., Carini, M., Gesualdo, L., Francini, F., Maggi, E., Annunziato, F., Lasagni, L., Serio, M., Romagnani, S., and Romagnani, P. (2006). Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol* **17**(9), 2443-56.
- Salker, M., Teklenburg, G., Molokhia, M., Lavery, S., Trew, G., Aojanpong, T., Mardon, H. J., Lokugamage, A. U., Rai, R., Landles, C., Roelen, B. A., Quenby, S., Kuijk, E. W., Kavelaars, A., Heijnen, C. J., Regan, L., Macklon, N. S., and Brosens, J. J. (2010). Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. *PLoS One* **5**(4), e10287.
- Samson, M., Peale, F. V., Jr., Frantz, G., Rioux-Leclercq, N., Rajpert-De Meyts, E., and Ferrara, N. (2004). Human endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: expression early in development and in Leydig cell tumors suggests roles in normal and pathological testis angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* **89**(8), 4078-88.
- San-Cristobal, P., Pacheco-Alvarez, D., Richardson, C., Ring, A. M., Vazquez, N., Rafiqi, F. H., Chari, D., Kahle, K. T., Leng, Q., Bobadilla, N. A., Hebert, S. C., Alessi, D. R.,

- Lifton, R. P., and Gamba, G. (2009). Angiotensin II signaling increases activity of the renal Na-Cl cotransporter through a WNK4-SPAK-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(11), 4384-9.
- Sandberg, M. B., Riquier, A. D., Pihakaski-Maunsbach, K., McDonough, A. A., and Maunsbach, A. B. (2007). ANG II provokes acute trafficking of distal tubule Na⁺-Cl⁻ cotransporter to apical membrane. *Am J Physiol Renal Physiol* **293**(3), F662-9.
- Sanna, B., Bueno, O. F., Dai, Y. S., Wilkins, B. J., and Molkentin, J. D. (2005). Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth. *Mol Cell Biol* **25**(3), 865-78.
- Sanni, S. J., Hansen, J. T., Bonde, M. M., Speerschneider, T., Christensen, G. L., Munk, S., Gammeltoft, S., and Hansen, J. L. (2010). beta-Arrestin 1 and 2 stabilize the angiotensin II type I receptor in distinct high-affinity conformations. *Br J Pharmacol* **161**(1), 150-61.
- Saraste, A., and Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* **45**(3), 528-37.
- Saraste, A., Pulkki, K., Kallajoki, M., Henriksen, K., Parvinen, M., and Voipio-Pulkki, L. M. (1997). Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* **95**(2), 320-3.
- Sarfati, J., Guiochon-Mantel, A., Rondard, P., Arnulf, I., Garcia-Pinero, A., Wolczynski, S., Brailly-Tabard, S., Bidet, M., Ramos-Arroyo, M., Mathieu, M., Lienhardt-Roussie, A., Morgan, G., Turki, Z., Bremont, C., Lespinasse, J., Du Boullay, H., Chabbert-Buffet, N., Jacquemont, S., Reach, G., De Talence, N., Tonella, P., Conrad, B., Despert, F., Delobel, B., Brue, T., Bouvattier, C., Cabrol, S., Pugeat, M., Murat, A., Bouchard, P., Hardelin, J. P., Dode, C., and Young, J. (2010). A comparative phenotypic study of kallmann syndrome patients carrying monoallelic and biallelic mutations in the prokineticin 2 or prokineticin receptor 2 genes. *J Clin Endocrinol Metab* **95**(2), 659-69.
- Sato, H., Takahashi, M., Ise, H., Yamada, A., Hirose, S., Tagawa, Y., Morimoto, H., Izawa, A., and Ikeda, U. (2006). Collagen synthesis is required for ascorbic acid-enhanced differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **342**(1), 107-12.
- Satoh, T., Cohen, H. T., and Katz, A. I. (1992). Intracellular signaling in the regulation of renal Na-K-ATPase. I. Role of cyclic AMP and phospholipase A2. *J Clin Invest* **89**(5), 1496-500.
- Saxen, L., and Sariola, H. (1987). Early organogenesis of the kidney. *Pediatr Nephrol* **1**(3), 385-92.
- Saxen, L., and Thesleff, I. (1992). Epithelial-mesenchymal interactions in murine organogenesis. *Ciba Found Symp* **165**, 183-93; discussion 193-8.
- Schnabel, K., Wu, C. C., Kurth, T., and Weidinger, G. (2011). Regeneration of cryoinjury induced necrotic heart lesions in zebrafish is associated with epicardial activation and cardiomyocyte proliferation. *PLoS One* **6**(4), e18503.
- Schulte, I., Schlueter, J., Abu-Issa, R., Brand, T., and Manner, J. (2007). Morphological and molecular left-right asymmetries in the development of the proepicardium: a comparative analysis on mouse and chick embryos. *Dev Dyn* **236**(3), 684-95.
- Schweitz, H., Bidard, J. N., and Lazdunski, M. (1990). Purification and pharmacological characterization of peptide toxins from the black mamba (*Dendroaspis polylepis*) venom. *Toxicon* **28**(7), 847-56.
- Schweitz, H., Pacaud, P., Diochot, S., Moinier, D., and Lazdunski, M. (1999). MIT(1), a black mamba toxin with a new and highly potent activity on intestinal contraction. *FEBS Lett* **461**(3), 183-8.

- Sekili, S., Jeroudi, M. O., Tang, X. L., Zughaib, M., Sun, J. Z., and Bolli, R. (1995). Effect of adenosine on myocardial 'stunning' in the dog. *Circ Res* **76**(1), 82-94.
- Selvetella, G., Hirsch, E., Notte, A., Tarone, G., and Lembo, G. (2004). Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: points of convergence and divergence. *Cardiovasc Res* **63**(3), 373-80.
- Sengbusch, J. K., He, W., Pinco, K. A., and Yang, J. T. (2002). Dual functions of [alpha]4[beta]1 integrin in epicardial development: initial migration and long-term attachment. *J Cell Biol* **157**(5), 873-82.
- Seta, K., and Sadoshima, J. (2003). Phosphorylation of tyrosine 319 of the angiotensin II type 1 receptor mediates angiotensin II-induced trans-activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **278**(11), 9019-26.
- Shaik, Z. P., Fifer, E. K., and Nowak, G. (2008). Akt activation improves oxidative phosphorylation in renal proximal tubular cells following nephrotoxicant injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **294**(2), F423-32.
- Shaw, J. L., Denison, F. C., Evans, J., Durno, K., Williams, A. R., Entrican, G., Critchley, H. O., Jabbour, H. N., and Horne, A. W. (2010). Evidence of prokineticin dysregulation in fallopian tube from women with ectopic pregnancy. *Fertil Steril* **94**(5), 1601-8 e1.
- Shi, Q., Rafii, S., Wu, M. H., Wijelath, E. S., Yu, C., Ishida, A., Fujita, Y., Kothari, S., Mohle, R., Sauvage, L. R., Moore, M. A., Storb, R. F., and Hammond, W. P. (1998). Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* **92**(2), 362-7.
- Shi, T., Papay, R. S., and Perez, D. M. (2012). alpha(1A)-adrenergic receptor differentially regulates STAT3 phosphorylation through PKC and PKCdelta in myocytes. *J Recept Signal Transduct Res* **32**(2), 76-86.
- Shinbrot, E., Peters, K. G., and Williams, L. T. (1994). Expression of the platelet-derived growth factor beta receptor during organogenesis and tissue differentiation in the mouse embryo. *Dev Dyn* **199**(3), 169-75.
- Shizukuda, Y., Buttrick, P. M., Geenen, D. L., Borczuk, A. C., Kitsis, R. N., and Sonnenblick, E. H. (1998). beta-adrenergic stimulation causes cardiocyte apoptosis: influence of tachycardia and hypertrophy. *Am J Physiol* **275**(3 Pt 2), H961-8.
- Shojaei, F., Singh, M., Thompson, J. D., and Ferrara, N. (2008). Role of Bv8 in neutrophil-dependent angiogenesis in a transgenic model of cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(7), 2640-5.
- Shojaei, F., Wu, X., Zhong, C., Yu, L., Liang, X. H., Yao, J., Blanchard, D., Bais, C., Peale, F. V., van Bruggen, N., Ho, C., Ross, J., Tan, M., Carano, R. A., Meng, Y. G., and Ferrara, N. (2007). Bv8 regulates myeloid-cell-dependent tumour angiogenesis. *Nature* **450**(7171), 825-31.
- Simpson, P. (1985). Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an alpha 1-adrenergic receptor and induction of beating through an alpha 1- and beta 1-adrenergic receptor interaction. Evidence for independent regulation of growth and beating. *Circ Res* **56**(6), 884-94.
- Simpson, P., McGrath, A., and Savion, S. (1982). Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circ Res* **51**(6), 787-801.
- Simpson, P. C., Kariya, K., Karns, L. R., Long, C. S., and Karliner, J. S. (1991). Adrenergic hormones and control of cardiac myocyte growth. *Mol Cell Biochem* **104**(1-2), 35-43.
- Singh, M. K., Li, Y., Li, S., Cobb, R. M., Zhou, D., Lu, M. M., Epstein, J. A., Morrissey, E. E., and Gruber, P. J. (2010). Gata4 and Gata5 cooperatively regulate cardiac myocyte proliferation in mice. *J Biol Chem* **285**(3), 1765-72.
- Singh, M. K., Lu, M. M., Massera, D., and Epstein, J. A. (2011). MicroRNA-processing enzyme Dicer is required in epicardium for coronary vasculature development. *J Biol Chem* **286**(47), 41036-45.

- Skorecki, K. L., Ballermann, B. J., Rennke, H. G., and Brenner, B. M. (1983). Angiotensin II receptor regulation in isolated renal glomeruli. *Fed Proc* **42**(14), 3064-70.
- Small, K. M., Wagoner, L. E., Levin, A. M., Kardia, S. L., and Liggett, S. B. (2002). Synergistic polymorphisms of beta1- and alpha2C-adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. *N Engl J Med* **347**(15), 1135-42.
- Smart, N., Bollini, S., Dube, K. N., Vieira, J. M., Zhou, B., Davidson, S., Yellon, D., Riegler, J., Price, A. N., Lythgoe, M. F., Pu, W. T., and Riley, P. R. (2011). De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature* **474**(7353), 640-4.
- Smart, N., Risebro, C. A., Melville, A. A., Moses, K., Schwartz, R. J., Chien, K. R., and Riley, P. R. (2007). Thymosin beta-4 is essential for coronary vessel development and promotes neovascularization via adult epicardium. *Ann N Y Acad Sci* **1112**, 171-88.
- Smith, C. L., Baek, S. T., Sung, C. Y., and Tallquist, M. D. (2011). Epicardial-derived cell epithelial-to-mesenchymal transition and fate specification require PDGF receptor signaling. *Circ Res* **108**(12), e15-26.
- Smith, G. H. (2006). Mammary stem cells come of age, prospectively. *Trends Mol Med* **12**(7), 287-9.
- Smrcka, A. V., Oestreich, E. A., Blaxall, B. C., and Dirksen, R. T. (2007). EPAC regulation of cardiac EC coupling. *J Physiol* **584**(Pt 3), 1029-31.
- Soga, T., Matsumoto, S., Oda, T., Saito, T., Hiyama, H., Takasaki, J., Kamohara, M., Ohishi, T., Matsushime, H., and Furuichi, K. (2002). Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochim Biophys Acta* **1579**(2-3), 173-9.
- Soifer, N. E., Van Why, S. K., Ganz, M. B., Kashgarian, M., Siegel, N. J., and Stewart, A. F. (1993). Expression of parathyroid hormone-related protein in the rat glomerulus and tubule during recovery from renal ischemia. *J Clin Invest* **92**(6), 2850-7.
- Soltis, A. R., and Saucerman, J. J. (2010). Synergy between CaMKII substrates and beta-adrenergic signaling in regulation of cardiac myocyte Ca(2+) handling. *Biophys J* **99**(7), 2038-47.
- Son, N. H., Park, T. S., Yamashita, H., Yokoyama, M., Huggins, L. A., Okajima, K., Homma, S., Szabolcs, M. J., Huang, L. S., and Goldberg, I. J. (2007). Cardiomyocyte expression of PPARgamma leads to cardiac dysfunction in mice. *J Clin Invest* **117**(10), 2791-801.
- Soriano, P. (1994). Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev* **8**(16), 1888-96.
- Spruill, L. S., and McDermott, P. J. (2006). Regulation of c-jun mRNA expression in adult cardiocytes by MAP kinase interacting kinase-1 (MNK1). *FASEB J* **20**(12), 2133-5.
- Spurney, R. F., Onorato, J. J., Albers, F. J., and Coffman, T. M. (1993). Thromboxane binding and signal transduction in rat glomerular mesangial cells. *Am J Physiol* **264**(2 Pt 2), F292-9.
- Sridurongrit, S., Larsson, J., Schwartz, R., Ruiz-Lozano, P., and Kaartinen, V. (2008). Signaling via the Tgf-beta type I receptor Alk5 in heart development. *Dev Biol* **322**(1), 208-18.
- Stuckmann, I., Evans, S., and Lassar, A. B. (2003). Erythropoietin and retinoic acid, secreted from the epicardium, are required for cardiac myocyte proliferation. *Dev Biol* **255**(2), 334-49.
- Sturzu, A. C., and Wu, S. M. (2011). Developmental and regenerative biology of multipotent cardiovascular progenitor cells. *Circ Res* **108**(3), 353-64.
- Su, M. T., Lin, S. H., Lee, I. W., Chen, Y. C., Hsu, C. C., Pan, H. A., and Kuo, P. L. (2010). Polymorphisms of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor gene

- and its receptor genes are associated with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* **25**(11), 2923-30.
- Sucov, H. M., Dyson, E., Gumeringer, C. L., Price, J., Chien, K. R., and Evans, R. M. (1994). RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev* **8**(9), 1007-18.
- Sugden, P. H. (2003a). An overview of endothelin signaling in the cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol* **35**(8), 871-86.
- Sugden, P. H. (2003b). Ras, Akt, and mechanotransduction in the cardiac myocyte. *Circ Res* **93**(12), 1179-92.
- Sugi, Y., Ito, N., Szebenyi, G., Myers, K., Fallon, J. F., Mikawa, T., and Markwald, R. R. (2003). Fibroblast growth factor (FGF)-4 can induce proliferation of cardiac cushion mesenchymal cells during early valve leaflet formation. *Dev Biol* **258**(2), 252-63.
- Suri, C., Jones, P. F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P. C., Davis, S., Sato, T. N., and Yancopoulos, G. D. (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* **87**(7), 1171-80.
- Sutton, T. A., and Molitoris, B. A. (1998). Mechanisms of cellular injury in ischemic acute renal failure. *Semin Nephrol* **18**(5), 490-7.
- Suzuki, J., Matsubara, H., Urakami, M., and Inada, M. (1993). Rat angiotensin II (type 1A) receptor mRNA regulation and subtype expression in myocardial growth and hypertrophy. *Circ Res* **73**(3), 439-47.
- Swynghedauw, B. (1999). Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* **79**(1), 215-62.
- Takagi, H., Matsui, Y., and Sadoshima, J. (2007). The role of autophagy in mediating cell survival and death during ischemia and reperfusion in the heart. *Antioxid Redox Signal* **9**(9), 1373-81.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**(4), 663-76.
- Takahashi, T., Lord, B., Schulze, P. C., Fryer, R. M., Sarang, S. S., Gullans, S. R., and Lee, R. T. (2003). Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation* **107**(14), 1912-6.
- Takahashi, T., Takahashi, K., Gerety, S., Wang, H., Anderson, D. J., and Daniel, T. O. (2001). Temporally compartmentalized expression of ephrin-B2 during renal glomerular development. *J Am Soc Nephrol* **12**(12), 2673-82.
- Takakura, N., Yoshida, H., Ogura, Y., Kataoka, H., and Nishikawa, S. (1997). PDGFR alpha expression during mouse embryogenesis: immunolocalization analyzed by whole-mount immunohistostaining using the monoclonal anti-mouse PDGFR alpha antibody APA5. *J Histochem Cytochem* **45**(6), 883-93.
- Takebayashi-Suzuki, K., Yanagisawa, M., Gourdie, R. G., Kanzawa, N., and Mikawa, T. (2000). In vivo induction of cardiac Purkinje fiber differentiation by coexpression of preproendothelin-1 and endothelin converting enzyme-1. *Development* **127**(16), 3523-32.
- Takemoto, M., He, L., Norlin, J., Patrakka, J., Xiao, Z., Petrova, T., Bondjers, C., Asp, J., Wallgard, E., Sun, Y., Samuelsson, T., Mostad, P., Lundin, S., Miura, N., Sado, Y., Alitalo, K., Quaggin, S. E., Tryggvason, K., and Betsholtz, C. (2006). Large-scale identification of genes implicated in kidney glomerulus development and function. *EMBO J* **25**(5), 1160-74.
- Tanaka, T., Kojima, I., Ohse, T., Ingelfinger, J. R., Adler, S., Fujita, T., and Nangaku, M. (2005). Cobalt promotes angiogenesis via hypoxia-inducible factor and protects tubulointerstitium in the remnant kidney model. *Lab Invest* **85**(10), 1292-307.

- Teekakirikul, P., Eminaga, S., Toka, O., Alcalai, R., Wang, L., Wakimoto, H., Naylor, M., Konno, T., Gorham, J. M., Wolf, C. M., Kim, J. B., Schmitt, J. P., Molkentin, J. D., Norris, R. A., Tager, A. M., Hoffman, S. R., Markwald, R. R., Seidman, C. E., and Seidman, J. G. (2010). Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf-beta. *J Clin Invest* **120**(10), 3520-9.
- Tevosian, S. G., Deconinck, A. E., Tanaka, M., Schinke, M., Litovsky, S. H., Izumo, S., Fujiwara, Y., and Orkin, S. H. (2000). FOG-2, a cofactor for GATA transcription factors, is essential for heart morphogenesis and development of coronary vessels from epicardium. *Cell* **101**(7), 729-39.
- Thesleff, I., Vaahtokari, A., Kettunen, P., and Aberg, T. (1995). Epithelial-mesenchymal signaling during tooth development. *Connect Tissue Res* **32**(1-4), 9-15.
- Thiery, J. P., and Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(2), 131-42.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**(5391), 1145-7.
- Tiberi, F., Tropea, A., Romani, F., Apa, R., Marana, R., and Lanzone, A. (2010). Prokineticin 1, homeobox A10, and progesterone receptor messenger ribonucleic acid expression in primary cultures of endometrial stromal cells isolated from endometrium of healthy women and from eutopic endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril* **94**(7), 2558-63.
- Tilley, D. G., Kim, I. M., Patel, P. A., Violin, J. D., and Rockman, H. A. (2009). beta-Arrestin mediates beta1-adrenergic receptor-epidermal growth factor receptor interaction and downstream signaling. *J Biol Chem* **284**(30), 20375-86.
- Tilley, D. G., Nguyen, A. D., and Rockman, H. A. (2010). Troglitazone stimulates beta-arrestin-dependent cardiomyocyte contractility via the angiotensin II type 1A receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **396**(4), 921-6.
- Tilley, D. G., and Rockman, H. A. (2006). Role of beta-adrenergic receptor signaling and desensitization in heart failure: new concepts and prospects for treatment. *Expert Rev Cardiovasc Ther* **4**(3), 417-32.
- Tomanek, R. J., Ishii, Y., Holifield, J. S., Sjogren, C. L., Hansen, H. K., and Mikawa, T. (2006). VEGF family members regulate myocardial tubulogenesis and coronary artery formation in the embryo. *Circ Res* **98**(7), 947-53.
- Toyofuku, T., Kurzydowski, K., Tada, M., and MacLennan, D. H. (1993). Identification of regions in the Ca(2+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum that affect functional association with phospholamban. *J Biol Chem* **268**(4), 2809-15.
- Turban, S., Wang, X. Y., and Knepper, M. A. (2003). Regulation of NHE3, NKCC2, and NCC abundance in kidney during aldosterone escape phenomenon: role of NO. *Am J Physiol Renal Physiol* **285**(5), F843-51.
- Ullrich, N. D., Valdivia, H. H., and Niggli, E. (2012). PKA phosphorylation of cardiac ryanodine receptor modulates SR luminal Ca(2+) sensitivity. *J Mol Cell Cardiol* **53**(1), 33-42.
- Ungerer, M., Bohm, M., Elce, J. S., Erdmann, E., and Lohse, M. J. (1993). Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* **87**(2), 454-63.
- Urayama, K., Dedeoglu, D. B., Guilini, C., Frantz, S., Ertl, G., Messaddeq, N., and Nebigil, C. G. (2009). Transgenic myocardial overexpression of prokineticin receptor-2 (GPR73b) induces hypertrophy and capillary vessel leakage. *Cardiovasc Res* **81**(1), 28-37.

- Urayama, K., Guilini, C., Messaddeq, N., Hu, K., Steenman, M., Kurose, H., Ert, G., and Nebigil, C. G. (2007). The prokineticin receptor-1 (GPR73) promotes cardiomyocyte survival and angiogenesis. *FASEB J* **21**(11), 2980-93.
- Urayama, K., Guilini, C., Turkeri, G., Takir, S., Kurose, H., Messaddeq, N., Dierich, A., and Nebigil, C. G. (2008). Prokineticin receptor-1 induces neovascularization and epicardial-derived progenitor cell differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**(5), 841-9.
- Urbanek, K., Cesselli, D., Rota, M., Nascimbene, A., De Angelis, A., Hosoda, T., Bearzi, C., Boni, A., Bolli, R., Kajstura, J., Anversa, P., and Leri, A. (2006). Stem cell niches in the adult mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(24), 9226-31.
- van Amerongen, M. J., Harmsen, M. C., van Rooijen, N., Petersen, A. H., and van Luyn, M. J. (2007). Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *Am J Pathol* **170**(3), 818-29.
- Van den Akker, N. M., Winkel, L. C., Nisancioglu, M. H., Maas, S., Wisse, L. J., Armulik, A., Poelmann, R. E., Lie-Venema, H., Betsholtz, C., and Gittenberger-de Groot, A. C. (2008). PDGF-B signaling is important for murine cardiac development: its role in developing atrioventricular valves, coronaries, and cardiac innervation. *Dev Dyn* **237**(2), 494-503.
- van Koppen, A., Joles, J. A., van Balkom, B. W., Lim, S. K., de Kleijn, D., Giles, R. H., and Verhaar, M. C. (2012). Human embryonic mesenchymal stem cell-derived conditioned medium rescues kidney function in rats with established chronic kidney disease. *PLoS One* **7**(6), e38746.
- Van Rhee AM, J. K. (1996). Molecular Architecture of G Protein-Coupled Receptors. *Drug Dev Res* **37**(1).
- van Tuyn, J., Atsma, D. E., Winter, E. M., van der Velde-van Dijke, I., Pijnappels, D. A., Bax, N. A., Knaan-Shanzer, S., Gittenberger-de Groot, A. C., Poelmann, R. E., van der Laarse, A., van der Wall, E. E., Schalij, M. J., and de Vries, A. A. (2007). Epicardial cells of human adults can undergo an epithelial-to-mesenchymal transition and obtain characteristics of smooth muscle cells in vitro. *Stem Cells* **25**(2), 271-8.
- Vasa, M., Fichtlscherer, S., Aicher, A., Adler, K., Urbich, C., Martin, H., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S. (2001). Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* **89**(1), E1-7.
- Vaughan, M. R., and Quaggin, S. E. (2008). How do mesangial and endothelial cells form the glomerular tuft? *J Am Soc Nephrol* **19**(1), 24-33.
- Vega-Hernandez, M., Kovacs, A., De Langhe, S., and Ornitz, D. M. (2011). FGF10/FGFR2b signaling is essential for cardiac fibroblast development and growth of the myocardium. *Development* **138**(15), 3331-40.
- Vega, R. B., Harrison, B. C., Meadows, E., Roberts, C. R., Papst, P. J., Olson, E. N., and McKinsey, T. A. (2004). Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5. *Mol Cell Biol* **24**(19), 8374-85.
- Villegas, G., Lange-Sperandio, B., and Tufro, A. (2005). Autocrine and paracrine functions of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal tubular epithelial cells. *Kidney Int* **67**(2), 449-57.
- Violin, J. D., DeWire, S. M., Yamashita, D., Rominger, D. H., Nguyen, L., Schiller, K., Whalen, E. J., Gowen, M., and Lark, M. W. (2010). Selectively engaging beta-arrestins at the angiotensin II type 1 receptor reduces blood pressure and increases cardiac performance. *J Pharmacol Exp Ther* **335**(3), 572-9.

- Viragh, S., and Challice, C. E. (1973). Origin and differentiation of cardiac muscle cells in the mouse. *J Ultrastruct Res* **42**(1), 1-24.
- Viragh, S., and Challice, C. E. (1981). The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. *Anat Rec* **201**(1), 157-68.
- Viragh, S., Gittenberger-de Groot, A. C., Poelmann, R. E., and Kalman, F. (1993). Early development of quail heart epicardium and associated vascular and glandular structures. *Anat Embryol (Berl)* **188**(4), 381-93.
- von Gise, A., Zhou, B., Honor, L. B., Ma, Q., Petryk, A., and Pu, W. T. (2011). WT1 regulates epicardial epithelial to mesenchymal transition through beta-catenin and retinoic acid signaling pathways. *Dev Biol* **356**(2), 421-31.
- Vrancken Peeters, M. P., Gittenberger-de Groot, A. C., Mentink, M. M., Hungerford, J. E., Little, C. D., and Poelmann, R. E. (1997). The development of the coronary vessels and their differentiation into arteries and veins in the embryonic quail heart. *Dev Dyn* **208**(3), 338-48.
- Vrancken Peeters, M. P., Gittenberger-de Groot, A. C., Mentink, M. M., and Poelmann, R. E. (1999). Smooth muscle cells and fibroblasts of the coronary arteries derive from epithelial-mesenchymal transformation of the epicardium. *Anat Embryol (Berl)* **199**(4), 367-78.
- Vrancken Peeters, M. P., Mentink, M. M., Poelmann, R. E., and Gittenberger-de Groot, A. C. (1995). Cytokeratins as a marker for epicardial formation in the quail embryo. *Anat Embryol (Berl)* **191**(6), 503-8.
- Vyas, S. J., Eichberg, J., and Lokhandwala, M. F. (1992). Characterization of receptors involved in dopamine-induced activation of phospholipase-C in rat renal cortex. *J Pharmacol Exp Ther* **260**(1), 134-9.
- Waddell, J. M., Evans, J., Jabbour, H. N., and Denison, F. C. (2011). CTGF expression is up-regulated by PROK1 in early pregnancy and influences HTR-8/Svneo cell adhesion and network formation. *Hum Reprod* **26**(1), 67-75.
- Wagner, K. D., Wagner, N., Bondke, A., Nafz, B., Flemming, B., Theres, H., and Scholz, H. (2002). The Wilms' tumor suppressor Wt1 is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction. *FASEB J* **16**(9), 1117-9.
- Wagner, N., Wagner, K. D., Theres, H., Englert, C., Schedl, A., and Scholz, H. (2005). Coronary vessel development requires activation of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilms' tumor transcription factor Wt1. *Genes Dev* **19**(21), 2631-42.
- Wakasaki, H., Koya, D., Schoen, F. J., Jirousek, M. R., Ways, D. K., Hoit, B. D., Walsh, R. A., and King, G. L. (1997). Targeted overexpression of protein kinase C beta2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(17), 9320-5.
- Waldo, K. L., Willner, W., and Kirby, M. L. (1990). Origin of the proximal coronary artery stems and a review of ventricular vascularization in the chick embryo. *Am J Anat* **188**(2), 109-20.
- Wang, H., Grant, J. E., Doede, C. M., Sadayappan, S., Robbins, J., and Walker, J. W. (2006a). PKC-betaII sensitizes cardiac myofilaments to Ca²⁺ by phosphorylating troponin I on threonine-144. *J Mol Cell Cardiol* **41**(5), 823-33.
- Wang, X., Hu, Q., Nakamura, Y., Lee, J., Zhang, G., From, A. H., and Zhang, J. (2006b). The role of the sca-1+/CD31- cardiac progenitor cell population in postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells* **24**(7), 1779-88.
- Wang, Y., Huang, C. X., Cheng, J. S., Wang, H., Wu, W. J., Liao, W. Q., Wen, J. Y., Ke, Y. N., and Zheng, J. G. (2010). [Effect of ischemia preconditioning on pro- and anti-angiogenic molecule expression and functional arteries formation]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* **38**(9), 819-22.

- Wang, Y., Tripathi, P., Guo, Q., Coussens, M., Ma, L., and Chen, F. (2009). Cre/lox recombination in the lower urinary tract. *Genesis* **47**(6), 409-13.
- Ward, N. L., Van Slyke, P., Sturk, C., Cruz, M., and Dumont, D. J. (2004). Angiopoietin 1 expression levels in the myocardium direct coronary vessel development. *Dev Dyn* **229**(3), 500-9.
- Watson, R. P., Lilley, E., Panesar, M., Bhalay, G., Langridge, S., Tian, S. S., McClenaghan, C., Ropenga, A., Zeng, F., and Nash, M. S. (2012). Increased prokineticin 2 expression in gut inflammation: role in visceral pain and intestinal ion transport. *Neurogastroenterol Motil* **24**(1), 65-75, e12.
- Watt, A. J., Battle, M. A., Li, J., and Duncan, S. A. (2004). GATA4 is essential for formation of the proepicardium and regulates cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(34), 12573-8.
- Wechselberger, C., Puglisi, R., Engel, E., Lepperdinger, G., Boitani, C., and Kreil, G. (1999). The mammalian homologues of frog Bv8 are mainly expressed in spermatocytes. *FEBS Lett* **462**(1-2), 177-81.
- Weeke-Klimp, A., Bax, N. A., Bellu, A. R., Winter, E. M., Vrolijk, J., Plantinga, J., Maas, S., Brinker, M., Mahtab, E. A., Gittenberger-de Groot, A. C., van Luyn, M. J., Harmsen, M. C., and Lie-Venema, H. (2010). Epicardium-derived cells enhance proliferation, cellular maturation and alignment of cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* **49**(4), 606-16.
- Weinman, E. J., Biswas, R., Steplock, D., Douglass, T. S., Cunningham, R., and Shenolikar, S. (2010). Sodium-hydrogen exchanger regulatory factor 1 (NHERF-1) transduces signals that mediate dopamine inhibition of sodium-phosphate co-transport in mouse kidney. *J Biol Chem* **285**(18), 13454-60.
- Wess, J. (1993). Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. *Trends Pharmacol Sci* **14**(8), 308-13.
- Wess, J. (1997). G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J* **11**(5), 346-54.
- Wessels, A., van den Hoff, M. J., Adamo, R. F., Phelps, A. L., Lockhart, M. M., Sauls, K., Briggs, L. E., Norris, R. A., van Wijk, B., Perez-Pomares, J. M., Dettman, R. W., and Burch, J. B. (2012). Epicardially derived fibroblasts preferentially contribute to the parietal leaflets of the atrioventricular valves in the murine heart. *Dev Biol* **366**(2), 111-24.
- Wetterwald, A., Hoffstetter, W., Cecchini, M. G., Lanske, B., Wagner, C., Fleisch, H., and Atkinson, M. (1996). Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes. *Bone* **18**(2), 125-32.
- Wilkins, B. J., and Molkentin, J. D. (2002). Calcineurin and cardiac hypertrophy: where have we been? Where are we going? *J Physiol* **541**(Pt 1), 1-8.
- Winter, E. M., Grauss, R. W., Hogers, B., van Tuyn, J., van der Geest, R., Lie-Venema, H., Steijn, R. V., Maas, S., DeRuiter, M. C., deVries, A. A., Steendijk, P., Doevendans, P. A., van der Laarse, A., Poelmann, R. E., Schalij, M. J., Atsma, D. E., and Gittenberger-de Groot, A. C. (2007). Preservation of left ventricular function and attenuation of remodeling after transplantation of human epicardium-derived cells into the infarcted mouse heart. *Circulation* **116**(8), 917-27.
- Wittner, M., Di Stefano, A., Mandon, B., Roinel, N., and de Rouffignac, C. (1991). Stimulation of NaCl reabsorption by antidiuretic hormone in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of the mouse. *Pflugers Arch* **419**(2), 212-4.
- Wu, A. H., Apple, F. S., Gibler, W. B., Jesse, R. L., Warshaw, M. M., and Valdes, R., Jr. (1999a). National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory

- Practice: recommendations for the use of cardiac markers in coronary artery diseases. *Clin Chem* **45**(7), 1104-21.
- Wu, D. C., Boyd, A. S., and Wood, K. J. (2007). Embryonic stem cell transplantation: potential applicability in cell replacement therapy and regenerative medicine. *Front Biosci* **12**, 4525-35.
- Wu, H., Lee, S. H., Gao, J., Liu, X., and Iruela-Arispe, M. L. (1999b). Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development* **126**(16), 3597-605.
- Wynn, T. A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* **214**(2), 199-210.
- Xiang, Y., and Kobilka, B. K. (2003). Myocyte adrenoceptor signaling pathways. *Science* **300**(5625), 1530-2.
- Xiao, K., McClatchy, D. B., Shukla, A. K., Zhao, Y., Chen, M., Shenoy, S. K., Yates, J. R., 3rd, and Lefkowitz, R. J. (2007). Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(29), 12011-6.
- Xu, J., Ismat, F. A., Wang, T., Lu, M. M., Antonucci, N., and Epstein, J. A. (2009). Cardiomyocyte-specific loss of neurofibromin promotes cardiac hypertrophy and dysfunction. *Circ Res* **105**(3), 304-11.
- Yang, J. T., Rayburn, H., and Hynes, R. O. (1995). Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development* **121**(2), 549-60.
- Yang, L., Doshi, D., Morrow, J., Katchman, A., Chen, X., and Marx, S. O. (2009). Protein kinase C isoforms differentially phosphorylate Ca(v)1.2 alpha(1c). *Biochemistry* **48**(28), 6674-83.
- Yang, L., Soonpaa, M. H., Adler, E. D., Roepke, T. K., Kattman, S. J., Kennedy, M., Henckaerts, E., Bonham, K., Abbott, G. W., Linden, R. M., Field, L. J., and Keller, G. M. (2008). Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR⁺ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* **453**(7194), 524-8.
- Yang, L. L., Gros, R., Kabir, M. G., Sadi, A., Gotlieb, A. I., Husain, M., and Stewart, D. J. (2004). Conditional cardiac overexpression of endothelin-1 induces inflammation and dilated cardiomyopathy in mice. *Circulation* **109**(2), 255-61.
- Yeh, E. T., Zhang, S., Wu, H. D., Korbling, M., Willerson, J. T., and Estrov, Z. (2003). Transdifferentiation of human peripheral blood CD34⁺-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation* **108**(17), 2070-3.
- Yoon, Y. S., Park, J. S., Tkebuchava, T., Luedeman, C., and Losordo, D. W. (2004). Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. *Circulation* **109**(25), 3154-7.
- Young, M. E., Guthrie, P. H., Razeghi, P., Leighton, B., Abbasi, S., Patil, S., Youker, K. A., and Taegtmeyer, H. (2002). Impaired long-chain fatty acid oxidation and contractile dysfunction in the obese Zucker rat heart. *Diabetes* **51**(8), 2587-95.
- Zamora, M., Manner, J., and Ruiz-Lozano, P. (2007). Epicardium-derived progenitor cells require beta-catenin for coronary artery formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(46), 18109-14.
- Zaruba, M. M., and Franz, W. M. (2010). Role of the SDF-1-CXCR4 axis in stem cell-based therapies for ischemic cardiomyopathy. *Expert Opin Biol Ther* **10**(3), 321-35.
- Zeisberg, E. M., Potenta, S. E., Sugimoto, H., Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2008). Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* **19**(12), 2282-7.

- Zeng, B., Ren, X. F., Cao, F., Zhou, X. Y., and Zhang, J. (2011). Developmental patterns and characteristics of epicardial cell markers Tbx18 and Wt1 in murine embryonic heart. *J Biomed Sci* **18**, 67.
- Zhai, P., Galeotti, J., Liu, J., Holle, E., Yu, X., Wagner, T., and Sadoshima, J. (2006). An angiotensin II type 1 receptor mutant lacking epidermal growth factor receptor transactivation does not induce angiotensin II-mediated cardiac hypertrophy. *Circ Res* **99**(5), 528-36.
- Zhang, C., Ng, K. L., Li, J. D., He, F., Anderson, D. J., Sun, Y. E., and Zhou, Q. Y. (2007a). Prokineticin 2 is a target gene of proneural basic helix-loop-helix factors for olfactory bulb neurogenesis. *J Biol Chem* **282**(10), 6917-21.
- Zhang, C., Truong, K. K., and Zhou, Q. Y. (2009). Efferent projections of prokineticin 2 expressing neurons in the mouse suprachiasmatic nucleus. *PLoS One* **4**(9), e7151.
- Zhang, R., Zhao, J., Mandveno, A., and Potter, J. D. (1995). Cardiac troponin I phosphorylation increases the rate of cardiac muscle relaxation. *Circ Res* **76**(6), 1028-35.
- Zhang, T., Kohlhaas, M., Backs, J., Mishra, S., Phillips, W., Dybkova, N., Chang, S., Ling, H., Bers, D. M., Maier, L. S., Olson, E. N., and Brown, J. H. (2007b). CaMKII δ isoforms differentially affect calcium handling but similarly regulate HDAC/MEF2 transcriptional responses. *J Biol Chem* **282**(48), 35078-87.
- Zhao, Y., Ransom, J. F., Li, A., Vedantham, V., von Drehle, M., Muth, A. N., Tsuchihashi, T., McManus, M. T., Schwartz, R. J., and Srivastava, D. (2007). Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* **129**(2), 303-17.
- Zhou, B., Honor, L. B., He, H., Ma, Q., Oh, J. H., Butterfield, C., Lin, R. Z., Melero-Martin, J. M., Dolmatova, E., Duffy, H. S., Gise, A., Zhou, P., Hu, Y. W., Wang, G., Zhang, B., Wang, L., Hall, J. L., Moses, M. A., McGowan, F. X., and Pu, W. T. (2011). Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *J Clin Invest* **121**(5), 1894-904.
- Zhou, B., Ma, Q., Rajagopal, S., Wu, S. M., Domian, I., Rivera-Feliciano, J., Jiang, D., von Gise, A., Ikeda, S., Chien, K. R., and Pu, W. T. (2008a). Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* **454**(7200), 109-13.
- Zhou, B., von Gise, A., Ma, Q., Hu, Y. W., and Pu, W. T. (2010). Genetic fate mapping demonstrates contribution of epicardium-derived cells to the annulus fibrosis of the mammalian heart. *Dev Biol* **338**(2), 251-61.
- Zhou, B., von Gise, A., Ma, Q., Rivera-Feliciano, J., and Pu, W. T. (2008b). Nkx2-5- and Isl1-expressing cardiac progenitors contribute to proepicardium. *Biochem Biophys Res Commun* **375**(3), 450-3.
- Zuk, A., Bonventre, J. V., Brown, D., and Matlin, K. S. (1998). Polarity, integrin, and extracellular matrix dynamics in the postischemic rat kidney. *Am J Physiol* **275**(3 Pt 1), C711-31.

ANNEXE

1. Boulberdaa M *et al.* Genetic inactivation of prokinetidin receptor-1 leads to heart and kidney disorders. *Artheroscler Thromb Vasc Bio*, 2011 Apr, 31 (4): 842-850;
2. Boulberdaa M *et al.* Genetic inactivation of prokineticin receptor-1 signaling in cardiovascular and kidney function. *Cardiovasc Res*. 2011 Sept 29.