



HAL
open science

Rôles des gènes $PPAR_{\beta/\delta}$, $Wt1$, $Cyp51$ et $Dnmt2$ dans l'angiogenèse et la fonction cardiaque chez la souris adulte saine et dans un modèle d'infarctus du myocarde

Delphine Baudouy

► To cite this version:

Delphine Baudouy. Rôles des gènes $PPAR_{\beta/\delta}$, $Wt1$, $Cyp51$ et $Dnmt2$ dans l'angiogenèse et la fonction cardiaque chez la souris adulte saine et dans un modèle d'infarctus du myocarde. Sciences agricoles. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2016. Français. NNT : 2016AZUR4148 . tel-01643689

HAL Id: tel-01643689

<https://theses.hal.science/tel-01643689>

Submitted on 21 Nov 2017

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

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

École doctorale Sciences de la Vie et de la Santé
Unité de recherche : Institut de Biologie de Valrose

Thèse de doctorat

Présentée en vue de l'obtention du
grade de docteur en Sciences de la Vie et de la Santé
Mention Interactions moléculaires et cellulaires
de
L'UNIVERSITE COTE D'AZUR

par
Delphine BAUDOUY

Rôles des gènes *PPAR β/δ* , *Wt1*, *Cyp51* et
Dnmt2 dans l'angiogenèse et la fonction
cardiaque chez la souris adulte saine et dans
un modèle d'infarctus du myocarde

Dirigée par Kay-Dietrich WAGNER

Soutenue le 15 Décembre 2016
Devant le jury composé de :

Anne	DUTOUR	Professeur,	Université d'Aix Marseille	Rapporteur
Emile	FERRARI	Professeur,	Université Côte d'Azur	Président de jury
Lucile	MIQUEROL	Docteur CR1,	Université d'Aix Marseille	Rapporteur
Kay-Dietrich	WAGNER	Docteur DR2,	Université Côte d'Azur	Directeur de thèse

“He who studies medicine without books sails an uncharted sea, but he who studies medicine without patients does not go to sea at all.”

William Osler (1849–1919)

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements s'adressent aux membres du jury

Mme le Professeur DUTOUR, je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail avec un regard bienveillant. C'est dans vos locaux marseillais que ma deuxième vie (étudiante et médecin à la fois) a commencé ! Il était juste que vous soyez présente pour clore cette parenthèse.

Mme le Docteur MIQUEROL, je vous remercie d'avoir accepté de siéger à ce jury et de juger mon travail de thèse.

Mr le Professeur FERRARI, je vous remercie d'avoir accepté de présider mon jury de thèse (une nouvelle fois !). Je vous suis reconnaissante de nous transmettre de façon quotidienne votre rigueur et de nous pousser à progresser sans cesse.

Doctor WAGNER, thank you for welcoming me in your team, for accepting the pros and cons of having a part-time student who is also a physician. It can be tiresome but useful as well... It was not always an easy collaboration, but it seems that we managed to pull through. Today is THE day.

A Maman, qui a déjà vécu un concours de PCEM1, un Examen National Classant de l'Internat, un Internat, une Thèse de Médecine... Mais que les études sont longues !

Merci pour ta patience, ton réconfort et tes bons petits plats !

Et merci de m'avoir soutenue dans les moments difficiles, ils ont été nombreux !

A Papa, qui m'aurait évidemment conseillée et encouragée dans cette folle aventure. Ton absence est particulièrement pesante dans ces moments.

A ma famille et mes amis, pour avoir toléré ma mauvaise humeur et mes rares visites ces derniers mois ! Beaucoup d'entre vous m'ont souvent demandé pourquoi je jouais les étudiantes attardées ? C'est peut-être l'épilogue... ;)

Cathy, "Wonder Woman", ton courage force l'admiration à chacune des épreuves de la vie. Je n'ai jamais douté de tes capacités. Ne lâche rien, nous allons dans le bon sens. Aujourd'hui, j'aurai le soutien supplémentaire de mes deux neveux ! Soyez sages Jojo et Titi !

Virginie, la varoise (c'est mieux que ton autre surnom), merci de ton soutien infaillible et de tes conseils précieux dans la dernière ligne droite (tu connais bien !). Un gros bisou à Léandre et à David, merci de m'avoir prêté la femme de votre vie.

Virginie, merci d'accepter de te séparer quelques heures de ta jeune merveille ! Je vais bientôt réapparaître dans le monde des vivants, à vos dépends !

Audrey, "Poulette", j'espère que tu pourras être présente. 2016 aura été une année chargée pour notre ancien groupe d'internat. 2017 va être un cru mémorable, je le pressens !

Chris, "Poulet", tu es un peu loin mais tu seras heureux que je soutienne ma thèse. Je vais enfin pouvoir arrêter de râler (en fait... non, j'aime trop ça !). Il va falloir continuer à me supporter. Rendez-vous quelque part sur la planète en 2017 !

Priscille, dommage que tu ne vois pas le grand final (je t'ai suffisamment saoulée avec ça). Ta gentillesse, ta rigueur et ton sens moral font de toi un excellent médecin. Cela a été un plaisir d'apprendre à te connaître et de travailler avec toi. Ne change rien ! See you soon in Nouméa (et ailleurs...)

A tous ceux que je ne nomme pas, mais que je n'oublie pas.

A mes maîtres et collaborateurs

Mr le Professeur Gibelin, je vous dois cette digression scientifique inattendue. Merci de m'avoir fait confiance dans ce projet initialement singulier.

Mr le Professeur Van Obberghen, merci d'avoir accueilli la "revenante" dans votre équipe et d'avoir gardé ouverte votre porte lorsque j'en avais besoin.

A mes collègues de l'IRCAN et l'IBV

- **Ana**, I will remember you as my first coworker in a scientific team, helping me understand very basic notions and discovering together new experimental procedures (poor mice...). Thank you again for your clear insight on our surroundings. It was my pleasure to meet such a kind woman and devoted mother. Take good care of Vida, Vuk and Marko. I know you enjoy your new life, working in a fantastic lab with great people in a beautiful city. See you soon in Zurich (don't count me out) !

- **Pascal**, Merci de ton aide quotidienne dans la difficile compréhension du monde scientifique (le choc initial est certainement passé). Merci d'avoir pris le temps de me guider pas à pas et d'avoir accepté mon "ignorance" scientifique. Et enfin, merci de ton soutien tout au long de ces années parfois difficiles de cohabitation médico-scientifique.

- **Charlotte, Patricia, Nadine, Virginie, Giulia, Nicole, Olivier, Jean, Guillaume**, merci de votre bonne humeur et pour ces trop rares moments de détente passés dans le labo.

A mes collègues du service de Cardiologie, trop nombreux pour être cités,

Merci de n'avoir pas cru que mes absences répétées du service étaient liées à une envie furieuse de fuir les patients ou d'aller siroter un cocktail sur la plage.

Merci de vous être interrogés sur ma santé mentale lorsque je vous expliquais faire des échographies cardiaques à des souris de 30 grammes dont le cœur bat à plus de 400 bpm, ou lorsque j'avouais avoir tenté de réanimer un rongeur récalcitrant qui n'avait pas toléré une anesthésie générale... Combien j'ai pu faire des choses surprenantes !

Et merci de m'avoir supportée (dans les 2 sens du terme) dans la "dernière ligne droite".

Ce travail a bénéficié du soutien de la Fondation pour la Recherche Médicale, et de la société Philips qui nous a gracieusement prêté le matériel d'échocardiographie.

PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES

ET FORMATIONS SUIVIES

- Inducible conditional vascular-specific overexpression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor beta/delta leads to rapid cardiac hypertrophy, Wagner KD, Vukolic A, Baudouy D, Michiels JF, Wagner N, PPAR Res 2016.

- Dnmt2/Trdmt1 as mediator of RNA Polymerase II transcriptional activity in cardiac growth, Ghanbarian H, Wagner N, Polo B, Baudouy D, Kiani J, Michiels JF, Cuzin F, Rassoulzadegan M, Wagner KD, PLoS One 2016.

- Echocardiographic and histological analyses of cardiac morphology in the mouse, D Baudouy, A Vukolic, N Wagner, KD Wagner, JOVE. Article en cours d'écriture, soumis avant la soutenance de la thèse.

- Présentation du travail de thèse : troisième prix de Communication orale aux Journées de l'Ecole Doctorale 2015

RESUME

La pathologie coronarienne est une cause majeure de morbi-mortalité dans le monde, motivant le développement de nouvelles thérapeutiques visant à limiter le remodelage cardiaque, à restaurer la fonction contractile et à stimuler la néovascularisation après un infarctus du myocarde (IDM).

Ce travail vise à étudier le rôle de plusieurs gènes impliqués dans l'angiogenèse et le métabolisme cardiaque, en modulant leur expression dans des conditions physiologiques ou en post-IDM. *PPAR β/δ* est un facteur transcriptionnel ubiquitaire supposé cardioprotecteur, contrôlant le métabolisme cellulaire. Le gène suppresseur de tumeur de Wilms *Wt1* participe à l'angiogenèse coronaire embryonnaire, de même qu'il est réexprimé dans l'endothélium coronaire en post-IDM. *Cyp51*, essentiel à la synthèse du cholestérol, joue un rôle majeur dans l'angiogenèse coronaire embryonnaire. Une modulation conditionnelle et spécifique à la lignée endothéliale de ces trois gènes a été réalisée chez des souris adultes saines soumises à une ligature coronaire permanente, mimant la survenue d'un IDM. Cette étude a permis d'observer le rôle du gène dans la réparation cardiaque. Les paramètres échocardiographiques structurels et fonctionnels ont été mesurés (avant et après IDM), des analyses (immuno)histochimiques ont été réalisées, et l'expression de gènes cibles potentiels a été comparée entre les souris de génotype modifié et les souris contrôles. Le quatrième gène étudié, *Dnmt2*, code pour une ARN méthyltransférase. Les conséquences de sa délétion constitutionnelle et globale n'ont été analysées que dans les conditions basales (en l'absence d'IDM).

Lorsque *PPAR β/δ* est surexprimé à l'état basal, une angiogenèse accrue est observée, responsable d'une hypertrophie ventriculaire gauche (VG) excentrique. En post-IDM, la surexpression de *PPAR β/δ* n'est plus cardioprotectrice : le remodelage VG pathologique majore l'extension de l'IDM. Cette discordance pose la question de la nature des signaux échangés entre cellules endothéliales et cardiomyocytes, justifiant une prudence sur l'utilisation d'agonistes de *PPAR β/δ* à visée cardioprotectrice.

L'invalidation endothéliale de *Wt1* n'est pas délétère à la fonction cardiaque basale. En revanche, elle se traduit en post-IDM par une diminution de l'angiogenèse coronaire, une fibrose interstitielle myocardique accrue, une hypertrophie et un remodelage VG amplifiés, à l'origine d'IDM plus étendus et d'une dysfonction contractile VG aggravée. Ces anomalies confirment les propriétés pro-angiogéniques et anti-

inflammatoires de *Wt1*, dont la réexpression endothéliale apparait essentielle à une réparation cardiaque de qualité.

L'expression endothéliale de *Cyp51* est nécessaire à l'organisation structurale et au fonctionnement normal du cœur, en l'absence de toute lésion myocardique. En effet, l'invalidation endothéliale de *Cyp51* se manifeste rapidement par une désorganisation des jonctions cellulaires endothéliales et une activation endothéliale, à l'origine d'une perméabilité vasculaire accrue, d'une fibrose périvasculaire. Ces anomalies aboutissent à un phénotype d'insuffisance cardiaque dilatée. Le défaut de synthèse du cholestérol et l'accumulation d'oxystérols toxiques, provenant de l'accumulation des précurseurs du lanostérol, peuvent être responsables d'un dysfonctionnement endothélial. La modification des interactions entre cellules endothéliales et cardiomyocytes peut déterminer la dysfonction contractile observée. Ainsi, *Cyp51* possède un rôle indispensable dans la structure et la fonction cardiaque de base, ouvrant le champ de son étude en post-IDM.

Enfin, le rôle de *Dnmt2* dans la différenciation cardiaque embryonnaire est démontré. De plus, son expression est indispensable afin de limiter l'hypertrophie cardiaque chez la souris adulte, via le contrôle de l'activité de l'ARN polymérase II par la méthylation de l'ARN non codant Rn7sk. Ces résultats montrent l'importance de la régulation transcriptionnelle par les petits ARNs nucléaires dans la cardiopathie hypertrophique, et affinent la compréhension de ses mécanismes physiopathologiques.

ABSTRACT

Coronary heart disease is a major cause of morbidity and mortality worldwide, explaining the increasing interest in new therapeutics targeting cardiac remodeling, neovascularization and cardiomyocyte renewal after myocardial infarction (MI).

The aim of this work is to study the role of several genes involved in angiogenesis and cardiac metabolism, in basal and post-MI conditions: transcriptional factor *PPAR β/δ* , Wilms' tumor suppressor *Wt1* (reexpressed in endothelial cells after MI), *Cyp51*, is required in cholesterol biosynthesis and cardiac embryogenesis, and *Dnmt2* coding for a RNA methyltransferase. In the first three models of adult healthy mice, endothelial gene expression was modulated. In a model of MI, obtained through permanent surgical ligation of coronary vessels, the consequences of gene modulation in cardiac repair were analysed. Echocardiographic structural and functional parameters were measured (before and after MI), (immuno) histochemistry analyses performed, and target gene expression compared between control mice and those with gene expression modification. *PPAR β/δ* basal overexpression resulted in an increased angiogenesis and cardiac eccentric hypertrophy. After MI, *PPAR β/δ* overexpression did not lead to cardioprotection: MI expanded due to poorer cardiac remodelling. This discrepancy raises the issue of communication between endothelial cells and cardiomyocytes. Thus, we should use *PPAR β/δ* agonists with great caution when cardiac repair is concerned.

Endothelial *Wt1* expression is not required for basal cardiac function. However, it appears essential for cardiac repair after MI : deletion was responsible for neovascularization impairment, increased interstitial fibrosis and cardiac hypertrophy. Poorer cardiac remodeling caused contractile dysfunction and MI enlargement in mice, which could not reexpress *Wt1* after MI, a testament to the gene's pro-angiogenic and anti-inflammatory properties. As a result, targeting *Wt1* expression appears to be interesting for optimizing neovascularization in cardiac repair.

Endothelial *Cyp51* expression is necessary for basal cardiac structure and function. After *Cyp51* deletion, membrane and cell junction disorganization were observed, causing increased vascular permeability, perivascular fibrosis and endothelium activation, resulting in dilated cardiomyopathy. The accumulation of toxic oxysterols or lack of cholesterol might account for endothelial dysfunction, and contractile dysfunction from

abnormal endothelial cells to cardiomyocytes signalling. Thus, Cyp51 is essential to basal cardiac structure and function.

Dnmt2 is important in cardiac embryonic development. In adult mice, *Dnmt2* deletion causes cardiac hypertrophy. Its role in cardiac hypertrophy regulation was demonstrated, through methylation of non-coding RNA Rn7sk and control of RNA polymerase II activity. Thus, small nuclear RNAs are important regulators of transcriptional activity in hypertrophic cardiomyopathy.

TABLE DES MATIERES

Remerciements.....	3
Publications, communications et formations suivies.....	6
Résumé.....	7
Abstract.....	9
Liste des Figures.....	15
Liste des abréviations.....	17
INTRODUCTION.....	20
1. Les maladies cardiovasculaires.....	21
a. Définitions.....	21
b. Epidémiologie.....	22
c. Impact économique.....	23
d. Problématique.....	24
2. Généralités sur l'appareil cardio-circulatoire.....	25
a. Généralités sur le cœur.....	25
i. Anatomie.....	25
ii. Embryogenèse cardiaque.....	25
iii. Histologie et cytologie.....	27
iv. Métabolisme cardiaque.....	28
b. Généralités sur les vaisseaux sanguins.....	33
i. La circulation sanguine.....	33
ii. Anatomie de la circulation coronaire.....	33
iii. Histologie et cytologie.....	34
iv. Embryogenèse des vaisseaux sanguins coronaires.....	34
v. Hémodynamique coronaire.....	35
c. Homéostasie cardio-vasculaire à l'âge adulte.....	36
i. Homéostasie cardiaque.....	36
ii. Angiogenèse coronaire postnatale.....	37
3. Le remodelage cardiaque.....	38
a. Définition.....	38
b. Choix du modèle murin d'infarctus du myocarde.....	38

c. Mécanismes de réparation post-IDM.....	39
i. Initiation de la phase inflammatoire.....	40
ii. Réponse inflammatoire.....	41
iii. Suppression et résolution de la réponse inflammatoire.....	42
iv. Phase de prolifération/réparation : réponse fibreuse.....	43
v. Phase de prolifération/réparation : néovascularisation.....	44
vi. Phase de maturation de la cicatrice fibreuse.....	47
vii. Facteurs modulant le remodelage cardiaque post-IDM.....	47
d. Mécanismes de régénération cardiaque.....	48
e. Perspectives thérapeutiques.....	49
i. Thérapie cellulaire.....	49
ii. Thérapie génique.....	51
iii. Facteurs de croissance.....	52
iv. Interactions des traitements cardiologiques avec les mécanismes de régénération endogène.....	52
4. Les différents gènes étudiés.....	53
a. <i>PPARβ/δ</i>.....	53
b. <i>Wt1</i>.....	55
c. <i>Cyp51</i>.....	58
d. <i>Dnmt2</i>.....	60
Problématique.....	61
MATERIEL ET METHODES.....	62
1. Animaux.....	63
2. Etude échocardiographique.....	64
3. Réalisation d'un infarctus du myocarde par ligature de l'IVA.....	66
4. Analyse histochimique.....	67
a. Etude structurale avec coloration à l'HES.....	67
b. Evaluation de la taille de l'infarctus du myocarde.....	67
c. Quantification de la fibrose myocardique et du remodelage vasculaire.....	67
5. Analyse immunohistochimique.....	69
6. Etude de la perméabilité membranaire.....	69

7. Analyse ultrastructurale en microscopie électronique à transmission.....	70
8. Analyse moléculaire.....	70
a. Expression de facteurs de prolifération, inflammatoires et pro-angiogéniques.....	70
b. Expériences de clonage et de transfection pour <i>Wt1</i>	71
9. Critères de non-inclusion et d'exclusion.....	71
10. Analyse statistique.....	72
RESULTATS ET DISCUSSION.....	73
Partie I : <i>PPARβ/δ</i>.....	74
Article 1	
Résultats.....	75
Discussion.....	76
Partie II : <i>Wt1</i>.....	79
Résultats.....	80
1. Conditions basales.....	81
a. Vérification de la recombinaison génétique.....	81
b. Masse cardiaque.....	81
c. Echocardiographie.....	81
2. Phase aiguë de l'IDM.....	83
a. Analyses histologiques.....	83
i. Poids du cœur et taille des cardiomyocytes.....	83
ii. Taille de l'IDM.....	83
b. Analyses immunohistochimiques.....	84
c. Analyses échocardiographiques.....	86
d. Identification des gènes cibles de <i>Wt1</i> : clonage et transfection.	86
3. Phase de réparation.....	88
a. Analyses histologiques.....	88
i. Poids du cœur et taille des cardiomyocytes.....	88
ii. Taille de l'IDM.....	88
iii. Fibrose myocardique interstitielle.....	89
b. Analyses immunohistochimiques : immunomarquage.....	90
c. Analyses échocardiographiques.....	92

d. Expression en ARN de gènes d'intérêt.....	94
Discussion.....	96
Partie III : <i>Cyp51</i>	100
Résultats	101
1. Condition basale précoce	102
a. Analyses histologiques.....	102
i. Poids du cœur.....	102
ii. Fibrose myocardique interstitielle.....	102
iii. Fibrose et dimensions vasculaires.....	103
b. Analyses échocardiographiques.....	104
c. Expression en ARN de gènes d'intérêt.....	105
2. Condition basale tardive	107
a. Analyses histologiques.....	107
i. Poids du cœur.....	107
ii. Fibrose myocardique interstitielle.....	107
iii. Fibrose vasculaire et périvasculaire.....	107
iv. Dimensions vasculaires.....	108
b. Immunomarquage de <i>Pecam-1</i>	109
c. Coloration au Bleu d'Evans.....	109
d. Analyse en microscopie électronique.....	110
e. Analyses échocardiographiques.....	111
f. Analyses moléculaires.....	113
Discussion.....	116
Partie IV : <i>Dnmt2</i>	121
Article 2	
Résultats	122
Discussion	123
DISCUSSION GENERALE	124
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	128
ANNEXES	150

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Métabolisme cardiaque normal

Figure 2 : Modifications du métabolisme cardiaque liées à l'ischémie

Figure 3 : Déroulement du processus de réparation cardiaque

Figure 4 : Voie de synthèse du cholestérol

Figure 5 : Absence d'effet de l'inactivation de *Wt1* ou de l'injection de tamoxifène sur la masse cardiaque en conditions basales.

Figure 6 : Absence d'effet de l'inactivation de *Wt1* ou de l'injection de tamoxifène sur les paramètres échocardiographiques en conditions basales.

Figure 7 : Hypertrophie cardiaque à la phase aiguë de l'IDM chez les souris présentant une inactivation endothéliale de *Wt1*

Figure 8 : Taille plus importante de l'IDM en cas d'inactivation de *Wt1*

Figure 9 : Densité vasculaire plus faible et ischémie plus sévère concomitantes d'une diminution de l'expression de *Wt1* en phase aiguë de l'IDM : immunomarquages de *Wt1*, *Pecam-1* et *Hif-1 α*

Figure 10 : Dilatation ventriculaire gauche débutante chez les souris ne réexprimant pas *Wt1*

Figure 11 : Hypertrophie cardiaque à la phase de réparation de l'IDM chez les souris présentant une inactivation endothéliale de *Wt1*

Figure 12 : Extension de l'IDM plus importante à la phase de réparation de l'IDM chez les souris ne réexprimant pas *Wt1*

Figure 13 : Fibrose myocardique interstitielle plus marquée chez les souris présentant une inactivation endothéliale de *Wt1*

Figure 14 : Densité vasculaire plus faible dans la zone bordante et la zone infarctée à la phase de réparation chez les souris invalidées pour le gène *Wt1*

Figure 15 : Hypoxie plus importante dans la zone bordante et la zone infarctée à la phase de réparation chez les souris invalidées pour le gène *Wt1*

Figure 16 : Dilatation et dysfonction systolique VG chez les souris contrôles à 3 semaines de l'IDM versus à 3 semaines de la "procédure-leurre"

Figure 17 : Dilatation et dysfonction contractile VG constatées à la phase de réparation en post-IDM chez les souris ne réexprimant pas *Wt1*

Figure 18 : Pas de modification précoce du taux de collagène interstitiel myocardique après invalidation endothéliale de *Cyp51*

Figure 19 : Taux de collagène vasculaire et périvasculaire plus important au troisième jour après invalidation endothéliale de *Cyp51*

Figure 20 : Absence d'effet précoce de l'invalidation de *Cyp51* sur les paramètres échocardiographiques en condition basale précoce

Figure 21 : Différentiel d'expression en ARN des gènes d'intérêt à 3 jours de l'invalidation de *Cyp51*

Figure 22 : Mesure du taux de collagène tissulaire myocardique dans les deux groupes de souris au septième jour après invalidation endothéliale de *Cyp51*

Figure 23 : Marquage membranaire endothélial coronaire de Pecam-1 plus faible à 7 jours de l'invalidation de *Cyp51*

Figure 24 : Perméabilité vasculaire augmentée en cas d'invalidation endothéliale de *Cyp51*

Figure 25 : Observation de vaisseaux capillaires coronaires en microscopie électronique.

Figure 26 : Dilatation et dysfonction systolique VG à 7 jours de l'invalidation de *Cyp51*

Figure 27 : Différentiel d'expression en ARN des gènes d'intérêt à 7 jours de l'invalidation de *Cyp51*

LISTE DES ABREVIATIONS

36B4 : Gène codant pour la phosphoprotéine acide ribosomale P0 (RPLP0)

AG : Acides Gras

Ang : Angiopoïétine

ARN : Acide Ribonucléique

ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire

ATP : Adénosine Triphosphate

CCM : Cerebral Cavernous Malformation

CD : Cluster de Différenciation

Cellule NK : cellule Natural Killer

Cited1 : CBP/p300-interacting transactivator with ED-rich tail 1

c-Kit : Tyrosine protein kinase Kit

Cre : Recombinase Cre

Cyp51 : Cytochrome P450 Lanosterol 14 α -demethylase

DIV : Diamètre Interne Ventriculaire

Dnmt2 : DNA-(cytosine-C5) methyltransferase

ER^{T2} : Modified Estrogen Receptor

FACS : Fluorescence-Activated Cell Sorting

FEVG : Fraction d'Ejection du Ventricule Gauche

FGF : Fibroblast Growth Factor

FR : Fraction de Raccourcissement du ventricule gauche

GAPDH : Glyceraldéhyde Phosphate Dehydrogenase

GFP : Green Fluorescent Protein

GLUT : Glucose Transporter

Heg : Heart of glass

HES : Coloration à l'Hématoxyline Eosine Safranine

HIF-1 α : Hypoxia Induced Factor-1alpha

HMGCoA réductase : Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase

IDM : Infarctus du Myocarde

IFN γ : Interféron gamma

IL : Interleukine

IVA : Artère Interventriculaire Antérieure
Lox : Locus de crossover chromosomique dans le bactériophage 1
MCV : Maladie Cardiovasculaire
MEC : Matrice Extra-cellulaire
MMP : Matrix Metalloproteinase
NO : Nitric Oxide
eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase
iNOS : inducible Nitric Oxide Synthase
Ntrk2 : TrkB : Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor type 2
PDGF α ou β : Platelet-derived growth factor subunit alpha ou beta
Pecam-1 : Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (= Cluster of differentiation 31)
PIGF : Placental Growth Factor
PNN : Polynucléaires Neutrophiles
PP : Paroi Postérieure du ventricule gauche
PPAR : Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PPRE : PPAR Response Elements
Raldh2 : Retinaldehyde-Specific Dehydrogenase Type 2
RT-qPCR : Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction
Rxr α : Retinoic X Receptor Alpha
Sc4mol : Sterol-C4-methyl oxidase
Shh : Sonic Hedgehog
SIV : Septum Interventriculaire
Smo : Smoothened
Snai1 : Snail Family Transcriptional Repressor 1
Sqle : Squalene epoxidase
TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TG : Triglycérides
TGF- β : Transforming Growth Factor beta
Tie : Tyrosine-kinase with Immunoglobulin and EGF homology domains
TIMP : Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases
TM : mode Temps-Mouvement
TNF : Tumor Necrosis Factor
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGF-R : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

VG : Ventricul(air)e Gauche

VTDBG : Volume Télédiastolique du Ventricule Gauche

VTSVG : Volume Télésystolique du Ventricule Gauche

Wt1 : Gène suppresseur de Tumeur de Wilms.

ZO1 : Zona Occludens 1

Suivant les recommandations internationales, les gènes sont notés dans le manuscrit en italique (par exemple *Wt1*), à l'inverse des protéines (*Wt1*). Les gènes humains sont écrits en lettre capitales (par exemple *WT1*), à l'inverse des gènes murins (*Wt1*).

INTRODUCTION

1. Les maladies cardiovasculaires

a. Définitions

Les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent l'ensemble des troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins, comprenant principalement les cardiopathies ischémiques (atteinte des artères à destinée cardiaque appelées artères coronaires), les maladies cérébro-vasculaires (accident vasculaire) et les artériopathies périphériques (atteintes des artères à destinée des membres, principalement l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs).

Les cardiopathies ischémiques résultent d'une atteinte des artères coronaires ou coronaropathie. Elles se caractérisent par l'insuffisance des apports en oxygène au muscle cardiaque (appelé myocarde) du fait du développement et des complications de l'athérosclérose au niveau d'une ou plusieurs artères coronaires. La coronaropathie peut se manifester de façon aiguë ou chronique selon que l'occlusion coronaire est plus ou moins complète et plus ou moins brutale, les conséquences allant de l'ischémie silencieuse, asymptomatique, à la nécrose myocardique massive et létale. L'occlusion aiguë d'une artère coronaire, le plus souvent par rupture de plaque d'athérome, est responsable d'un infarctus du myocarde (IDM). Le défaut d'approvisionnement des cardiomyocytes en nutriments et en oxygène aboutit à une hypoxie (ou ischémie myocardique) qui, si elle se prolonge, entraîne la perte des cardiomyocytes et des autres cellules cardiaques. La souffrance myocardique peut occasionner des troubles du rythme cardiaque graves, à l'origine de mort subite. La taille de l'infarctus, la perméabilité de l'artère coupable, l'existence et la qualité d'une circulation coronaire collatérale, ainsi que l'importance du remodelage ventriculaire gauche (VG) post-infarctus, vont déterminer l'altération de la fonction contractile cardiaque, l'étendue de la séquelle myocardique, et la survenue d'insuffisance cardiaque, qui reste une des premières causes de mortalité en post-infarctus.

L'insuffisance cardiaque est un syndrome clinique caractérisé par des symptômes typiques (essoufflement, asthénie) potentiellement accompagnés de signes physiques (congestifs ou de bas débit). Elle est causée par une anomalie cardiaque structurelle et/ou fonctionnelle, à l'origine d'une diminution du débit cardiaque et/ou d'une élévation des pressions intracardiaques au repos ou à l'effort. Cette définition de la Société Européenne

de Cardiologie se limite aux stades cliniques de l'insuffisance cardiaque. Cependant, les patients peuvent présenter des anomalies cardiaques asymptomatiques (dysfonction ventriculaire gauche systolique ou diastolique), qui sont les stades précurseurs de l'insuffisance cardiaque et sont grevés d'un plus mauvais pronostic. Dépister les patients à ces stades est un enjeu de santé publique, permettant de mettre en place un suivi et/ou un traitement, réduisant ainsi la morbi-mortalité de l'insuffisance cardiaque (Ponikowski P et al., 2016).

b. Epidémiologie

Les MCV sont la première cause de mortalité dans le monde, totalisant 17,5 millions de décès chaque année soit 31% de la mortalité mondiale totale (*OMS, rapport sur les maladies non transmissibles, 2014*). Parmi ces décès, 7,4 millions sont liés à une coronaropathie.

En France, les MCV représentent la première cause de mortalité (un tiers des décès) chez la femme et chez les plus de 65 ans, et la deuxième cause (un quart des décès) chez l'homme derrière le cancer, avec 140000 décès par an (*Institut national de veille sanitaire, 2011*). Sur les dernières années, on a observé une diminution de la mortalité liée à l'IDM grâce à une meilleure prévention (dépistage des sujets à risque) et une meilleure prise en charge thérapeutique (Fox KA et al., EHJ 2010). La prise en charge initiale a été rendue plus rapide par la création du Service Mobile d'Urgence et de Réanimation (SMUR), et plus efficace grâce au développement de l'angioplastie coronaire et des unités de soins intensifs cardiologiques, permettant de restituer rapidement une perfusion myocardique. Enfin, les thérapeutiques médicamenteuses toujours plus efficaces ont participé à la diminution de la morbi-mortalité chez les patients après un IDM (Puymirat E et al., 2012 ; Hanssen M et al., 2012 ; Jernberg T et al., 2011).

Deux millions de patients souffraient de cardiopathies ischémiques en France en 2009, soit une prévalence de 3%. L'incidence de l'IDM est de 120000 personnes par an (*Institut national de veille sanitaire, 2011*). Une progression de 25% des taux d'hospitalisation pour infarctus du myocarde a été observée entre 2002 et 2013 chez les femmes de moins de 65 ans (Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire, mars 2016).

L'insuffisance cardiaque est une maladie grave et fréquente puisqu'elle est la troisième cause de mortalité cardiovasculaire, derrière l'infarctus du myocarde et

l'accident vasculaire cérébral (Mozaffarian D et al., 2015). D'après la Société Européenne de Cardiologie, elle touche 1 à 2% de la population adulte dans les pays développés et plus de 10% des personnes de 70 ans et plus (Bleumink GS et al., 2004). En France, sa prévalence dans la population adulte est estimée à 2,3% (*Institut national de veille sanitaire, 2014*) et s'élève à 11,9% chez les patients âgés de 60 ans et plus consultant en médecine générale (Saudubray T et al., 2005). L'incidence de l'insuffisance cardiaque augmente avec l'âge, elle est ainsi susceptible de croître dans les années à venir en raison du vieillissement de la population et d'une survie accrue des patients atteints de cardiopathie ischémique. Cependant, entre 2000 et 2010, le taux de mortalité liée à l'insuffisance cardiaque a fortement diminué, très probablement grâce à une meilleure prévention et à une prise en charge adaptée de l'insuffisance cardiaque et des maladies responsables de sa survenue, tel l'infarctus du myocarde (Chen J et al., 2011 ; Westenbrink BD et al., 2012).

c. Impact économique

Les cardiopathies ischémiques représentent la première cause de pertes d'années de vie en bonne santé en Europe selon l'OMS, motivant l'intérêt majeur porté aux nouvelles thérapeutiques pouvant améliorer le pronostic et la qualité de vie des patients en post-IDM. Les thérapeutiques actuelles permettent de limiter les symptômes et la morbi-mortalité mais pas de régénérer le myocarde endommagé. De ce fait, les coûts engendrés sont importants : thérapeutiques médicamenteuses et autres, consultations, examens complémentaires et hospitalisations (Bakhai A et al., 2012). De plus, l'évolution de l'insuffisance cardiaque est marquée par des phases de décompensation aiguë représentant une cause fréquente d'hospitalisation chez les personnes âgées, générant des coûts importants (Lloyd-Jones D et al., 2010).

d. Problématique

Malgré ces progrès dans la prise en charge de l'IDM, la mortalité reste de 12% à 6 mois (McManus DD et al., 2011). De plus, les traitements restent "palliatifs", les patients devant utiliser une polymédication pendant plusieurs décennies. Le seul traitement "curatif" reste la greffe cardiaque. D'accessibilité difficile devant la pénurie de greffon, elle implique une lourde polymédication et un suivi régulier, et expose le patient à des complications infectieuses, au rejet et finalement à la dysfonction de greffon.

Optimiser la prise en charge de l'IDM est donc un enjeu de santé publique et économique important, afin de diminuer sa morbi-mortalité, de limiter la prévalence de l'insuffisance cardiaque ainsi que les coûts engendrés au long terme par ces deux pathologies.

2. Généralités sur l'appareil cardio-circulatoire

L'appareil cardio-circulatoire est composé du cœur, des vaisseaux sanguins et des vaisseaux lymphatiques. Il assure l'homéostasie de l'organisme via un système clos de transport du sang à sens unique, distribuant les nutriments aux cellules et éliminant les déchets produits par le fonctionnement cellulaire. Il intervient également dans les défenses de l'organisme via la circulation des cellules de l'immunité, et permet la régulation des systèmes et organes via la circulation des hormones.

a. Généralités sur le cœur

i. Anatomie

Le cœur est un muscle strié creux unique puisqu'il présente des capacités du muscle squelettique et du muscle lisse. Chez les vertébrés, il est composé de 2 corps de pompe montés en série (cœur droit et cœur gauche) chacun soumis à des niveaux de résistance différents et séparés par le septum. Chaque corps est composé d'une cavité réceptive (l'oreillette) et d'une cavité motrice (le ventricule) séparées par une valve auriculo-ventriculaire. Les valves sigmoïdes séparent les ventricules des troncs artériels (aorte à gauche et artère pulmonaire à droite).

ii. Embryogenèse cardiaque

Chez les mammifères, la morphogenèse cardiaque est précoce et complexe. Elle fait intervenir des structures embryonnaires d'origine multiple et nécessite 3 cycles successifs de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) plus ou moins accompagnée de son corollaire, la transition mésenchymato-épithéliale. La TEM permet la perte d'adhésion et de polarité des cellules épithéliales, au profit de l'acquisition de propriétés migratrices et invasives caractéristiques des cellules mésenchymateuses et nécessaires aux cellules-souches, dont dériveront les différentes populations cellulaires cardiaques. C'est un processus indispensable à l'embryogenèse et à l'organogenèse.

L'épiblaste, subit une TEM "primaire" qui autorise la formation de trois feuilletts : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. Le mésoderme subit une TEM "secondaire", à l'origine des tubes endocardiques qui fusionnent pour former le tube cardiaque primitif. Le mésoderme s'organise ensuite autour du tube cardiaque primitif en une aire cardiaque

secondaire : les cellules au contact de l'endoderme se différencient en myoblastes (à l'origine des cardiomyocytes).

Rapidement, des cellules mésoblastiques forment la séreuse proépicardique qui sera à l'origine de l'épicarde (Männer J et al., 2001). Cette ébauche primitive extra-cardiaque semble dériver d'un complexe cardio-rénal vestige de l'évolution phylogénique, expliquant certaines caractéristiques communes aux cellules dérivées du proépicarde et du pronéphros (à l'origine du système urinaire). Ainsi, on comprend mieux l'expression de facteurs transcriptionnels communs à ces deux systèmes, tel le gène suppresseur de tumeur de Wilms Wt1 (Moore AW et al., 1998). Dirigées par la sécrétion myocardique de substances chémoattractantes, les cellules proépicardiques migrent à la surface du myocarde et de la cavité péricardique pour former progressivement l'épicarde, recouvrant la surface du myocarde du tube cardiaque en développement (Ho E et al., 1978 ; Viragh S et al., 1981).

Les cellules de l'épicarde subissent une TEM : les cellules mésenchymateuses dérivées se différencient en fibroblastes cardiaques, cellules musculaires lisses et cellules endothéliales (Wagner N et al., 2005 ; von Gise A et al., 2012). Elles pourraient également être à l'origine de certains cardiomyocytes, bien que cette notion ne soit pas universellement reconnue (Zhou B et al., 2008 ; Gittenberger-de Groot AC et al., 1998 ; Rudat C et al., 2012).

Les interactions entre ces différentes populations cellulaires sont nécessaires à l'organogenèse cardiaque. En effet, des signaux provenant de l'endocarde et de l'épicarde sont indispensables à la différenciation et la prolifération des cellules myocardiques (Grego-Bessa J et al., 2007).

En parallèle, le tube cardiaque subit une série de constriction et dilatations, de courbures et inflexions ainsi qu'un cloisonnement des oreillettes et des ventricules, aboutissant à l'anatomie cardiaque définitive. Par ailleurs, l'organogenèse cardiaque nécessite l'évolution du retour veineux, la compaction du myocarde ventriculaire, la formation des valves (dérivant des bourgeons endocardiques obtenus par TEM "tertiaire" des cellules endocardiques), et du tissu cardionecteur.

Ces étapes donnent au cœur des vertébrés sa structure complexe, capable d'assurer un débit cardiaque suffisant à une activité intense chez des animaux de grande taille.

iii. Histologie et cytologie

Le cœur est constitué de 3 tuniques : de l'intérieur vers l'extérieur l'endocarde, le myocarde et le péricarde. L'endocarde est composé d'un épithélium et d'une couche sous-endothéliale de tissu conjonctif qui recouvrent l'intérieur du cœur, en continuité de l'endothélium vasculaire. Le myocarde est la tunique la plus épaisse, composée de cardiomyocytes et de tissu conjonctif richement vascularisé. Les cardiomyocytes sont les cellules contractiles, liées entre elles par des desmosomes et des jonctions communicantes, assurant respectivement la cohésion mécanique et la transmission rapide des potentiels d'action afin de coordonner la contraction myocardique. Les cardiomyocytes sont composés d'unités fonctionnelles organisées en série, les sarcomères, et constituées de protéines contractiles, dont le raccourcissement permet la contraction cardiaque. Le péricarde est un sac membraneux à feuillet double. Son feuillet séreux interne, composé d'un feuillet viscéral (épicarde) et d'un feuillet pariétal, assure le glissement du cœur sans frottement à chaque contraction. Le feuillet fibreux externe inextensible sert d'attache à l'intérieur de la cavité thoracique. Le tissu conjonctif sous-épicaudique voit cheminer les nerfs et les troncs coronaires.

Le cœur est constitué de différents types cellulaires : les cardiomyocytes qui représentent le volume cellulaire le plus important, et les cellules non myocytaires (cellules endothéliales, fibroblastes, péricytes et cellules mésenchymateuses, macrophages et autres leucocytes résidents) (Pinto AR et al., 2016).

Les fibroblastes cardiaques proviennent pour la plupart des cellules dérivées de l'épicarde (Zeisberg EM et Kalluri R, 2010). Leur fonction est de préserver l'intégrité structurelle cardiaque en maintenant l'homéostasie de la matrice extra-cellulaire (MEC), et de réguler la fonction des autres cellules cardiaques par la sécrétion de facteurs paracrines.

La MEC est un composant essentiel du tissu cardiaque : elle est un support mécanique sur lequel les cellules cardiaques s'organisent et interagissent, permettant la communication intercellulaire et la transmission de la force de contraction (Horn MA et Trafford AW, 2016). Elle est composée de protéines structurales, principalement le collagène, dont le renouvellement est assuré par la sécrétion (myo)fibroblastique de métalloprotéases matricielles (MMPs, matrix metalloproteinases) et de leurs inhibiteurs (TIMPs, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases).

iv. Métabolisme cardiaque

L'activité contractile du cœur nécessite des apports énergétiques importants et constants, afin de produire l'ATP destiné au couplage excitation-contraction ainsi qu'à la relaxation cardiaque. Une diminution de la production d'ATP entraîne une augmentation du calcium cytoplasmique par modification des gradients calciques de part et d'autre du sarcolemme et de la membrane du réticulum sarcoplasmique, diminuant la performance énergétique du myocarde comme observé dans l'insuffisance cardiaque (Heinzel FR et al., 2011). Le cœur adulte sain est omnivore : il peut utiliser différents substrats énergétiques avec une grande plasticité, lui conférant une capacité d'adaptation et une résistance importantes. A la naissance, le cœur passe d'une utilisation préférentielle du lactate et du glucose, substrats adaptés à un environnement pauvre en oxygène, à un métabolisme oxydatif. Ainsi, en physiologie, les cardiomyocytes utilisent principalement l'oxydation des acides gras (AG) (60 à 90%), et du glucose (10 à 40%), dans une moindre mesure le lactate (pendant un exercice physique (Gertz EW et al., 1988)), et les corps cétoniques (pendant une période de jeûne (Neely JR et al., 1972)).

Le métabolisme énergétique et l'homéostasie cardiaque reposent donc principalement sur l'entrée des AG, circulant dans les vaisseaux sanguins sous la forme d'AG libres liés à l'albumine ou de lipoprotéines (Kienesberger PC et al., 2013). Cet afflux intra-cellulaire est sous le contrôle de transporteurs et détermine l'importance de l'oxydation mitochondriale (Lopaschuk GD et al, 2010). La majorité des AG intracellulaires est d'abord stockée sous forme de triacylglycérols (ou triglycérides, TG) avant leur oxydation (Banke NH et al., 2010).

L'entrée du glucose dans les cardiomyocytes est permise par les transporteurs GLUT-1 (Glucose Transporter-1, actif à l'état basal) et GLUT-4 (fortement inductible par la sécrétion d'insuline). En conditions normales, le glucose est en partie stocké sous forme de glycogène intracellulaire.

Le facteur transcriptionnel PPAR β/δ (pour Peroxisome Proliferator Activated Receptors) joue un rôle important dans la régulation du métabolisme oxydatif glucidique et lipidique, en particulier dans le muscle squelettique et le muscle cardiaque (Wagner KD et Wagner N, 2010).

La figure 1 illustre les voies métaboliques du glucose et des AG utilisées par les cardiomyocytes.

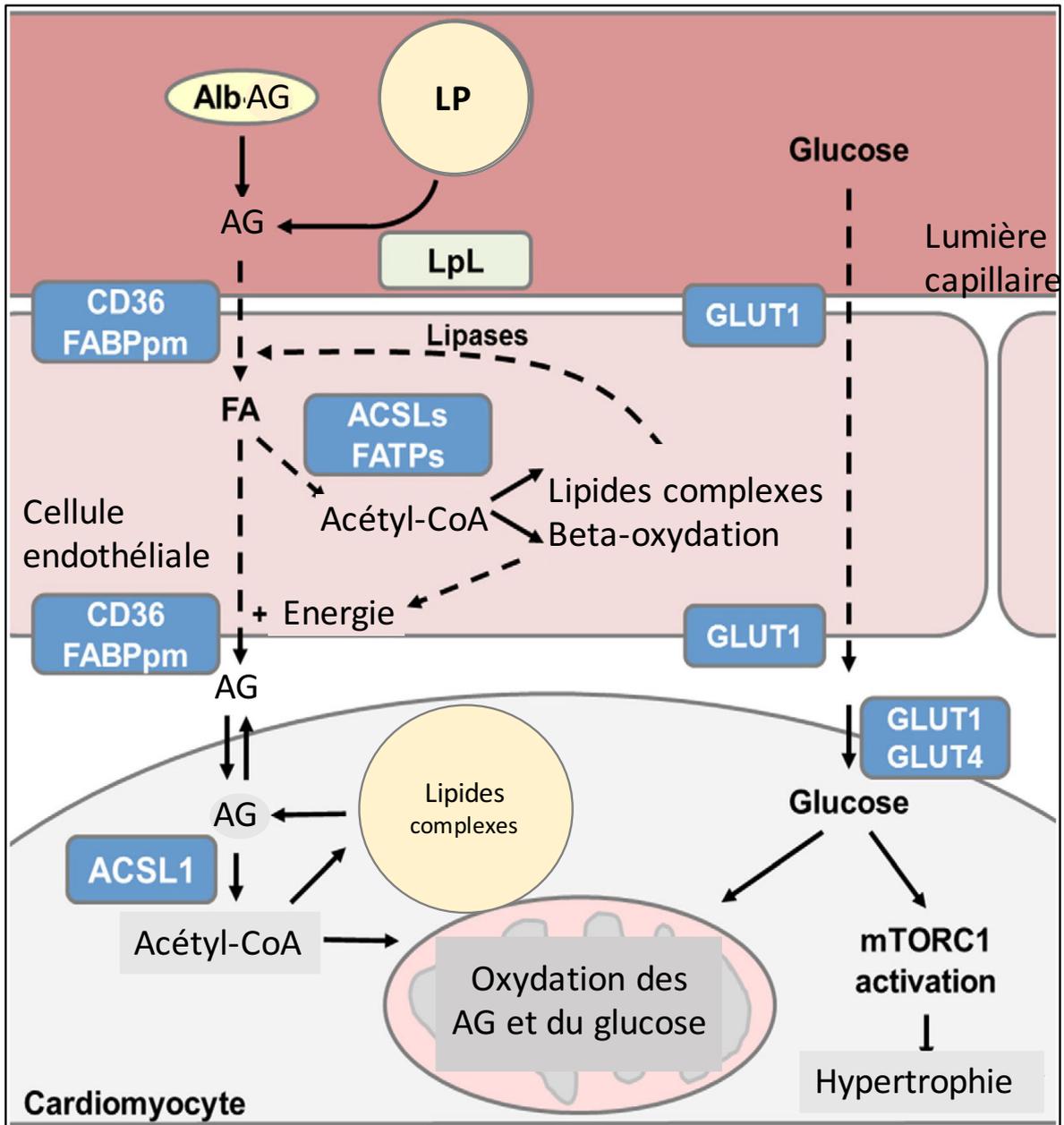


Figure 1 : Métabolisme cardiaque normal. D'après Pascual F et Coleman RA, 2016.

Les acides gras liés à l'albumine (Alb-AG), ou provenant de l'hydrolyse des lipoprotéines circulantes (LP) par la lipoprotéine lipase (LpL), pénètrent dans la cellule endothéliale par des transporteurs membranaires (dont CD36 aussi appelé Fatty Acid Binding Protein, FABP). Leur utilisation et leur transport dans les organelles intra-cellulaires se fait par formation d'Acétyl-CoA grâce à l'action de l'Acétyl-CoA Synthétase (ACSL). Le glucose pénètre dans la cellule grâce à ses transporteurs GLUT-1 et GLUT-4.

Le métabolisme des cardiomyocytes peut s'adapter aux contraintes physiologiques et pathologiques, en fonction du travail cardiaque requis, des stimuli hormonaux présents et des substrats et ressources en oxygène disponibles.

En pathologie cardiaque, on observe souvent une perte de la plasticité métabolique, ce qui majore les lésions myocardiques initiales (Kolwicz SC Jr et al., 2013). En effet, l'utilisation préférentielle d'une voie métabolique inhibe l'utilisation des autres substrats disponibles. Ainsi, l'oxydation des AG inhibe l'oxydation du glucose, la glycolyse et l'entrée du glucose dans les cardiomyocytes (Randle PJ et al., 1964). A l'inverse, un métabolisme glucidique privilégié inhibe l'oxydation des AG. En situation pathologique, ces dérégulations métaboliques peuvent être sources d'une accumulation de métabolites toxiques ou d'une production énergétique insuffisante.

L'ischémie myocardique force les cardiomyocytes à abandonner le métabolisme aérobie au profit de la glycolyse. Ainsi, on observe une internalisation des transporteurs des AG, une translocation au sarcolemme du transporteur GLUT-4 et une diminution des réserves de glycogène intracellulaire (Heather LC et al., 2013). Cette transition énergétique se manifeste par l'accumulation des métabolites de la glycolyse (lactate et protons) non utilisables par le cycle oxydatif mitochondrial et responsables d'une acidose cellulaire. Face à cette acidose, le mécanisme de compensation fait appel à l'antiport sodium/hydrogène Na/H couplé à l'action de l'échangeur sodium/calcium Na/Ca. Associés à la baisse d'activité des calcium-ATPases membranaire et sarcoplasmique dans un contexte de déficit en ATP, ces courants ioniques sont à l'origine d'une surcharge calcique intra-cytoplasmique, diminuant les performances contractiles des cardiomyocytes et augmentant la consommation énergétique nécessaire à la restauration de l'homéostasie ionique intracellulaire (Depre C et al., 1999). Pendant la phase de reperfusion post-IDM, l'oxydation des AG redevient prédominante, inhibant l'oxydation des glucides, comme illustré dans la figure 2. L'activité importante de GLUT-4 et le découplage entre glycolyse conservée et faible oxydation du glucose sont responsables d'une accumulation plus marquée de métabolites toxiques, favorisant la survenue d'une insuffisance cardiaque ischémique (Liu Q et al., 2002).

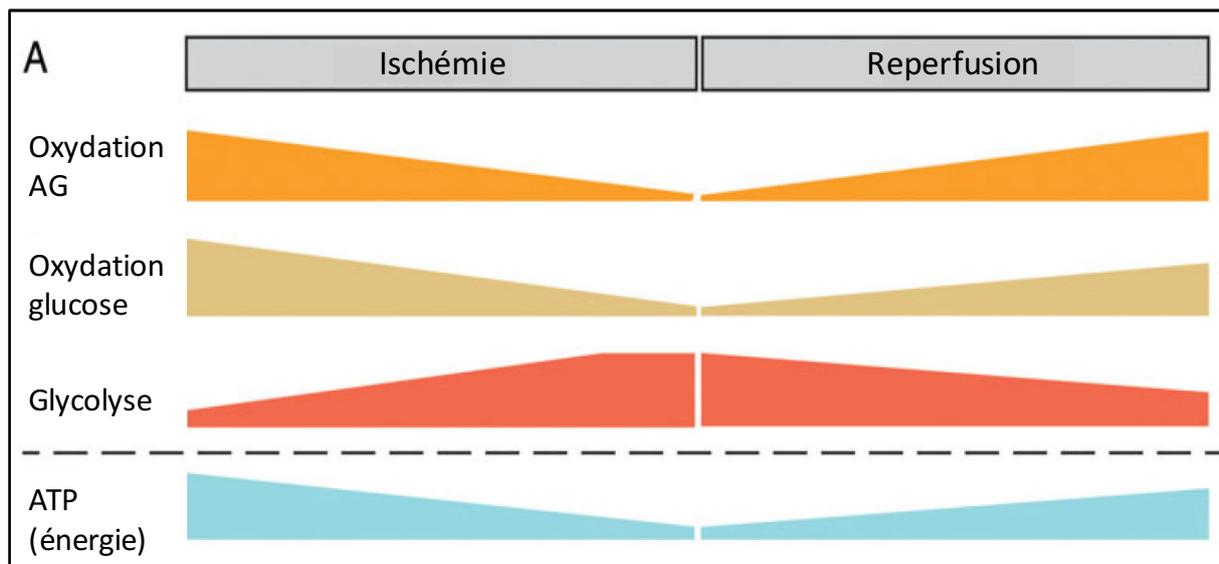


Figure 2 : Modifications du métabolisme cardiaque liées à l'ischémie. D'après Abdurrachim D et al, 2015.

Dans l'insuffisance cardiaque, la transition se fait vers un métabolisme essentiellement glucidique, moins coûteux en oxygène mais dont le rendement énergétique est 3 à 4 fois plus faible que l'oxydation des AG (Lopaschuk GD et al., 2010). L'oxydation du glucose ne parvient pas à compenser la perte du métabolisme lipidique, empêchant de satisfaire les besoins énergétiques du myocarde (Fillmore N et al., 2014). De plus, la transition énergétique vers la glycolyse promeut un retour à un programme génétique embryonnaire, le développement d'une hypertrophie ventriculaire gauche et une dysfonction diastolique (Paul DS et al., 2014).

Ces deux situations pathologiques montrent le caractère délétère potentiel d'un recours à un métabolisme glucidique strict sur la fonction cardiaque.

A l'inverse, le cœur des **sujets diabétiques** ou **obèses** se tourne vers un métabolisme lipidique quasi exclusif. Dans ces situations pathologiques, les capacités oxydatives mitochondriales deviennent insuffisantes pour faire face à une augmentation de la disponibilité des AG, qui sont alors orientés vers des voies non oxydatives. La suractivation des voies de signalisation lipidique et l'accumulation de lipides et de métabolites lipidiques (céramides, acylcarnitines, et TG) sont à l'origine d'une lipotoxicité par altération de la fonction mitochondriale, causant un déficit énergétique. On observe également un stress du réticulum sarcoplasmique, et une insulino-résistance, pouvant déclencher une apoptose (Unger RH et Orci L, 2002 ; Goldberg IJ et al., 2012). La "cardiomyopathie lipotoxique", véritable insuffisance cardiaque, est préférentiellement

observée chez le diabétique, l'obèse, l'insulinorésistant, le sujet âgé et en post-IDM. (Wende AR et Abel ED, 2010 ; Perman JC et al., 2011). On comprend donc bien la nécessité d'un équilibre entre apports et oxydation des AG.

Certaines expériences réalisées dans le modèle murin ont tenté de limiter cette lipotoxicité en séquestrant les AG sous forme de TG (Liu L et al., 2009). Les résultats ont été décevants, montrant l'apparition d'une stéatose cardiaque massive, à l'origine d'une "cardiomyovasculopathie liée aux dépôts de triglycérides". La limitation mécanique de la contraction sarcomérique, liée aux dépôts de TG, et la forte diminution de l'oxydation lipidique (par manque de substrat) expliquent la survenue d'une insuffisance cardiaque dans ces modèles murins (Hirano K et al, 2008). A l'inverse, une lipolyse excessive est responsable d'une accumulation de métabolites intermédiaires lipotoxiques.

Ainsi, une modification du ratio intracellulaire AG/TG peut être responsable d'une toxicité cardiaque de mécanisme variable, et donc favoriser le développement d'une insuffisance cardiaque.

Ces diverses situations illustrent la nécessité de maintenir un métabolisme cardiaque équilibré, afin d'éviter toutes les complications citées précédemment. Le rôle de l'endothélium dans la sélection des substrats énergétiques semble prédominant. Pourtant, les mécanismes de transfert des AG et du glucose, après leur entrée dans la cellule endothéliale et jusqu'à leur entrée dans les cardiomyocytes, restent encore mal compris. On peut suspecter que le métabolisme de la cellule endothéliale détermine la disponibilité de ces substrats et donc leur utilisation par les cardiomyocytes. La communication cellulaire entre endothélium et cardiomyocytes, ainsi que la régulation du métabolisme endothélial restent donc des voies de recherche majeures pour comprendre et prendre en charge les pathologies cardiovasculaires déjà évoquées, expliquant l'intérêt croissant porté aux facteurs contrôlant le métabolisme cellulaire tel PPAR β/δ .

b. Généralités sur les vaisseaux sanguins

i. La circulation sanguine

Chez les animaux de grande taille, dont les mammifères, la nécessité d'un appareil circulatoire apparaît évidente. En effet, la simple diffusion des gaz à partir de la peau ne suffit pas à approvisionner toutes les cellules de l'organisme en substrats ni à éliminer les déchets du métabolisme cellulaire.

La circulation artérielle permet l'apport d'oxygène et de nutriments aux cellules, les échanges se font au niveau du réseau capillaire, et l'élimination des déchets est assurée par les systèmes de retour veineux et lymphatique. Il existe deux circulations sanguines en série chez les mammifères : la circulation systémique (assurant la distribution du sang à chaque organe) et la circulation pulmonaire (circulation fonctionnelle assurant l'hématose).

ii. Anatomie de la circulation coronaire

La circulation coronaire est la circulation nourricière du cœur. Elle est particulière à certaines classes de vertébrés, dont les mammifères, ayant en commun une respiration pulmonaire, et donc une séparation intra-cardiaque des circulations pulmonaire et systémique. Chez ces animaux, l'épaisseur importante du myocarde rend insuffisante la diffusion des gaz à partir du sang circulant dans les cavités cardiaques gauches, justifiant l'existence d'une circulation coronaire. De plus, la délivrance de sang oxygéné aux cavités cardiaques droites est conditionnée par les vaisseaux coronaires.

Il existe en général deux réseaux artériels : l'artère coronaire gauche (tronc commun) qui se divise très rapidement en artère interventriculaire antérieure (IVA) et en artère circonflexe, et l'artère coronaire droite. Naissant de la portion initiale de l'aorte, leur trajet est d'abord sous-épicaire puis devient intra-myocardique pour se ramifier en un réseau capillaire très développé. Du fait de l'écrasement de ce réseau intra-myocardique en systole, la perfusion cardiaque est essentiellement diastolique.

iii. Histologie et cytologie

A l'instar des autres vaisseaux sanguins, les vaisseaux coronaires sont constitués de 3 tuniques. La tunique interne ou intima, est composée d'un endothélium hétérogène

et d'une lame basale. La couche centrale ou média, est constituée de cellules musculaires lisses, de fibres d'élastine et de collagène dont la proportion détermine les propriétés du vaisseau. Enfin, la tunique externe, ou adventice, est composée de tissu conjonctif, de la vascularisation et de l'innervation des vaisseaux de gros calibre.

iv. Embryogenèse des vaisseaux sanguins coronaires

La formation des vaisseaux sanguins primitifs coronaires nécessite la survenue successivement d'une phase de vasculogenèse, d'angiogenèse puis d'artériogenèse (Flamme I et al., 1997 ; Reese DE et al., 2002). La vasculogenèse est un processus physiologique permettant le développement de néovaisseaux à partir des progéniteurs vasculaires. L'induction des hémangioblastes est principalement médiée par les membres de la famille des FGF (Fibroblast Growth Factors). Elle est suivie de la fusion des progéniteurs vasculaires pour former les cordons angioblastiques, sous le contrôle du couple VEGF/VEGF-R (Vascular Endothelial Growth Factor/ VEGF Receptor). La transition se fait ensuite vers l'angiogenèse afin d'assurer l'extension de cet arbre vasculaire primitif. Le développement des nouveaux vaisseaux peut se faire par bourgeonnement et émission de nouveaux vaisseaux à partir des cordons vasculaires primitifs ou par division de la lumière vasculaire (Folkman J et Shing Y, 1992). Enfin, l'artériogenèse constitue la maturation de ces vaisseaux sanguins primitifs (remodelage et élargissement, médiés par le flux sanguin).

La majeure partie des cellules endothéliales coronaires semble dériver du pro-épicaarde (Perez-Pomares JM et al., 2002). Simultanément à la formation de l'épicaarde, certaines cellules proépicaardiques, devenues des "cellules mésenchymateuses dérivées de l'épicaarde" après TEM, migrent vers le tissu conjonctif sous-épicaardique. Elles fusionnent pour former des canaux, subissent une transition mésenchymato-épithéliale aboutissant à la création de l'endothélium, puis migrent dans le myocarde.

Ainsi, l'angiogenèse coronaire est le résultat d'une interaction complexe finement régulée dans l'espace et dans le temps entre épicaarde, cellules endothéliales coronaires et myocarde. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), indispensable à la formation des vaisseaux coronaires, fait intervenir de nombreux facteurs épicaardiques tel le suppresseur de tumeur de Wilms (Wt1) (Wagner N et al., 2005 ; von Gise A et al., 2011). La voie de signalisation de l'acide rétinoïque est également impliquée dans la TEM, et régulée par le cholestérol et ses dérivés (Merki E et al., 2011 ; Huq MD et al., 2006 ; Keber

R et al., 2011). Ainsi, les enzymes participant à la synthèse du cholestérol sont indispensables à l'angiogenèse coronaire. En témoignent les anomalies développementales coronaires majeures observées en cas de délétion constitutionnelle de *Cyp51*, codant pour une de ces enzymes, la Cytochrome P450 Lanosterol 14 α -demethylase (Keber R et al., 2011).

D'autres facteurs (FGF) sécrétés par le myocarde en formation interviennent dans la formation des vaisseaux coronaires (Lavine KJ et al., 2005).

Les cellules mésenchymateuses dérivées de l'épicarde, issues de la TEM des cellules épocardiques, s'organisent autour de cet endothélium coronaire et se différencient en cellules musculaires lisses et en péricytes, sous la régulation des cellules endothéliales et de facteurs tels les angiopoïétines, VEGF, ou Wt1 (Gale NW et Yancopoulos GD, 1999 ; Martinez-Estrada OM et al., 2010 ; Reese DE et al., 2002).

Enfin, les vaisseaux coronaires croissent par expansion du réseau vasculaire primitif, la connexion à la circulation systémique se faisant par des mécanismes apoptotiques locaux dont les déterminants sont encore mal compris.

v. Hémodynamique coronaire

A l'instar de la circulation cérébrale, la circulation coronaire est "privilégiée" c'est-à-dire prioritaire dans la distribution du débit sanguin.

Le débit sanguin coronaire correspond à 4% du débit cardiaque à l'état basal. A la différence des autres organes, l'extraction de l'oxygène est d'emblée maximale dans le myocarde. De ce fait, seule une augmentation du débit cardiaque ou une vasodilatation coronaire peuvent assurer l'augmentation du débit local nécessaire à un effort physique. Cependant, cette capacité de vasodilatation coronaire est altérée dans certains états pathologiques comme la coronaropathie : on parle de dysfonction endothéliale. De plus, la circulation coronaire est "terminale", c'est-à-dire qu'il n'existe théoriquement pas d'anastomoses entre les différentes artères coronaires. Dans ce cas, une occlusion coronaire aiguë ne peut être correctement supplée, le débit coronaire est insuffisant pour assurer la survie du tissu cardiaque dépendant de l'artère occluse : c'est l'infarctus du myocarde. Une circulation collatérale peut se développer dans l'ischémie coronaire chronique, améliorant le pronostic en cas d'occlusion de l'artère pathologique.

c. Homéostasie cardio-vasculaire à l'âge adulte

Afin de comprendre les mécanismes mis en place lors de la réparation cardiaque après une lésion myocardique, il est important de préciser les mécanismes assurant l'homéostasie cardio-vasculaire à l'âge adulte.

i. Homéostasie cardiaque

Contrairement aux mammifères, les amphibiens et certains poissons conservent une capacité importante de régénération cardiaque à l'âge adulte, permettant une réparation ad integrum en cas de lésions importantes du myocarde ventriculaire (Jopling C et al., 2010).

Une plasticité de croissance identique a été identifiée chez la souris en période prénatale, permettant une régénération de plus de la moitié du tissu cardiaque par hyperprolifération de l'ensemble des populations cellulaires normales (Porrello ER et al., 2011). De façon identique au poisson zèbre, les cardiomyocytes néoformés proviennent d'une dédifférenciation suivie d'une prolifération des cardiomyocytes existants, et non de la stimulation des progéniteurs cardiaques (Drenckhahn JD et al., 2008).

On a longtemps pensé que cette capacité de régénération cardiaque disparaissait rapidement chez les mammifères après la naissance, les cardiomyocytes perdant leur capacité proliférative. De ce fait, le cœur adulte des mammifères était qualifié d'organe post-mitotique, c'est-à-dire pleinement différencié avec de minimes capacités prolifératives. Cependant, il est désormais admis qu'il existe un renouvellement basal permanent des cellules cardiaques chez les mammifères adultes. En effet, l'équipe de Kajstura a prouvé la capacité de régénération cardiaque, par l'observation de cardiomyocytes humains mitotiques dans le cœur adulte sain, dont le nombre était significativement augmenté chez les patients atteints de cardiopathies sévères (Kajstura J et al., 1998). Cette constatation a ouvert la voie à la recherche sur les cellules souches et la thérapie cellulaire dans la pathologie cardiovasculaire (Orlic D et al., 2001). L'intensité du renouvellement basal reste cependant très débattue, les différentes études apportant des résultats très variables, allant de moins de 1% à 46% par an (Bergmann O et al., 2009 ; Kajstura J et al., 2010 ; Laflamme MA et Murry CE, 2011).

Chez la souris, ce taux est également très variable selon les études considérées, avec une moyenne de 1 à 4 % par an.

Les différents travaux n'ont pas clairement défini le mécanisme à l'origine de ce renouvellement cardiomyocytaire : cardiomyocytes adultes retrouvant des capacités de prolifération (Senyo SE et al., 2013), différenciation des progéniteurs cardiaques résidents (Beltrami AP et al., 2003), ou encore différenciation des cellules souches périphériques (Orlic D et al., 2001). Ces mécanismes régénératifs restent toutefois insuffisants chez les mammifères pour compenser une perte rapide et significative de cardiomyocytes dans la pathologie, comme observée suite à un IDM ou dans l'insuffisance cardiaque.

Les cellules cardiaques non myocytaires voient leur nombre croître pendant la vie, témoignant de leurs capacités prolifératives (Bergmann O et al., 2015).

ii. Angiogenèse coronaire postnatale

En postnatal, la croissance des vaisseaux coronaires s'effectue par formation de novo à partir de progéniteurs endocardiques pour les couches internes du myocarde, et par extension du réseau coronaire existant pour les couches externes du myocarde.

En postnatal immédiat, le myocarde subit une nouvelle phase de compaction pour s'adapter aux nouvelles conditions hémodynamiques : les cellules endocardiques piégées dans le myocarde compacté sont soumises à une hypoxie et subissent une transdifférenciation afin de former les cellules endothéliales des nouveaux vaisseaux coronaires (Tian X et al., 2014).

Chez l'adulte, un remodelage artériel permanent permet le renouvellement des cellules (Bergmann O et al., 2015). Ce renouvellement s'accélère en présence de stimuli spécifiques comme l'hypoxie, le stress pariétal ou la présence de molécules de danger, ce qui sera détaillé ultérieurement.

3. Le remodelage cardiaque

a. Définition

Le remodelage cardiaque correspond à l'ensemble des modifications d'expression génomique aboutissant à des changements au niveau moléculaire, cellulaire et interstitiel et se manifestant cliniquement par des variations dans les dimensions, la géométrie et la fonction cardiaque après une lésion cardiaque (Cohn JN et al., 2000 ; Ertl G et Frantz S, 2005 ; Swynghedauw B 1999). Ce processus peut être physiologique adaptatif (entraînement sportif) ou pathologique en réponse à une agression (IDM). Il met en jeu la prolifération, l'hypertrophie et la différenciation cellulaires, de même que les phénomènes d'apoptose, d'inflammation et d'angiogénèse.

Le remodelage cardiaque vise à maintenir un débit cardiaque suffisant dans des conditions de charge modifiées, et intéresse principalement le ventricule gauche. Aux Etats-Unis, 25% des sujets présentant un IDM subissent un remodelage adverse significatif, évoluant vers l'insuffisance cardiaque (Velagaleti RS et al., 2008).

b. Choix du modèle murin d'infarctus du myocarde

La souris constitue un organisme modèle de choix pour comprendre les mécanismes de réparation cardiaque chez l'homme. En effet, la souris présente un système de procédés caractéristiques des mammifères, et une large palette d'outils génétiques est disponible dans le modèle murin. De plus, l'angiogénèse est un processus complexe impliquant plusieurs types cellulaires de la paroi vasculaire comme les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les péricytes et les cellules dérivées de la moelle osseuse. Bien que des modèles « simplifiés » d'étude de l'angiogénèse existent *in vitro*, comme la culture des cellules endothéliales, ils ne prennent pas en compte l'ensemble et la complexité des interactions cellulaires intervenant dans les processus angiogéniques *in vivo*. L'analyse *in vivo* des mécanismes du remodelage cardiaque en post-IDM apparaît donc indispensable, motivant l'utilisation du modèle murin dans cette étude.

c. Mécanismes de réparation post-IDM

Suite à une ischémie myocardique, jusqu'à un milliard de cellules cardiaques peuvent disparaître (Laflamme MA et Murry CE, 2005). Les cardiomyocytes sont les cellules les plus sensibles à l'ischémie, leur renouvellement s'avère donc critique en cas de lésion myocardique.

Du fait des faibles capacités régénératives du cœur adulte des mammifères, les tissus nécrosés sont remplacés par une cicatrice fibreuse.

Le processus de réparation cardiaque post-IDM se divise en trois phases, dont certains mécanismes se déroulent de façon simultanée : la phase inflammatoire, la phase de prolifération et la phase de maturation (Frangogiannis NG 2014), résumées dans la figure 3.

Dans le modèle murin, la réponse inflammatoire précoce est terminée dès le 4^{ème} jour post-IDM. L'expansion post infarctus est stabilisée au 7^{ème} jour et corrélée à la taille de la nécrose. La résolution de cette phase inflammatoire autorise une phase de prolifération cardiaque durant 10 à 14 jours, et le remodelage des zones saines se stabilise au 21^{ème} jour, au terme de la phase de réparation.

Chez l'homme, la phase inflammatoire et la phase de prolifération sont comparativement plus longues. La phase de maturation de la cicatrice fibreuse peut s'étaler sur plusieurs mois.

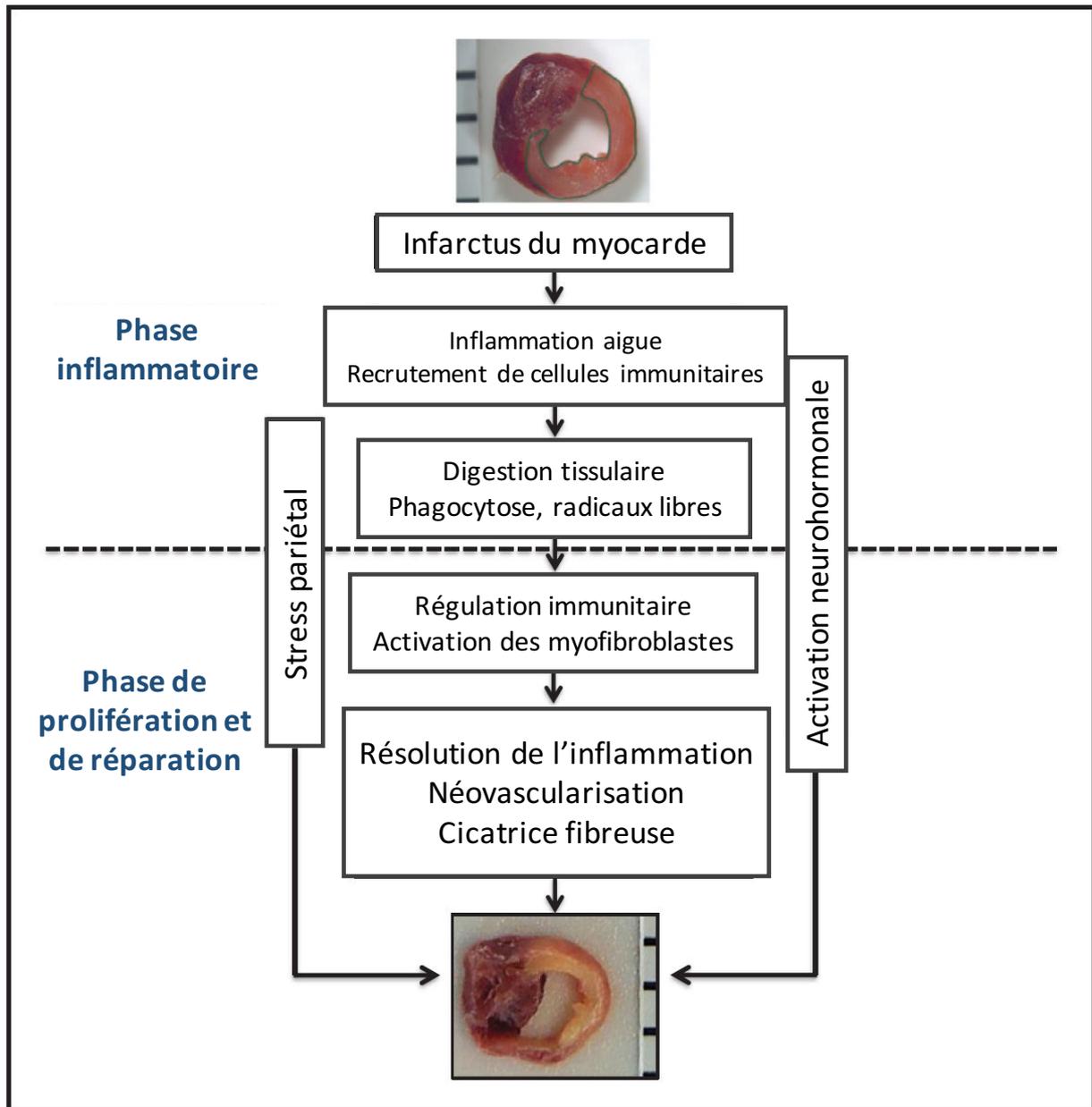


Figure 3 : Déroulement du processus de réparation cardiaque après une lésion myocardique. D'après Prabhu SD et Frangogiannis NG, 2016.

i. Initiation de la phase inflammatoire

L'hypoxie myocardique est à l'origine d'une mort cellulaire par nécrose ou apoptose. Le myocarde ischémiq ue libère des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, les cardiomyocytes hypoxiques libèrent des radicaux libres, permettant une activation de la réponse inflammatoire. En parallèle, les MMPs produites par les cellules activées sont à l'origine d'une fragmentation de la MEC, étape nécessaire aux phases suivantes de la réparation cardiaque. Des signaux de danger sont relargués

passivement par les cellules nécrotiques et la MEC endommagée, et activement par les cellules lésées et les leucocytes activés (de Haan JJ et al., 2013). Ces signaux de danger activent l'endothélium et les leucocytes circulants, et favorisent l'expression de chimiokines pro-inflammatoires et de molécules d'adhésion (Newton K et Dixit VM, 2012). Les interactions entre cellules endothéliales et leucocytes activés permettent la transmigration des polynucléaires neutrophiles et des monocytes, et leur infiltration dans le tissu myocardique infarcté.

L'extension spatiale de la réponse inflammatoire au myocarde adjacent se fait par effet paracrine des cytokines pro-inflammatoires sécrétées dans le myocarde infarcté. Les leucocytes ainsi activés entretiennent la réponse inflammatoire, et permettront secondairement la transition vers la phase "anti-inflammatoire" de réparation.

ii. Réponse inflammatoire

Elle permet le recrutement et l'activation des cellules de l'immunité innée (monocytes-macrophages, polynucléaires neutrophiles, cellules dendritiques) et adaptative (lymphocytes), via la reconnaissance des débris matriciels et de signaux de danger libérés par les cellules nécrotiques ou lésées. Leur infiltration dans le myocarde infarcté a pour but de préparer la phase de réparation en éliminant les tissus morts ou endommagés.

Le recrutement, l'activation et l'infiltration des **polynucléaires neutrophiles** (PNN) se fait précocement en réponse aux signaux de danger, interleukines (IL) et cytokines sécrétés (Mantovani A et al., 2011). Le relargage d'enzymes protéolytiques permet l'élimination des cellules mortes et des débris matriciels, préparant la phase de prolifération. La sécrétion de chimiokines pro-inflammatoires permet le recrutement et l'activation des monocytes circulants et résidents, et ainsi l'amplification de la réponse inflammatoire. La réponse neutrophile est maximale au 3^{ème} jour post-IDM chez la souris.

L'activation des rares monocytes résidents en **macrophages** permet leur polarisation initiale phénotypique M1 pro-inflammatoire, et participe au recrutement précoce des PNN. Les **monocytes circulants**, recrutés et activés par les cytokines pro-inflammatoires, constituent la majorité des monocytes impliqués dans la réparation cardiaque. Ils expriment des molécules d'adhésion permettant leur transmigration et subissent une polarisation pour devenir des macrophages tissulaires de type 1. Ils sécrètent des cytokines (Tumor Necrosis Factor TNF, IL-1 et IL-6) et chimiokines (IL-8)

pro-inflammatoires, et permettent l'élimination des cellules nécrotiques et des débris par une activité phagocytosique et protéolytique intense (Dewald O et al., 2005). De plus, la réponse macrophagique permet l'activation, la prolifération et la migration des fibroblastes.

Les **fibroblastes** activés sécrètent des MMPs, des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, entretenant la réponse inflammatoire (Shinde AV et Frangogiannis NG, 2014). Leur transdifférenciation en myofibroblastes sécrétants est retardée afin de permettre le bon déroulement du processus inflammatoire avant la formation de la cicatrice fibreuse.

Les **lymphocytes B** participent au recrutement des monocytes pro-inflammatoires (Zouggari Y et al., 2013).

L'activation des **mastocytes** permet leur dégranulation, à l'origine de la libération de médiateurs pro-inflammatoires (Frangogiannis NG et al., 2005).

iii. **Suppression et résolution de la réponse inflammatoire**

Elle se fait par immunomodulation via la suppression des signaux pro-inflammatoires et l'activation des signaux anti-inflammatoires, à l'origine de l'apoptose des cellules inflammatoires. Elle permet la mise en place concomitante des processus de réparation : formation de la cicatrice fibreuse et néovascularisation.

Tout d'abord, les **PNN** possèdent une courte durée de vie : leur apoptose programmée promeut l'arrêt de la libération de médiateurs pro-inflammatoires. Les PNN apoptotiques sont ensuite phagocytés par les macrophages (Soehnlein O et Lindbom L, 2010). Ces interactions assurent l'orientation des macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire (Horckmans M et al., 2016).

Ensuite, la polarisation des **macrophages** vers un phénotype M2 assure la résolution de la phase inflammatoire (Leblond AL et al., 2015). Ce changement phénotypique s'accompagne de la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires et profibrotiques (IL-10, Transforming Growth Factor (TGF)- β), de facteurs pro-angiogéniques, et de la transdifférenciation des fibroblastes cardiaques en myofibroblastes. Cette étape est indispensable au contrôle et à la résolution de l'inflammation, limitant ainsi les dommages tissulaires cardiaques liés au processus de réparation post-IDM (Horckmans M et al., 2016).

Les **cellules dendritiques** infiltrent les tissus nécrotiques pendant la phase de réparation. Leur potentiel régulateur favorise la résolution de l'inflammation et les processus de réparation tissulaire (Anzai A et al., 2012).

Les **lymphocytes** T régulateurs CD4⁺ interviennent dans la modulation de la réaction inflammatoire via la polarisation des macrophages en type M2 anti-inflammatoire, permettant d'éviter un remodelage cardiaque excessif (Hofmann U et al., 2012). Les cellules Natural Killer sont également importantes dans la résolution de la phase inflammatoire via la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires.

iv. Phase de prolifération/réparation : réponse fibreuse

La résolution de la réponse inflammatoire se fait en parallèle de l'activation des processus de réparation (néovascularisation et réponse fibreuse).

La fibrose réparatrice consiste en la prolifération des (myo)fibroblastes qui sécrètent une nouvelle MEC, aboutissant à la constitution d'une cicatrice fibreuse indispensable afin d'éviter la rupture ventriculaire (Frangogiannis NG 2012 ; van den Borne SW et al., 2010). La réponse fibreuse correspond à deux processus différents : une fibrose réparatrice au sein du myocarde infarci, suivie d'une fibrose réactionnelle pathologique dans le myocarde sain et bordant l'IDM.

Tout d'abord, la **fibrose réparatrice** permet, dans la zone nécrotique et la zone bordant l'IDM, le remplacement du tissu cardiaque nécrosé par une cicatrice fibreuse produite par les fibroblastes et les myofibroblastes. La principale source des fibroblastes destinés à réparer le myocarde lésé est la population de cellules dérivées de l'épicarde (Ruiz-Villalba A et al., 2015).

Les myofibroblastes, absents du myocarde sain, possèdent des propriétés migratrices, sécrétrices et contractiles, assurant le maintien de l'intégrité structurelle du ventricule infarci par la sécrétion de protéines de la MEC.

Cette fibrose réparatrice se met en place chez la souris dès le 4^{ème} jour post-IDM et peut durer plusieurs semaines

La deuxième phase de la réponse fibreuse, ou **fibrose réactionnelle**, concerne le myocarde sain. Elle est médiée par une augmentation du stress pariétal et de l'expression de l'angiotensine II, activant la sécrétion de TGF- β par les (myo)fibroblastes et les cardiomyocytes (Weber KT et al., 2013). TGF- β et l'angiotensine II stimulent la sécrétion d'endothéline-1 par les cellules endothéliales, un puissant facteur pro-fibrotique (Leask

A 2010). Ces deux facteurs sont responsables de l'activation, de la migration et de la transdifférenciation des fibroblastes en myofibroblastes, permettant la synthèse des protéines de la MEC (Dobaczewski M et al., 2011).

Ce remodelage pathologique progressif est à l'origine d'une diminution de la compliance ventriculaire (fibrose interstitielle), et d'une ischémie des cardiomyocytes survivants par altération du débit sanguin coronaire (fibrose (péri)vasculaire), aboutissant à une dysfonction systolo-diastolique et une insuffisance cardiaque (Dai Z et al., 2012).

v. Phase de prolifération/réparation : néovascularisation

En réponse à l'ischémie du post-IDM, la néovascularisation joue un rôle prédominant dans la réparation cardiaque grâce à la vasculogénèse, l'angiogénèse, l'artériogénèse, au développement d'une circulation collatérale et à la réouverture d'anastomoses préexistantes (Schirmer SH et al., 2009). En limitant l'hypoxie dans la zone nécrosée et celle bordant l'IDM, le développement de nouveaux vaisseaux coronaires assure la survie des cardiomyocytes hibernants (empêchant ainsi l'extension de l'IDM) et permet le bon déroulement des mécanismes de réparation (Jaffer FA et al., 2006).

De façon synthétique, l'hypoxie tissulaire liée à l'IDM déclenche une réponse angiogénique par stabilisation du facteur induit par l'hypoxie HIF-1 α , par une surexpression de VEGF et de l'angiopoïétine 2 (Ang2) dans les cellules bordant l'IDM. Cette phase se caractérise par un détachement des péricytes et une dégradation de la lame basale des capillaires coronaires, permettant une augmentation de la perméabilité vasculaire. L'extravasation de plasma sert de matrice pour la migration des cellules endothéliales dont l'élongation et la prolifération permettent l'extension de l'arbre vasculaire. La formation de néovaisseaux est médiée par la sécrétion paracrine de facteurs pro-angiogéniques (famille des VEGF et des FGF) par les cellules voisines, les cellules inflammatoires et les cellules souches recrutées. Les néovaisseaux bourgeonnent et entrent dans une phase de plasticité, leur permettant une adaptation aux besoins métaboliques du tissu myocardique. Enfin, la phase de maturation, médiée par PDGF (Platelet-derived growth factor) et l'angiopoïétine 1 (Ang1) permet le dépôt d'une lame basale et l'ajout des péricytes pour former des capillaires matures (Carmeliet P 2003 ; Carmeliet P et Jain RK, 2011).

L'activation des voies de signalisation intracellulaires pro-angiogéniques, ou "switch angiogénique" est une réponse à l'hypoxie, au stress pariétal et à la production de radicaux libres consécutifs à l'IDM. Elle met en jeu le facteur transcriptionnel HIF, impliqué dans l'angiogenèse embryonnaire et réexprimé en post-IDM dans les cellules endothéliales, les cardiomyocytes et les cellules inflammatoires du tissu cardiaque (Jürgensen JS et al., FASEB 2004). En conditions d'hypoxie, HIF-1 α stabilisé subit une translocation nucléaire où sa dimérisation avec HIF-1 β assure la liaison aux régions promotrices de gènes cibles pro-angiogéniques (VEGF) ou de gènes assurant le recrutement de cellules souches. HIF-2 α , davantage étudié dans l'angiogenèse tumorale, permet l'expression de facteurs nécessaires à l'artériogenèse tels VEGF-C et Ang1.

La famille des VEGF est constituée de plusieurs ligands (VEGF-A/B/C) et récepteurs (VEGF-R1/2/3) impliqués dans l'angiogenèse et l'artériogenèse (Ferrara N et al., 2003). L'expression des VEGF et de leurs récepteurs est induite en post-IDM (Lee SH et al., 2000). Par sa liaison à son récepteur VEGF-R2, VEGF-A active la survie, la migration et la prolifération des cellules endothéliales, à l'origine d'un réseau vasculaire perméable et immature (Cao R et al., 2004). La dimérisation de VEGF-R2 avec PDGF- β inhibe le signal médié par PDGF- $\beta\beta$ classiquement responsable de la maturation vasculaire, et maintient donc l'arbre vasculaire à un état primitif permettant les mouvements cellulaires nécessaires à la réparation cardiaque (Greenberg JI et al., 2008). En post-IDM, la liaison de PlGF (Placental growth factor) à son récepteur VEGF-R1 transmet un signal pro-angiogénique via l'amplification du signal de VEGF-R2 (Iwasaki H et al., 2011). La liaison de VEGF-C à son récepteur VEGF-R3 active le signal médié par PDGF- β , promulguant la maturation vasculaire (Onimaru M et al., 2009 ; Witzenbichler B et al., 1998).

D'autres facteurs de croissance interviennent dans la néovascularisation post-IDM. La famille des FGF est constituée de nombreux ligands proangiogéniques : FGF-1/2/5, activant la prolifération et la survie des cellules endothéliales en post-IDM (Murakami M et Simons M, 2008).

Le couple Ang1/Tie2 permet un contrôle de la maturation vasculaire pendant l'embryogenèse coronaire, et en réponse à des stimuli variables à l'âge adulte. Les glycoprotéines Ang1 et Ang2 ont une action antagoniste sur leur récepteur tyrosine-kinase Tie2 : Ang1 permet son activation, alors que Ang2 inhibe le signal activateur Ang1/Tie2 par compétition. Tie2 et son corécepteur Tie1 sont spécifiques aux cellules de la lignée endothéliale (Dumont DJ et al., 1992).

Ang1 est un facteur stabilisateur des vaisseaux constitutivement exprimé dans les cellules endothéliales et les péricytes. Pendant l'embryogenèse, elle assure le recrutement des cellules périvasculaires et le maintien des jonctions cellulaires endothéliales (Suri C et al., 1996 ; Thurston G et al., 2000). En post-IDM, elle participe à la stabilisation des vaisseaux néoformés en potentialisant les effets des autres facteurs pro-angiogéniques (Siddiqui AJ et al., 2003).

L'expression de Ang2 est constitutivement basse dans les cellules endothéliales. En post-IDM, elle est très rapidement augmentée par l'hypoxie et la sécrétion de VEGF. La diminution du ratio Ang1/Ang2 devient alors favorable à l'inhibition du signal Ang1/Tie2. En résulte une déstabilisation des vaisseaux en formation (Asahara T et al., 1998), permettant le déclenchement de l'angiogenèse en présence de VEGF (Lobov IB et al., 2002).

En post-IDM, la synthèse du monoxyde d'azote (NO) par les NO synthases (NOS) inductible et endothéliale augmente en réponse à l'hypoxie, améliorant l'angiogenèse et la fonction contractile VG (Shimazu T et al., 2011).

Les progéniteurs endothéliaux adultes sont hétérogènes, leur type cellulaire et leurs mécanismes d'action encore mal décrits.

Citons tout d'abord les progéniteurs endothéliaux dérivés de la moelle osseuse : leur action passe davantage par la sécrétion paracrine de facteurs pro-angiogéniques tel VEGF (Hur J et al., 2004) que par la différenciation en nouvelles cellules endothéliales (Asahara T et al., 1997).

A l'inverse, les progéniteurs cardiaques résidents multipotents possèdent une capacité de différenciation en cellules endothéliales, fibres musculaires lisses et cardiomyocytes (Lyngbaek S et al., 2007). Cependant, leur effet est essentiellement médié par une action paracrine soutenant les mécanismes angiogéniques endogènes.

Enfin, les cellules souches pluripotentes induites, obtenues par reprogrammation de cellules souches somatiques, possèdent des capacités de différenciation en cellules endothéliales, en autres cellules de la paroi vasculaire, et en cardiomyocytes (Narazaki G et al., 2008).

vi. Phase de maturation de la cicatrice fibreuse

Elle suit la phase proliférative de la réparation cardiaque et peut durer des mois.

Cette phase nécessite la suppression des signaux assurant l'activation et la survie des fibroblastes (angiotensine II, TGF- β , FGF), la sécrétion de médiateurs antifibrotiques et enfin l'apoptose des fibroblastes recrutés dans la zone nécrotique et la zone bordant l'IDM (Takemura G et al., 1998 ; van den Borne SW et al., 2010).

La maturation de la MEC permet la résistance du tissu fibreux cicatriciel aux contraintes hémodynamiques, alors que la contraction des myofibroblastes permet la réduction précoce de la taille de l'IDM.

vii. Facteurs modulant le remodelage cardiaque post-IDM

Après une lésion myocardique, de nombreux processus se mettent en place de façon simultanée, destinés à assurer la réparation cardiaque.

La multitude des signaux de danger, de leurs récepteurs, des populations cellulaires mises en jeu, et des situations pathologiques (IDM reperfusé ou non) est à l'origine d'une grande variabilité de la réponse induite. La régulation fine de l'intensité de ces mécanismes, de leur survenue dans le temps et dans l'espace est indispensable au bon déroulement de la réparation cardiaque, afin d'éviter un remodelage pathologique (Kain V et al., 2014).

Une activation courte de la réponse immunitaire innée permet la survie cellulaire. A l'inverse, une activation prolongée ou intense détermine une réponse inflammatoire excessive, majorant les lésions tissulaires. Ainsi, dans les IDM étendus, une inflammation trop intense, non résolutive ou réactivée secondairement est responsable d'un remodelage cardiaque pathologique, aggravant les lésions initiales.

De même, une phase de prolifération excessive est à l'origine d'une fibrose réactionnelle interstitielle et périvasculaire dans le myocarde sain, déterminant une augmentation de la rigidité myocardique. Cette dernière est responsable d'une dysfonction diastolique qui vient s'ajouter à la dysfonction systolique liée à la perte des cardiomyocytes (Mill JG et al., 1990). L'évolution se fait alors vers une dilatation et un amincissement progressifs de la paroi myocardique nécrosée qui devient anévrismale. Dans ces situations de mauvais pronostic, le débit cardiaque diminue et la cardiopathie ischémique évolue sur le moyen terme vers l'insuffisance cardiaque.

Plusieurs facteurs déterminent l'importance du remodelage VG : la taille et la transmuralité de l'IDM (durée de l'ischémie, efficacité de la reperfusion coronaire), et le

stress pariétal (Pirolo JS et al., 1986). D'autres facteurs vont profondément moduler la réponse inflammatoire, tels l'âge et le sexe des individus, la génétique et les facteurs de risque associés (hypertension artérielle, diabète).

Le pronostic post-IDM dépend donc en partie de l'existence et de l'importance du remodelage VG (Verma A et al., 2008), en faisant une cible thérapeutique de choix afin de limiter la morbi-mortalité liée à l'IDM.

d. Mécanismes de régénération cardiaque

Le remodelage cardiaque ne permet pas une réparation ad integrum. En effet, les mécanismes de régénération mis en jeu après une lésion cardiaque sont largement insuffisants pour rétablir une architecture et un fonctionnement cardiaques normaux. Chez l'homme adulte, la découverte d'un potentiel de renouvellement des cardiomyocytes a ouvert la voie de la médecine régénérative, visant à optimiser ces mécanismes de réparation (Avolio E et al., 2015).

Chez l'homme et le rongeur, le taux de renouvellement des cardiomyocytes augmente après lésion myocardique (Kajstura J et al., 1998). Ainsi, les cardiomyocytes matures se dédifférencient afin de retrouver des capacités prolifératives (Senyo SE et al., 2013). De plus, les cellules souches cardiaques résidentes prolifèrent et se différencient en différents types de cellules cardiaques, dont les cardiomyocytes (Uchida S et al., 2013 ; Ellison GM et al., 2013). Enfin, les cellules souches périphériques prolifèrent et migrent vers la région bordant la lésion cardiaque (Wu JM et al., 2015). Leur mécanisme d'action repose sur un effet paracrine prédominant : activation des cellules souches cardiaques résidentes, stimulation de la division des cardiomyocytes matures, et sécrétion des facteurs anti-apoptotiques destinés à améliorer la survie des cardiomyocytes matures (Kim SW et al., 2014 ; Avolio E et al., 2015). A l'inverse, leur capacité de différenciation en cardiomyocytes semble très limitée.

Pourtant, ces mécanismes de régénération intrinsèques sont largement insuffisants et ne permettent pas de restaurer le myocarde nécrosé en post-IDM.

e. Perspectives thérapeutiques

Les capacités régénératives du myocarde des mammifères adultes sont limitées : en cas de lésion myocardique, la génération de nouveaux cardiomyocytes n'est possible qu'en quantité largement insuffisante, la zone infarctée se transformant en un tissu cicatriciel fibreux non contractile au terme d'un remodelage tissulaire.

Pendant des années, les traitements de l'insuffisance cardiaque se sont focalisés sur les vasodilatateurs et les diurétiques, afin de soulager la charge cardiaque et les symptômes de l'insuffisance cardiaque. L'introduction de drogues interférant avec le système beta-adrénergique et le système rénine angiotensine a permis d'améliorer la survie des patients en limitant les mécanismes de compensation délétères mis en place. La prise en charge actuelle de l'insuffisance cardiaque ne permet cependant pas de restaurer complètement la fonction musculaire. Le développement de nouvelles cibles thérapeutiques est donc un enjeu important dans ce domaine.

Une meilleure connaissance des gènes et des voies moléculaires impliqués dans la pathologie cardiovasculaire est nécessaire au développement d'une médecine régénérative. Cette médecine vise à utiliser et optimiser les capacités endogènes de réparation du tissu cardiaque, afin d'éviter le développement d'un remodelage cardiaque pathologique de mauvais pronostic.

Dans la cardiopathie ischémique et l'insuffisance cardiaque, les principaux axes de recherche portent sur le développement d'une néovascularisation coronaire à partir de la zone bordante de l'infarctus, sur la limitation de l'inflammation et de la fibrose réactionnelle à l'origine du remodelage pathologique, sur la diminution du stress oxydatif et de la mort cellulaire programmée des cardiomyocytes, sur la stimulation du renouvellement des cardiomyocytes et la restauration de la contractilité des cardiomyocytes.

La médecine régénérative se base principalement sur la thérapie cellulaire, la thérapie génique, et l'utilisation de facteurs de croissance.

i. Thérapie cellulaire

Elle consiste à greffer des cellules afin de restaurer la fonction d'un tissu ou d'un organe et de soigner durablement le patient. Les cellules sont obtenues à partir de cellules souches, c'est-à-dire dotées d'une capacité d'auto-renouvellement infini et capables de se différencier en au moins un autre type cellulaire. En pathologie cardiovasculaire, un

potentiel élevé de différenciation vers la lignée cardiaque, en particulier les cardiomyocytes, est indispensable.

De nombreuses lignées de cellules souches potentielles ont été identifiées dans la littérature, mais leur efficacité dans la réparation cardiaque est difficilement comparable étant donné l'hétérogénéité des protocoles de sélection, de culture et de manipulation utilisés (Stamm C et al., 2009 ; Garbern JC et al., 2013). Ainsi, les nombreuses études sur la thérapie cellulaire n'ont pas permis d'identifier une origine cellulaire plus favorable à la réparation cardiaque (Madonna R et al., 2016).

Pour simplifier, il est possible de séparer les cellules souches entre cellules de première et de deuxième génération.

Les premières sont les plus étudiées : principalement les cellules stromales mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse ou du tissu adipeux (Menasché P et al., 2008), et les progéniteurs endothéliaux issus du sang périphérique.

Les cellules souches de deuxième génération sont de découverte plus récente souvent mieux purifiées et "modifiées" avant leur injection intra-coronaire, et possèdent le potentiel de différenciation en cardiomyocytes le plus élevé. On compte parmi elles les "cellules souches cardiaques" résidentes, comprenant les cellules (dérivées) des cardiosphères (Messina E et al., 2004), les cellules c-kit⁺ (Beltrami AP et al., 2003). Il faut également citer les cellules souches pluripotentes : les cellules souches embryonnaires et les cellules souches pluripotentes induites (par reprogrammation de cellules somatiques matures, le plus souvent des fibroblastes cardiaques) (Yao M et al., 2003). Malgré des résultats encourageants, l'utilisation de ces cellules souches pluripotentes pose des problèmes encore non résolus : risque tumoral, questions éthiques pour les cellules embryonnaires, et risque significatif de mutagenèse pour les cellules pluripotentes induites (Menasché P et al., 2015 ; Mauritz C et al., 2008).

La thérapie cellulaire a montré sa sécurité et son efficacité dans les études précliniques, principalement sur le petit animal (Zwetsloot PP et al., 2016). Ses effets sont principalement médiés par une action paracrine : activation des cellules souches cardiaques résidentes, stimulation de la néovascularisation et de la division des cardiomyocytes matures, limitation du remodelage cardiaque pathologique et de l'apoptose des cardiomyocytes survivants (Kim et al., 2010).

Chez l'homme, aucun effet secondaire grave et limitant n'a été enregistré. Cependant, les résultats très modestes observés sur l'amélioration de la fonction

cardiaque font se poser des questions d'ordre méthodologiques (Fisher SA et al., 2015). Les limites connues de la thérapie cellulaire sont la faible intégration et la faible persistance des cellules dans le tissu cible. Des solutions ont été envisagées pour surmonter ces obstacles (Madonna R et al., 2016).

ii. Thérapie génique

La thérapie génique a été développée dans la pathologie cardiaque dans les années 1990 (Lin H et al., 1990). Elle utilise les acides nucléiques (ADN ou ARN) à des fins thérapeutiques, et se focalise sur la réactivation ou la prolongation de voies de signalisation naturelles impliquées dans les mécanismes de régénération cardiaque.

Plusieurs axes de recherche se sont révélés intéressants.

Tout d'abord, les études se sont concentrées sur la stimulation de l'angiogenèse dans la coronaropathie, via les facteurs de croissance classiques (VEGF, FGF, PlGF et HIF-1 α). Ces interventions ont montré des résultats encourageants avec une bonne sécurité dans les modèles pré-cliniques (Zangi L et al., 2013 ; Heilmann C et al., 2002 ; Iwasaki H et al., 2011 ; Heintz-Green A et al., 2005). Malgré des essais de phase I rassurants (Kilian EG et al., 2010), les études cliniques ont été décevantes pour VEGF et FGF (Hedman M et al., 2009 ; Kukula K et al., 2011).

Ensuite, les chercheurs se sont intéressés à la restauration de la contractilité myocardique en améliorant le couplage électro-mécanique, via une modulation des protéines impliquées dans l'homéostasie calcique cardiomyocytaire. Cette modulation a prouvé des résultats prometteurs dans les études précliniques (Mariani JA et al., 2011).

De plus, la restauration de la contractilité myocardique par modulation de la voie beta-adrénergique est une voie intéressante de recherche dans la thérapie cellulaire après une lésion myocardique (Raake PW et al., 2013).

Enfin, la restauration de la fonction contractile cardiaque peut être obtenue par reprogrammation de fibroblastes cardiaques en cardiomyocytes au moyen de facteurs de transcription (Qian L et al., 2012) ou de microARN in vivo (Jayawadana TM et al., 2015), faisant la transition entre thérapie génique et thérapie cellulaire.

D'autres cibles pourraient se révéler intéressantes dans l'avenir : contrôle du remodelage de la MEC et de la réponse fibreuse (via l'inhibition du signal pro-fibrotique TGF- β ou la modulation de la balance entre MMPs et leurs inhibiteurs, ou encore modulation de la réaction inflammatoire.

iii. Facteurs de croissance

L'utilisation de facteurs de croissance est une approche intéressante dans la stimulation de l'angiogenèse (Beohar N et al., 2010).

La thérapie angiogénique met en jeu la délivrance de facteurs pro-angiogéniques, principalement VEGF et FGF, avec des limites certaines (Taimeh Z et al., 2013 ; Zhang J et Li Y, 2016).

Un intérêt croissant est porté aux facteurs anti-apoptotiques (Hsieh PC et al., 2006), de même qu'aux facteurs activant et mobilisant les cellules souches (Askari AT et al, 2003) ou permettant la réentrée des cardiomyocytes adultes dans le cycle cellulaire (neuréguline Liu X et al., 2006).

Devant la multitude des mécanismes impliqués dans la réparation cardiaque, une intervention thérapeutique isolée ne semble pas adaptée.

L'avenir réside certainement dans une thérapie combinée, associant thérapie angiogénique, stimulation des cellules souches cardiaques par thérapie génique, et cotransplantation de cellules souches périphériques (Kanashiro-Takeuchi RM et al., 2011).

iv. Interactions des traitements cardiologiques avec les mécanismes de régénération endogène

Il existe des interactions entre ces mécanismes régénérateurs cardiaques endogènes et les traitements classiquement prescrits dans la pathologie cardiaque.

L'aspirine réduit le nombre et l'activité des cellules souches cardiaques et périphériques (Deng L et al., 2009), ainsi que la survie et le renouvellement des cardiomyocytes (Tan C et al., 2013). Les beta-bloquants possèdent un effet anti-apoptotique par inhibition du signal beta1-adrénérique (Seqqat R et al., 2012). De plus, les inhibiteurs du système rénine-angiotensine ont un effet anti-apoptotique sur les cardiomyocytes (Kajstura J et al., 1997). Enfin, les statines améliorent le pronostic en post-IDM, par des effets anti-apoptotiques sur les cardiomyocytes, anti-fibrotiques, et des effets activateurs sur les cellules souches cardiaques et périphériques (Suzuki G et al., 2009 ; Tang XL et al., 2011).

4. Les différents gènes étudiés

a. PPAR β/δ

Les récepteurs activés par les proliférateurs des peroxyosomes (Peroxisome Proliferator Activated Receptors ou PPARs) sont des récepteurs nucléaires de classe I. Identifiés en 1990, ces facteurs transcriptionnels sont impliqués dans le métabolisme lipidique, l'homéostasie énergétique et la régulation de l'inflammation (Issemann I et Green S, 1990 ; Desvergne B et al, 2006).

Il en existe trois isoformes : PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2), et PPAR γ (NR1C3).

Leurs ligands sont les acides gras saturés, les acides gras polyinsaturés et leurs dérivés (Schupp M et Lazar MA, 2010). Des ligands de synthèse existent, spécifiques à chaque isoforme : agonistes (GW501516, GW0742 et L-165041 pour PPAR β/δ) ou antagonistes (GSK3787 pour PPAR β/δ) (Sznajdman ML et al, 2003 ; Shearer BG et al 2008).

Les PPARs forment un hétérodimère avec le récepteur du 9-cis acide rétinoïque (Desvergne B et Wahli W, 1999). La liaison d'un ligand sur l'un des deux récepteurs provoque l'activation de l'hétérodimère et son interaction avec les éléments de réponse situés dans les régions promotrices des gènes cibles de PPAR (PPRE pour PPAR Response Elements). La fixation du ligand modifie la conformation du dimère et permet le recrutement d'un coactivateur afin de faciliter l'initiation de la transcription : on parle de transactivation ligand-dépendante (Chinetti G et al., 2000 ; Yu S et Reddy JK, 2007). La liaison de PPAR à son ligand peut également réguler négativement l'expression génique par interaction compétitrice avec les coactivateurs, par interaction directe avec les autres facteurs transcriptionnels ou en inhibant la cascade des MAPK : on parle de transrépression ligand-dépendante (Li M et al., 2000).

Une activation non ligand-dépendante de la transcription des gènes cible des PPARs est possible : la liaison de PPAR à un corépresseur diminue la disponibilité de ce dernier pour d'autres facteurs transcriptionnels, augmentant leur activité. A l'inverse, l'activation de PPAR libère le corépresseur, rendu disponible pour exercer son action inhibitrice sur d'autres facteurs transcriptionnels (Wahli W et Michalik L, 2012).

Le rôle physiologique des PPARs est déterminé par la distribution tissulaire des récepteurs, la liaison au ligand et aux corégulateurs. PPAR α est principalement retrouvé dans les tissus à fort catabolisme lipidique (foie, cœur, rein, muscle squelettique,

pancréas). Il est responsable d'une activation du transport, de l'oxydation et du stockage des acides gras, et d'une diminution de l'oxydation du glucose. PPAR β/δ présente une distribution tissulaire ubiquitaire, avec une expression importante dans le tissu adipeux, le cerveau, le cœur, le muscle squelettique. Il favorise le métabolisme oxydatif lipidique et glucidique, ainsi que la glycolyse. PPAR γ est essentiellement exprimé dans le tissu adipeux, où il est insulinosensibilisateur et active le transport des acides gras, leur oxydation et leur stockage (Gilde AJ et al., 2003).

Toutes les isoformes de PPAR possèdent des propriétés anti-inflammatoires, ce qui en fait des cibles de choix dans la pathologie cardiovasculaire. Ainsi, des agonistes de PPAR α , les fibrates, ont montré des effets hypolipémiants intéressants chez l'homme. Des agonistes de PPAR γ , les thiazolidinediones ou glitazones (pioglitazone et rosiglitazone), ont été utilisés comme insulinosensibilisateurs dans le diabète de type 2, mais retirés du marché français devant la survenue d'effets secondaires graves (augmentation du risque de néoplasie de vessie pour la première, majoration du risque cardiovasculaire pour la seconde).

Au niveau **cardiaque**, PPAR β/δ joue un rôle fondamental dans la régulation du métabolisme lipidique (Wagner K-D et Wagner N, 2010). L'équipe de *Liu* a montré que la surexpression de PPAR β/δ dans les cardiomyocytes augmente le métabolisme oxydatif lipidique et les performances cardiaques sans occasionner de lipotoxicité, de même qu'elle protège contre le remodelage cardiaque pathologique (Liu J et al., 2011). A l'inverse, la délétion de PPAR β/δ dans les cardiomyocytes est à l'origine d'une hypertrophie cardiaque, d'un déficit énergétique, et d'une lipotoxicité cardiaque par accumulation de métabolites toxiques (Cheng L et al, 2004). De plus, PPAR β/δ semble être un déterminant de la transition vers le métabolisme glucidique en post-IDM, moins consommateur d'oxygène (el Azzouzi H et al., 2013).

La cardioprotection attribuée à l'activation de PPAR β/δ se manifeste par ses effets sur le métabolisme lipidique, mais aussi ses propriétés anti-apoptotiques (Palomer X et al., 2014), anti-oxydantes (Pesant M et al., 2006 ; Wang P et al., 2010), et insulinosensibilisatrices (Raheer MJ et al., 2008 ; Wang YX et al., 2003), participant aux effets anti-inflammatoires décrits dans la littérature (Barish GD et al, 2008). Ces propriétés se traduisent chez l'animal par une diminution de lésions d'ischémie-reperfusion en cas de stimulation ou de surexpression cardiomyocytaire de PPAR β/δ (Yue TL et al., 2008 ; Burkart EM et al., 2007). Il est important de signaler que l'inflammation et

l'insulinorésistance diminuent l'expression de *PPARβ/δ* : les cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-6) sont connues pour favoriser la dégradation de *PPARβ/δ* et limitent donc ses effets protecteurs (Haffar T et al., 2015).

Dans le **muscle squelettique**, la stimulation des récepteurs *PPARβ/δ* induit un remodelage oxydatif (privilégiant le métabolisme lipidique) et une angiogenèse accrue (Luquet S et al., 2003 ; Wang YX et al., 2004). A l'inverse, la délétion de *PPARβ/δ* oriente le muscle squelettique vers un métabolisme glycolytique (Schuler M et al., 2006).

Les effets **pro-angiogéniques** de l'activation de *PPARβ/δ* sont démontrés : diminution de l'apoptose des cellules endothéliales (Piqueras L et al., 2007), activation des progéniteurs endothéliaux (Han JK et al., 2008), amélioration de la fonction endothéliale par diminution du stress oxydatif (d'Uscio LV et al., 2014) et effets anti-inflammatoires (Santhanam AV et al., 2012). Les nombreux travaux étudiant la tumorigenèse montrent l'importance de *PPARβ/δ* dans le switch angiogénique nécessaire à la progression tumorale (Abdollahi A et al., 2007). Ces propriétés sont très peu étudiées au niveau de la vascularisation coronaire : la seule étude disponible, réalisée par notre équipe, montre un effet pro-angiogénique manifeste (Wagner N et al., 2009).

b. *Wt1*

Le gène suppresseur de tumeur de Wilms 1 a été identifié en 1990 par *Haber et coll.* chez des patients porteurs de tumeurs de Wilms (néphroblastomes de l'enfant) pour lesquels une mutation inactivatrice de *WT1* était rapportée dans 15% des cas (Haber DA et al., 1990).

La régulation de *WT1* est complexe, pouvant expliquer les nombreuses et parfois contradictoires fonctions qu'on lui connaît. Tout d'abord, la présence de 2 sites d'épissage alternatif peut donner naissance à 4 isoformes de *WT1* : une protéine possédant plus ou moins l'exon 5 (Natoli TA et al., 2002), ou une protéine possédant plus ou moins une séquence de 3 acides aminés (KTS pour lysine-thréonine-sérine). Ces deux dernière formes (KTS+ et KTS-) lui confèrent des rôles différents chez la souris (Hammes A et al., 2001 ; Wagner N et al., 2005). Ensuite, d'autres isoformes de *WT1* dérivent d'un site alternatif d'initiation de la transcription, ou d'un exon 1 alternatif, sans répercussion apparente sur leur fonction. Enfin, les modifications post-traductionnelles de *WT1* sont nombreuses : phosphorylation, ubiquitination, SUMOylation (Ye Y et al., 1996 ; Makki Ms et al., 2008 ; Smolen GA et al., 2004).

WT1 contrôle des fonctions cellulaires essentielles : survie, prolifération et différenciation. L'observation d'effets diamétralement opposés selon les tissus et le stade de développement concernés a poussé les auteurs à classer *WT1* à la fois comme gène suppresseur de tumeur et oncogène. Cette approche est désormais remise en question : *WT1* agirait davantage comme un "gène caméléon", ses effets transcriptionnels sur les gènes contrôlant la prolifération et la différenciation cellulaire variant en fonction du niveau de différenciation cellulaire (Huff V 2011). Ainsi, durant le développement embryonnaire, *WT1* favorise la différenciation cellulaire afin de participer à la formation des systèmes cardio-circulatoire et génito-urinaire (Moore AW et al., 1999 ; Wagner N et al., 2005). A l'inverse, à l'âge adulte, *WT1* semble induire la prolifération, la survie des cellules cancéreuses et l'angiogenèse tumorale, de sorte qu'elle est une cible intéressante dans le traitement de certaines leucémies (Morita S et al., 2006 ; Wagner KD et al., 2014). Si *WT1* agit principalement comme facteur de transcription, cette protéine peut aussi réguler l'expression des gènes via des modifications post-transcriptionnelles (Larsson SH et al., 1995).

WT1 est indispensable à l'embryogenèse cardiovasculaire, en initiant l'activation de l'épicarde à l'origine de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) des cellules épocardiques en cellules dérivées de l'épicarde, via une activation de *Snai1* (codant pour le protéine Snail), et une répression de *cadhérine-1* (codant pour la protéine E-cadhérine) (Wagner et al., 2005 ; Martinez-Estrada OM et al., 2010). L'activation de la voie de Wnt par *WT1* est également indispensable au bon déroulement de la migration et de la différenciation des cellules dérivées de l'épicarde (Zamora M et al., 2007). Nécessaire à la synthèse de l'acide rétinoïque, *Raldh2* est une cible majeure de *Wt1* : sa délétion constitutionnelle est à l'origine des mêmes anomalies phénotypiques cardiaques que celle de *Wt1* (von Gise A et al., 2011). *WT1* est ainsi responsable de la répression du phénotype épithélial épocardique et de la différenciation des progéniteurs mésenchymateux dérivés de l'épicarde en différents types cellulaires cardiaques : fibroblastes, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et péricytes des vaisseaux coronaires (Duim SN et al., 2015 ; Katz TC et al., 2012). De ce fait, la délétion constitutionnelle de *Wt1* est responsable d'anomalies épocardiques et péricardiques, d'un amincissement des ventricules par défaut de synthèse de l'acide rétinoïque, de communications atrio-ventriculaires, et de saignements à l'origine de mort in utero (Kreidberg JA et al., 1993 ; Wagner N et al., 2005).

Dans le cœur adulte sain, *Wt1* est faiblement exprimé dans l'épicaarde quiescent et dans l'endothélium coronaire (Wagner KD et al., 2002). Il n'est pas exprimé dans les vaisseaux sanguins non coronaaires.

Au décours d'un IDM, la libération rapide de cytokines pro-inflammatoires (Dehbi M et al., 1998) et l'hypoxie tissulaire (Wagner KD et al., 2003) sont à l'origine d'une réactivation d'un programme embryonnaire foetal dans les cellules épicaardiques. L'expression élevée de *Wt1* et *Raldh2* permet la TEM (van Wijk B et al., 2012 ; von Gise A et al., 2012). La perte d'intégrité de l'épicaarde est le primum movens de la réponse régénérative. Les cellules dérivées de l'épicaarde expriment entre autres *Snail*, et prolifèrent dans l'espace sous-épicaardique. Leur capacité à se différencier en plusieurs types cellulaires (cellules vasculaires musculaires lisses et fibroblastes) et à migrer dans le myocarde lésé sont communément admises, participant à la régénération du tissu nécrosé en post-IDM (Wagner KD et al., 2002 ; Wessels et al., 2012 ; Smart N et al., 2011). Cependant, ces deux concepts sont soumis à discussion : certains travaux n'objectivent pas la migration des cellules dérivées de l'épicaarde dans le myocarde ni leur différenciation en cardiomyocytes ou en cellules endothéliales (Zhou B et al., 2011 ; Zhou B et al., 2012). Ainsi, une proportion importante de leurs effets passe par la sécrétion de facteurs trophiques et pro-angiogéniques destinés à leur environnement sous-épicaardique.

Enfin, *Wt1* est présent dans les cellules endothéliales de la zone bordante puis de la zone nécrosée, colocalisé avec VEGF (Wagner KD et al., 2003 ; Wagner KD et al., 2002).

Wt1 exerce des effets pro-angiogéniques en stimulant la prolifération des cellules endothéliales (Wagner N et al., 2008), en augmentant l'expression endothéliale de *VEGF* et de *Pecam-1* (Wagner KD et al., 2014) et possède des effets anti-inflammatoires (Sciesielski LK et al., 2010). *WT1* permet aussi le remodelage de la MEC (via la sécrétion endothéliale de MMP dont MMP-9 ; Katuri V et al., 2014), la réorganisation du cytosquelette cellulaire afin de permettre la migration cellulaire, et elle régule l'apoptose cellulaire. Ces propriétés sont connues pour favoriser la réparation cardiaque en post-IDM.

c. *Cyp51*

Ce gène code pour la Cytochrome P450 Lanostérol 14 α -déméthylase, une enzyme ubiquitaire essentielle à la synthèse du cholestérol chez les mammifères. La voie de synthèse du cholestérol est schématisée dans la figure 4. Ce gène a été identifié chez la levure en 1984 (Yoshida Y et Aoyama Y, 1984), et chez le mammifère en 1986 (rat Trzaskos J et al., 1986).

Le cholestérol intervient avec les phospholipides et les sphingolipides dans la composition des membranes cellulaires. Il contrôle la perméabilité et la fluidité membranaire, de même que l'activité et la distribution des protéines membranaires (récepteurs, canaux ioniques Schaller H 2003). Il est également indispensable à la synthèse des hormones stéroïdiennes, et impliqué dans les voies de signalisation de Shh et de l'acide rétinoïque (Keber R et al., 2011).

Pendant l'embryogenèse humaine, l'exposition à de fortes doses d'antifongiques azolés, de puissants inhibiteurs de CYP51, ou une mutation inactivatrice du gène sont à l'origine du syndrome d'Antley-Bixler, associant malformations cardiaques, osseuses et génito-urinaires. Un modèle murin de délétion globale et constitutionnelle de *Cyp51* a reproduit des anomalies comparables, responsables d'une létalité embryonnaire (Keber R et al., 2011). Parmi les anomalies cardiaques, on note une hypoplasie ventriculaire, la survenue de communications interventriculaires, un défaut d'angiogenèse associé à un péricarde discontinu et aminci. Au niveau moléculaire, les auteurs retrouvent un défaut d'activation des voies de l'acide rétinoïque et de sonic hedgehog (Shh) par diminution de la liaison au cholestérol (Porter JA et al., 1996, Huq MD et al., 2006). Ces voies sont indispensables à la communication entre épicaarde et myocarde pendant l'organogenèse cardiaque (Lavine KJ et al., 2008 ; Kastner P et al., 1997). *Cyp51* semble donc jouer un rôle majeur dans l'organogenèse, en particulier l'angiogenèse coronaire et l'embryogenèse cardiaque (Keber R et al., 2011). Dans ce même travail, l'absence de *Cyp51* provoque une augmentation compensatrice de l'expression des autres gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol, une accumulation des métabolites intermédiaires en amont du blocage enzymatique, et une diminution des métabolites intermédiaires en aval du lanostérol, et donc un défaut de synthèse du cholestérol.

Chez l'homme adulte, l'inhibition de la synthèse du cholestérol par les statines (inhibant l'HMGCoA réductase) est utilisée à visée hypolipémiant sans effets secondaires majeurs fréquents.

Un traitement par antifongique azolé, inhibiteur de CYP51, bloque l'angiogénèse dépendante de VEGF et de FGF (Chong CR et al., 2007), ce qui traduit les effets pro-angiogéniques de CYP51. De plus, dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez le rat, l'expression de *Cyp51* est augmentée par le pré-conditionnement, dénotant son rôle potentiel dans l'angiogénèse à l'âge adulte, en particulier en post-infarctus (Canatan H 2008).

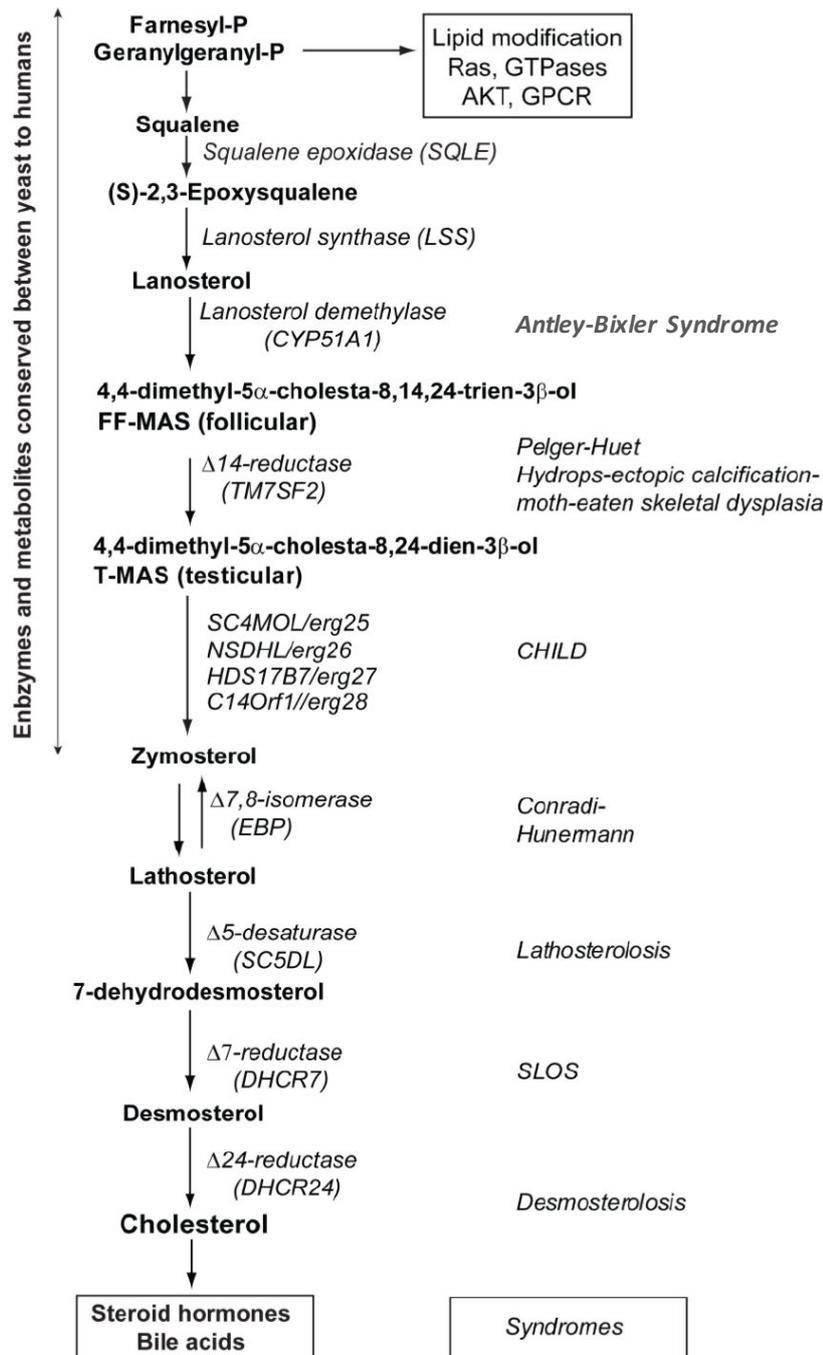


Figure 4 : Voie de synthèse du cholestérol, d'après "regulation of cholesterol biosynthesis and cancer signaling", Gorin A et al., 2012.

d. *Dnmt2*

Le gène *Dnmt2* (DNA-(cytosine-C5) méthyltransferase), également appelé *Trdmt1* (TRNA Aspartic Acid Methyltransferase 1) est un gène hautement conservé identifié en 1998, et codant pour une protéine appartenant à la famille des ADN-méthyltransférases (Okano M et al., 1998). Les analyses ont cependant montré une faible activité ADN-méthyltransferase malgré une homologie importante de séquence et de structure (Goll MG et Bestor TH, 2005).

Dnmt2 est désormais reconnue comme ARNt-méthyltransferase, impliquée dans la stabilisation des ARN de transfert (empêchant leur dégradation) participant au contrôle du métabolisme cellulaire, et dans la régulation épigénétique (Goll MG et al., 2006 ; Schaefer M et al., 2010 ; Kiani J et al., 2013). Il semble donc que *Dnmt2* utilise un mécanisme propre aux ADN-méthyltransferases afin de méthyliser les ARN de transfert, sans cependant pouvoir être classée comme une ARNt-méthyltransferase ordinaire (Jeltsch A et al., 2006). La protéine est localisée dans le noyau et le cytoplasme, témoignant de ces fonctions différentes (Schaefer M et al., 2008).

La délétion de *Dnmt2* est silencieuse dans la majorité des modèles étudiés, à l'exception du poisson zèbre chez qui elle est responsable d'anomalies développementales létales (hépatiques, cérébrales et osseuses mais pas cardiaques Rai K et al., 2007). De façon intéressante, la délétion constitutionnelle de *Dnmt2* chez la souris semble associée à une incidence accrue des maladies cardiovasculaires (Tuorto F et al., 2015). Cependant, son rôle dans la fonction cardiaque adulte est encore méconnu.

PROBLEMATIQUE

PPAR β/δ , *Wt1* et *Cyp51* sont essentiels à l'angiogenèse, au métabolisme et à l'homéostasie énergétique des cellules cardiaques. Pourtant, leur rôle dans le fonctionnement normal du cœur ainsi que dans la réparation cardiaque en post-infarctus (où l'angiogenèse joue un rôle majeur) sont peu étudiés. Ce travail vise à préciser ces effets en explorant les conséquences structurelles et fonctionnelles d'une modification de leur expression (surexpression de *PPAR β/δ* , délétion de *Wt1* ou de *Cyp51*) et les mécanismes moléculaires sous-jacents. Le développement d'un modèle de modulation conditionnelle de l'expression de *Wt1*, de *Cyp51* et de *PPAR β/δ* spécifique de la lignée endothéliale permet l'étude de leur rôle chez la souris adulte saine et dans différentes situations pathologiques comme le post-IDM.

Par ailleurs, le rôle du gène *Dnmt2* dans la fonction cardiaque est encore méconnu, bien que sa délétion constitutionnelle soit associée à une augmentation de l'incidence des maladies cardiovasculaires. Cette thèse vise donc à préciser son rôle structurel et fonctionnel cardiaque chez la souris adulte saine.

L'approche choisie utilise la modulation conditionnelle de l'expression des gènes *PPAR β/δ* , *Wt1* et *Cyp51* chez la souris adulte. Elle est motivée par les anomalies développementales cardiaques majeures potentiellement létales observées en cas d'inactivation constitutionnelle de *Wt1* ou de *Cyp51*, et par la nécessité d'étudier les conséquences directes de ces modifications génétiques dans le post-IDM.

L'utilisation d'une modulation spécifique de la lignée endothéliale nous paraît innovante et particulièrement intéressante pour étudier le rôle de la cellule endothéliale et de ses interactions dans l'homéostasie cardiaque en conditions normales et dans la réparation cardiaque post-IDM.

Dans ce travail, la délétion de *Dnmt2* est constitutionnelle et globale. Les animaux ne seront pas soumis au modèle chirurgical d'IDM, l'étude visant à préciser le rôle de *Dnmt2* sur la structure et la fonction cardiaques dans les conditions basales.

MATERIEL ET METHODES

1. Animaux

L'expérimentation a porté sur des souris mâles et femelles adultes âgés de 3 à 6 mois de fond génétique C57BL/6 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) initialement appariées sur l'âge et le sexe.

A chacun des gènes étudiés correspond un modèle de souris transgénique :

- les souris $PPAR\beta/\delta$ ont été gracieusement fournies par M. Rassoulzadegan et P Grimaldi (IBV, Université de Nice-Sophia Antipolis) (souris double transgéniques $Tie2-Cre-ER^{T2}; PPAR\beta/\delta^{loxP-STOP-loxP+/+}$; Luquet S et al., 2003),
- les souris $Wt1$ (souris d'intérêt double transgéniques $Tie2-Cre-ER^{T2}; Wt1^{LoxP+/+}$ (Martinez-Estrada OM et al., 2010) générées par croisements de souris homozygotes floxées pour $Wt1$ ($Wt1^{Lox+/+}$) fournies par ND Hastie (Medical Research Council, Edimbourg) avec des souris $Tie2-Cre-ER^{T2}$ obtenues de l'EMMA (European Mutant Mouse Archive),
- les souris $Cyp51$ ont été gracieusement fournies par S Horvart (Université de Ljubljana) (souris d'intérêt double transgéniques $Tie2-Cre-ER^{T2}; Cyp51^{LoxP+/+}$; Keber R et al., 2011),
- les souris $Dnmt2$ ont été fournies par TH Bestor (Département de Génétique et du Développement, Université de Columbia, USA) (Goll MG et al., 2006).

L'utilisation du modèle CreLox (Sauer B et Henderson N, 1988) a permis la recombinaison conditionnelle des gènes $PPAR\beta/\delta$, $Wt1$ et $Cyp51$, contrôlée dans le temps par l'injection de tamoxifène (Metzger D et al., 1995) et limitée spatialement aux cellules endothéliales (activité de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur $Tie2$ spécifique de la lignée endothéliale) (Forde A et al., 2002 ; Schnürch H et Risau W, 1993).

Pour chaque modèle de mutagenèse conditionnelle, deux groupes d'animaux ont été obtenus :

- des animaux induits : injection intra-péritonéale de tamoxifène (33mg/kg/jour) pendant une semaine, à l'origine de l'inactivation de $Wt1$ ou de $Cyp51$ et de la surexpression de $PPAR\beta/\delta$ par excision de la cassette STOP,
- des animaux non induits ou contrôles : injection intra-péritonéale de l'excipient (huile) pendant une semaine, déterminant une expression normale du gène.

Un groupe contrôle a été utilisé pour évaluer l'éventuelle toxicité cardiaque du tamoxifène. Il s'agit d'animaux contrôles simples transgéniques ($Tie2-Cre-ER^{T2}$) induits par injection intra-péritonéale de tamoxifène. La vérification de l'inocuité du tamoxifène

s'est faite dans les groupes des animaux PPAR β / δ (histologie) et Wt1 (échocardiographie).

L'expérimentation est conforme aux recommandations du guide des soins et de l'utilisation des animaux de laboratoire et a obtenu l'approbation du comité d'éthique local de l'Université de Nice-Sophia Antipolis (Comité Institutionnel d'Éthique Pour l'Animal de Laboratoire-Azur (<https://ciepal-azur.unice.fr/>)).

2. Etude échocardiographique

Elle a été réalisée à l'aide du système échocardiographique IE33 xMATRIX et d'une sonde linéaire L15-7io Philips Healthcare (Kononklijke Philips, Amsterdam, Pays-Bas). La sonde, bien que destinée à l'échographie vasculaire humaine, assure une gamme de fréquence d'émission ultrasonore allant de 7 à 15 MHz compatible avec l'étude échocardiographique chez le rongeur.

Une échocardiographie de référence permet de mesurer les paramètres anatomiques et fonctionnels cardiaques de base des souris, c'est-à-dire avant toute intervention chirurgicale. Les animaux sont préalablement traités par tamoxifène ou par l'excipient.

Les mesures échocardiographiques sont réalisées sous sédation (thiopental, Pentothal® 6000 μ l/kg) chez des souris en ventilation spontanée dont la poitrine a été rasée à l'aide d'un rasoir électrique. Les animaux sont placés et maintenus en décubitus latéral gauche sur une plaque chauffante. Si nécessaire, une dose complémentaire d'anesthésique (un cinquième de la dose initiale) peut être administrée pour permettre la fin de l'examen échocardiographique. L'application prudente de la sonde sur la poitrine de l'animal, avec du gel échographique comme interface, permet l'obtention d'images bidimensionnelles et en mode temps-mouvement (TM) en coupe parasternale petit axe au niveau des muscles papillaires. Les mesures ont été réalisées en accord avec les recommandations de la Société Américaine d'Echocardiographie (Quinones MA et al., 2002).

Après l'examen, les souris sont laissées sur la plaque chauffante jusqu'à leur réveil, puis replacées dans leur cage. Les boucles et images enregistrées sont ensuite stockées sur support informatique pour être importées et traitées grâce au logiciel OsiriX (version 4, Pixmeo, Genève).

Le cycle cardiaque est une alternance de phases courtes de contraction cardiaque (ou systoles) et de phases plus longues de relaxation et de remplissage (ou diastoles). La fréquence cardiaque des souris est très élevée, rendant l'analyse échocardiographique plus complexe (Swoap SJ et al., 2004).

Durant l'examen, nous mesurons les dimensions ventriculaires gauches en coupe parasternale petit axe en mode TM (épaisseur pariétale du septum interventriculaire SIV et de la paroi postérieure PP du VG, diamètres internes ventriculaires DIV) en télédiastole (SIVd, DIVd et PPd) et en télésystole (SIVs, DIVs et PPs). Les mesures sont réalisées au moins à 3 reprises, permettant d'obtenir une valeur moyenne plus fiable. La fréquence cardiaque de la souris est enregistrée en milieu d'examen. Ces mesures seront données en valeur absolue puis relative, rapportée au poids des animaux.

Ces mesures permettent d'extrapoler d'autres paramètres VG :

- la fraction de raccourcissement du VG (FR), correspondant à $(DIVd-DIVs)/DIVd \times 100\%$,
- les volumes ventriculaires gauches télédiastolique (VTD) et télésystolique (VTS), extrapolés à partir des diamètres VG par la méthode de Teicholz,
- la fraction d'éjection (FEVG) selon la formule $(VTD-VTS)/VTD \times 100\%$

La fraction de raccourcissement et la fraction d'éjection sont des paramètres représentatifs de la fonction contractile ventriculaire gauche.

L'estimation échocardiographique de la taille de l'IDM est techniquement difficile dans les conditions de l'examen, et n'a donc pas été réalisée dans ce travail.

Cet examen est réalisé préalablement à la ligature coronaire, puis à plusieurs temps en post-IDM définis comme suit : phase aiguë de l'IDM (48 heures après la ligature coronaire) et phase de réparation (3 semaines après l'intervention). L'échocardiographie post-IDM évalue les conséquences de l'IDM sur la fonction contractile et les dimensions cardiaques, liées à la cicatrice de nécrose myocardique et consécutives au remodelage cardiaque, permettant d'estimer la qualité de la réparation post-infarctus selon le génotype de l'animal. Au terme de l'examen final, les souris sont sacrifiées, le cœur est prélevé, pesé puis conservé pour analyses (immuno)histochimiques et moléculaires ultérieures.

L'échocardiographie est réalisée par le même opérateur, aveugle des conditions de l'expérience (génotype des souris, groupe ligature coronaire ou contrôle, délai avant ou après l'intervention).

3. Réalisation d'un infarctus du myocarde par ligature de l'IVA

La procédure suit le protocole chirurgical mis en place par l'équipe de Van Laake (van Laake LW et al., 2007). La chirurgie est réalisée sur des animaux rasés, placés sur une plaque chauffante, anesthésiés par injection intra-péritonéale d'un mélange de kétamine 100mg/kg et de xylazine 10 mg/kg, et intubés. La ventilation artificielle est assurée par un respirateur. L'intervention commence par une hémothoracotomie gauche suivie d'une dissection plan par plan du tissu sous-cutané puis musculaire et d'une ouverture de la cage thoracique au niveau du troisième espace intercostal. Le cœur est exposé, le péricarde incisé et une dissection est réalisée pour identifier l'artère coronaire gauche. Cette artère est ensuite ligaturée de façon permanente (fil 7.0), induisant un IDM (groupe ligature coronaire) ou le fil simplement passé en-dessous de l'artère et laissé en place comme repère (groupe contrôle). Après vérification de l'akinésie de l'apex et de la paroi antéro-latérale (assurant le succès de l'occlusion coronaire), l'intervention se termine par une fermeture plan par plan avec du fil de suture 4.0, l'exsufflation du pneumothorax iatrogène et une désinfection cutanée à la bétadine dermique. Les souris ventilées sont monitorées et laissées sur la plaque chauffante jusqu'à leur réveil. La létalité de la procédure était approximativement de 50%, indépendamment du génotype des souris.

Cette procédure a été réalisée par le Dr A Vukolic, vétérinaire de formation et post-doctorante dans l'équipe.

4. Analyse histochimique

Après sacrifice de l'animal par dislocation cervicale, le cœur est immédiatement prélevé. La portion infarctée du cœur, située sous le nœud de ligature de l'artère coronaire, est séparée en 2 parties. La section supérieure est fixée à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde à 4% puis incluse en paraffine selon le protocole habituel, permettant la réalisation de colorations à partir de coupes tissulaires transversales réalisées à l'aide d'un microtome. La partie inférieure est immédiatement congelée dans de l'azote liquide et conservée à -80°C pour analyses moléculaires ultérieures. Les analyses ont été réalisées en aveugle.

a. Etude structurelle avec coloration à l'Hématoxyline Eosine Safranine (HES)

Les coupes de cœur de 3 µm d'épaisseur ont été soumises au protocole classique de coloration à l'HES. L'observation des lames s'est faite au moyen d'un microscope optique avec un grossissement 100x (Leica DMLB, Germany) équipé d'une caméra (Spot RT Slider, Diagnostic Instruments, Scotland). Les diamètres d'au moins 30 cardiomyocytes ont été mesurés puis moyennés en utilisant le logiciel SPOT Advanced (Universal Imaging Corp.) avec l'aide du Dr N Wagner (IBV).

b. Evaluation de la taille de l'infarctus du myocarde

En microscopie optique, il est possible de différencier myocarde sain, zone infarctée et zone bordante. La coloration au Trichrome de Masson a permis d'identifier la zone nécrosée.

Des sections de cœur de 3 µm d'épaisseur colorées au Trichrome de Masson ont été observées et enregistrées en microscopie optique en champ clair (grossissement 5x, Leica DMLB, équipé d'une caméra). Le logiciel SPOT Advanced a permis de mesurer la taille de la zone nécrosée, évaluant ainsi la taille de l'IDM.

c. Quantification de la fibrose myocardique et du remodelage vasculaire

Une coloration au rouge Sirius facilitée par l'acide picrique (3FBA PicroSirius Red, Waldeck GmbH, Münster, Germany) a été réalisée sur des sections transversales de cœur. Les fibres de collagène marquées par le rouge Sirius apparaissent en rouge sous

microscope optique en lumière polarisée, témoignant du niveau de déstructuration tissulaire et, de ce fait, de la fibrose myocardique.

En premier lieu, la mesure de la fibrose myocardique interstitielle a été réalisée sur une section transversale de cœur de bonne qualité, choisie de façon aléatoire. Plusieurs acquisitions ont été réalisées à l'aide d'un microscope optique Leica DMLB équipé d'une caméra (avec un grossissement 5x), de sorte que la surface totale de la section est enregistrée sans redondance. Le logiciel ImageJ (*Image Processing And Analysis in Java*, Rasband, NIH, USA) a permis de délimiter la région à analyser. Sur une région donnée, le logiciel a ensuite calculé la surface tissulaire colorée au 3FBA PicroSirius Red, qu'il a rapportée à la surface totale de la région analysée, pour fournir un ratio correspondant au pourcentage de fibrose pour l'acquisition étudiée. Cette procédure a été répétée pour toutes les acquisitions d'un même échantillon, nous donnant une valeur moyenne correspondant au pourcentage de fibrose de l'échantillon étudié (Whittaker P et al., 1994).

Les marqueurs de remodelage vasculaire ont été étudiés au niveau de la zone bordante et du myocarde sain : fibrose pariétale vasculaire, fibrose périvasculaire (étendue aux septa fibreux entourant le vaisseau sanguin) et dimensions vasculaires. En suivant le même protocole que précédemment (mais avec un grossissement 40x), un minimum de 5 régions par échantillon a été analysé afin d'évaluer la fibrose vasculaire et la fibrose périvasculaire. Le logiciel ImageJ a permis de mesurer le pourcentage de fibrose moyenné pour tous les vaisseaux sanguins coronaires de l'échantillon étudié. De façon similaire, la fibrose périvasculaire a pu être évaluée, en limitant l'analyse aux septa fibreux périvasculaires. Les dimensions vasculaires et l'épaisseur de la paroi vasculaire ont été obtenues sur des coupes transversales colorées au 3FBA PicroSirius Red. Un microscope optique Leica DMLB, équipé d'une caméra (avec un grossissement 40x) a permis de réaliser au moins 5 acquisitions par échantillon. Le logiciel SPOT Advanced a rendu possible la mesure des dimensions vasculaires : épaisseur de la paroi vasculaire (minimum de 5 mesures par vaisseau), petit et grand diamètres ainsi que surface de la lumière vasculaire (mesurés sur les vaisseaux coronaires coupés transversalement).

5. Analyse immunohistochimique

L'immunomarquage du marqueur endothélial Pecam-1 (ou CD31) permet d'évaluer la densité vasculaire du tissu cardiaque au niveau de la zone nécrosée, de la zone bordante et du myocarde sain, et ainsi d'évaluer la qualité de la néovascularisation post-infarctus. Avec l'aide du Dr N Wagner (IBV) et du Pr JF Michiels (CHU Nice), l'immunomarquage a été réalisé sur les sections de myocarde déparaffinées puis incubées à l'aide d'anticorps anti CD31 selon le protocole décrit précédemment (Wagner N et al., 2009). Les lames ont été observées à l'aide d'un microscope en fluorescence (Leica DMLB, Germany) muni d'une caméra. La densité du marquage immunologique a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ après avoir moyenné sur un minimum de 5 sections par animal.

Les densités du marquage immunologique de Wt1 ou de Hif-1 α ont été évaluées avec le même protocole, adapté à chacun.

6. Etude de la perméabilité membranaire

L'analyse in vivo de l'intégrité membranaire des cellules endothéliales est permise par la coloration des tissus au Bleu d'Evans, auquel les cellules sont physiologiquement imperméables. Le Bleu d'Evans se lie à l'albumine plasmatique et fuit dans les tissus endommagés lorsque la membrane endothéliale est endommagée. Son absorbance est alors mesurable par spectrophotométrie grâce à son autofluorescence en lumière rouge.

Une solution de Bleu d'Evans dilué dans du sérum salé physiologique (NaCl 0,9%) a été injectée dans une veine de la queue de souris anesthésiées. Les animaux ont été perfusés puis sacrifiés 24 heures après l'injection du traceur, et le cœur prélevé. Les échantillons ont été préparés selon le protocole décrit précédemment (Manaenko A et al., 2011).

7. Analyse ultrastructurale en microscopie électronique à transmission

L'observation de tissu myocardique en microscopie électronique à transmission a été réalisée avec l'aide de Mme Sophie PAGNOTTA (Centre Commun de Microscopie Appliquée (CCMA), Faculté des Sciences de l'Université de Nice-Sophia Antipolis). La préparation des échantillons tissulaires s'est faite selon le protocole habituel, et les observations réalisées grâce à un microscope EOL JEM 1400 équipé d'une caméra Morada SIS.

8. Analyse moléculaire

a. Expression de facteurs de prolifération, inflammatoires et pro-angiogéniques

L'extraction de l'ARN provenant des cœurs congelés s'est faite avec du Trizol en suivant le protocole classique (TRIZOL®, Life technologies™). Ensuite, une réaction de transcription inverse utilisant 0,5 µg de l'ARN total obtenu a été réalisée avec des amorces oligo(dT) et la SuperScript® III reverse transcriptase (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific), permettant l'obtention d'ADNc simple brin, suivant le protocole fourni par le fabricant. Enfin, 1 µl du produit de la réaction a été utilisé pour réaliser une réaction d'amplification en chaîne par polymérase en temps réel (RT-PCR), utilisant le kit SYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™) avec les amorces spécifiques des gènes étudiés (ABI Prism 7000, Applied Biosystems). Les ADNc générés par transcription inverse sont utilisés pour mesurer par RT-PCR quantitative (RT-qPCR) le niveau d'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la migration cellulaire, l'inflammation et l'angiogenèse. Les gènes de maison Gapdh et 36B4 servent à la normalisation. Les résultats obtenus par RT-qPCR seront comparés à ceux obtenus par un screening préliminaire réalisé à l'aide du kit RT² Profiler PCR Array 330231 (Qiagen®), qui teste l'expression de nombreux gènes intervenant dans l'angiogenèse.

b. Expériences de clonage et de transfection pour *Wt1*

Des gènes cibles potentiels de *Wt1* ont été identifiés parmi un panel de facteurs angiogéniques et de facteurs de croissance grâce à la réalisation de RT-qPCR à partir de tissu cardiaque prélevé à la phase aiguë de l'infarctus. La présence de sites de liaison pour *WT1* dans les régions promotrices de ces gènes candidats, sites susceptibles d'être des éléments de réponse, a été prédite *in silico* à l'aide du logiciel informatique TRANSFAC (TRANSCRIPTION FACTOR database, BIOBASE GmbH) et de la base de données génomiques Ensembl (European Bioinformatics Institute et Wellcome Trust Sanger Institute ; Hubbard T et al., 2002).

Les expériences de clonage ont permis l'insertion de ces séquences promotrices dans des constructions plasmidiques (pGL3basic possédant un gène de résistance à l'ampicilline) en amont d'un gène rapporteur (luciférase).

Schématiquement, le clonage permet l'insertion d'une séquence d'ADN étranger appelée insert (ici la séquence contenant le potentiel élément de réponse à *WT1*), dans une molécule capable de se répliquer de façon autonome, le vecteur de clonage (ici, le plasmide pGL3basic). Le protocole de clonage utilisé est décrit par le fabricant (Invitrogen™ by Life technologies™). Rapidement, la séquence ADN d'intérêt est amplifiée, soumise à une digestion par les enzymes de restriction puis purifiée. De la même façon, le vecteur plasmidique est soumis à une digestion enzymatique puis purifié. Le clonage, ligation de l'insert dans le vecteur plasmidique, est permis grâce à une ADN ligase. La transformation dans les bactéries thermocompétentes et leur mise en culture dans un milieu LB Agar sélectif riche en ampicilline permet la sélection des bactéries possédant le plasmide recombinant et l'amplification de la séquence ADN d'intérêt. L'ADN plasmidique est ensuite isolé.

9. Critères de non-inclusion et d'exclusion

Les souris gestantes n'ont pas été incluses dans ce travail.

Les animaux n'ayant pas bénéficié des 2 échocardiographies et de la chirurgie, ainsi que les animaux pour lesquels l'IDM était minime ou absent à l'observation des lames après coloration HES (ligature coronaire imparfaite ou trop bas située) ont été exclus a posteriori de l'analyse statistique.

10. Analyse statistique

Nous avons utilisé le logiciel Graphpad InStat pour effectuer l'analyse statistique.

Les données quantitatives sont exprimées sous la forme de moyenne \pm écart-type de la moyenne, les données catégorielles en pourcentage du total.

Le test du Chi-deux (ou le test exact de Fisher pour les petits échantillons) a été utilisé afin de comparer les variables qualitatives. Le test de Mann-Whitney ou un test de Bonferroni après analyse de la variance a été utilisé dans la comparaison de nos variables quantitatives. Les différences observées sont considérées significatives pour des valeurs de $p < 0.05$.

RESULTATS ET DISCUSSION

PARTIE I : *PPAR β/δ*

Research Article

Inducible Conditional Vascular-Specific Overexpression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Beta/Delta Leads to Rapid Cardiac Hypertrophy

Kay-Dietrich Wagner,¹ Ana Vukolic,² Delphine Baudouy,¹
Jean-François Michiels,³ and Nicole Wagner¹

¹Institute of Biology Valrose (iBV), University of Nice Sophia Antipolis, CNRS UMR7277/INSERM U1091,
Faculty of Medicine, 06107 Nice, France

²Institute for Molecular Health Sciences, ETH Zurich, 8093 Zurich, Switzerland

³Department of Pathology, CHU Nice, 06002 Nice, France

Correspondence should be addressed to Nicole Wagner; nwagner@unice.fr

Received 19 December 2015; Accepted 10 February 2016

Academic Editor: Ekaterina A. Ivanova

Copyright © 2016 Kay-Dietrich Wagner et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors which function as ligand-activated transcription factors. Among them, peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPAR β/δ) is highly expressed in the heart and thought to have cardioprotective functions due to its beneficial effects in metabolic syndrome. As we already showed that PPAR β/δ activation resulted in an enhanced cardiac angiogenesis and growth without impairment of heart function, we were interested to determine the effects of a specific activation of PPAR β/δ in the vasculature on cardiac performance under normal and in chronic ischemic heart disease conditions. We analyzed the effects of a specific PPAR β/δ overexpression in endothelial cells on the heart using an inducible conditional vascular-specific mouse model. We demonstrate that vessel-specific overexpression of PPAR β/δ induces rapid cardiac angiogenesis and growth with an increase in cardiomyocyte size. Upon myocardial infarction, vascular overexpression of PPAR β/δ , despite the enhanced cardiac vessel formation, does not protect against chronic ischemic injury. Our results suggest that the proper balance of PPAR β/δ activation in the different cardiac cell types is required to obtain beneficial effects on the outcome in chronic ischemic heart disease.

1. Introduction

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are ligand-activated transcription factors that belong to the nuclear receptor superfamily. There are three members of the PPAR family (α , β/δ , and γ) with distinct, but overlapping spatial, temporal, and regulated expression patterns. For all PPARs, lipids are endogenous ligands and PPARs are considered as important transcriptional regulators of genes involved in lipid metabolism and cardiac energy production [1].

PPAR β/δ is the predominant subtype in the heart, and several lines of evidence suggest a cardioprotective function of PPAR β/δ . Cardiac PPAR β/δ deletion in mice

resulted in cardiac dysfunction, hypertrophy, and congestive heart failure [2]. Furthermore, it has been shown that the PPAR β/δ agonist L-165041 inhibits pharmacologically induced hypertrophy of cardiomyocytes through the interaction of PPAR β/δ to NF- κ B and a subsequent downregulation of NF- κ B target genes [3, 4]. An *in vivo* study demonstrated that cardiac specific overexpression of PPAR β/δ led to increased myocardial glucose utilisation and did not alter cardiac function but tended to exert a protective effect to ischemia/reperfusion-induced myocardial injury. This was attributed to an activation of the Glut-4 promoter by PPAR β/δ and the subsequently increased cardiac glucose utilisation [5]. Finally, we recently showed that pharmacological activation of PPAR β/δ with GW0742

or GW501516 in mice led to rapid cardiomyocyte growth with a preserved myocardial function. We demonstrated that PPAR β/δ directly activates the Calcineurin gene [6], which is known to induce cardiac growth [7, 8]. Most interestingly, we observed in our study a rapid induction of cardiac angiogenesis upon pharmacological PPAR β/δ activation, a matter which surprisingly had not been investigated before, although the correlation between cardiac growth and angiogenesis seems quite evident. PPAR β/δ expression in endothelial cells has already been reported in 1999 by Bishop-Bailey and Hla [9]. Pharmacological activation of endothelial and endothelial progenitor cells with PPAR β/δ agonists had been shown to increase the migration, proliferation, and tube formation of these cells [10, 11].

Furthermore, PPAR β/δ knockout mice exhibited a diminished blood flow and immature microvascular structures in subcutaneously induced tumors, which could be rescued by reexpression of PPAR β/δ [12]. In human pancreatic tumors, PPAR β/δ expression strongly correlated with the advanced tumor stage and increased risk of tumor recurrence and distant metastasis. PPAR β/δ has therefore been suggested to be involved in the regulation of the angiogenic switch in tumor progression [13].

PPAR β/δ is also involved in physiological angiogenesis. As we and others showed, treatment with the PPAR β/δ agonists GW0742 and GW501516 induced an exercise-like phenotype in the heart. Both agonists induced a surprisingly rapid (after 24 h) remodelling of mouse hearts [6] and skeletal muscle [14] by increasing microvessel densities.

However, until now it was not clear if either the increase of the cardiac vasculature drives the myocardial hypertrophy or the enhanced cardiac angiogenesis might be a potential indirect effect of cardiomyocyte-specific PPAR β/δ overexpression.

In our present work, we address this question through the generation of transgenic mice with an inducible conditional vascular-specific overexpression of PPAR β/δ and analyze the normal cardiac phenotype and function as well as function and histology after experimental myocardial infarction.

We show that inducible vessel-specific overexpression of PPAR β/δ results in a rapid induction of angiogenesis, cardiac hypertrophy, and impairment of cardiac function as reflected by enhanced end-diastolic and end-systolic volumes, reduced fractional shortening, and decreased ejection fractions. Additionally, we demonstrate that, after myocardial infarction, despite the higher collateral vessel formation, the animals with vascular-specific PPAR β/δ overexpression display bigger infarct lesions, higher cardiac fibrosis, and further reduced cardiac function. This points to a more careful view about the potential benefits of PPAR β/δ agonists in the treatment of cardiovascular diseases, as the proper balance between cardiomyocytic and vascular PPAR β/δ seems to be crucial for cardiac health, especially under ischemic conditions.

2. Materials and Methods

2.1. Animals. All animals were used in accord with local Home Office regulations. PPAR β/δ -*flox*^{+/-} [15] and

Tie2-CreERT2 [16] animals were crossed to generate *Tie2-CreERT2;PPAR β/δ -flox*^{+/-} mice, further referred to as *Tie2-CreERT2;PPAR β/δ* . The *Tie2-Cre*-line was backcrossed four times onto C57BL6. Age- and sex-matched *Tie2-CreERT2;PPAR β/δ* animals were injected for one week intraperitoneally either with sunflower oil (vehicle) or Tamoxifen dissolved in sunflower oil in a dose of 33 mg/kg per day [17]. *Tie2-CreERT2* animals injected with Tamoxifen served as an additional control. Anaesthetized mice were examined by echocardiography using the iE33 xMATRIX system with a 12 MHz transducer (Philips Healthcare, DA Best, Netherlands). Myocardial infarctions were induced by ligation of the left coronary artery (LAD) as described [18]. Briefly, anaesthetized mice were endotracheally intubated, the skin was incised on the left thorax side, the pectoralis muscles were mobilized, a thoracotomy between the third and fourth rib was performed, and the LAD permanently was closed with a 7-0 suture distal to the left auricle. This resulted in large myocardial infarctions. The thoracotomy and the skin wound were closed with 4-0 sutures and the mice remained intubated until spontaneous respiration was reestablished. Lethality of the procedure was approximately 50% independent of the genotype of the mice.

2.2. Genotyping. The genotype of animals was identified by PCR. PCR conditions and primer sequences are available on request.

2.3. Tissue Samples, Histology, and Immunohistology. Histology and measurement of cardiomyocyte diameters were performed according to established protocols [19]. Samples from at least five different animals per group (*Tie2-CreERT2;PPAR β/δ* + vehicle, *Tie2-CreERT2* + Tamoxifen, and *Tie2-CreERT2;PPAR β/δ* + Tamoxifen) were analyzed. Investigators were blinded for the genotype of the mice. Three μ m paraffin sections were used for histological and immunohistological procedures.

Haematoxylin-Eosin staining was routinely performed on all tissue samples; additionally, sections were stained with Trichrome Masson and Picrosirius red. For PPAR β/δ and Pecam-1 immunohistology, after heat-mediated antigen retrieval and quenching of endogenous peroxidase activity, the antigen was detected after antibody application Pecam-1 (CD31) (1:100, rabbit polyclonal, ab28364, Abcam) or PPAR β/δ (1:100, rabbit polyclonal, ab154395, Abcam) using EnVision™ Peroxidase/DAB Detection System from Dako (Trappes, France). Sections were counterstained with Hematoxylin (Sigma). Omission of the first antibody served as a negative control. Additionally, some slides were incubated with IgG Isotype Controls (1:100, rabbit monoclonal, clone SP137, Abcam). Slides were viewed under an epifluorescence microscope (DMLB, Leica, Germany) connected to a digital camera (Spot RT Slider, Diagnostic Instruments, Scotland).

Area densities for all immunohistological stainings were determined using the ImageJ software. Vessel area density was analyzed on at least five different sections of hearts per mouse.

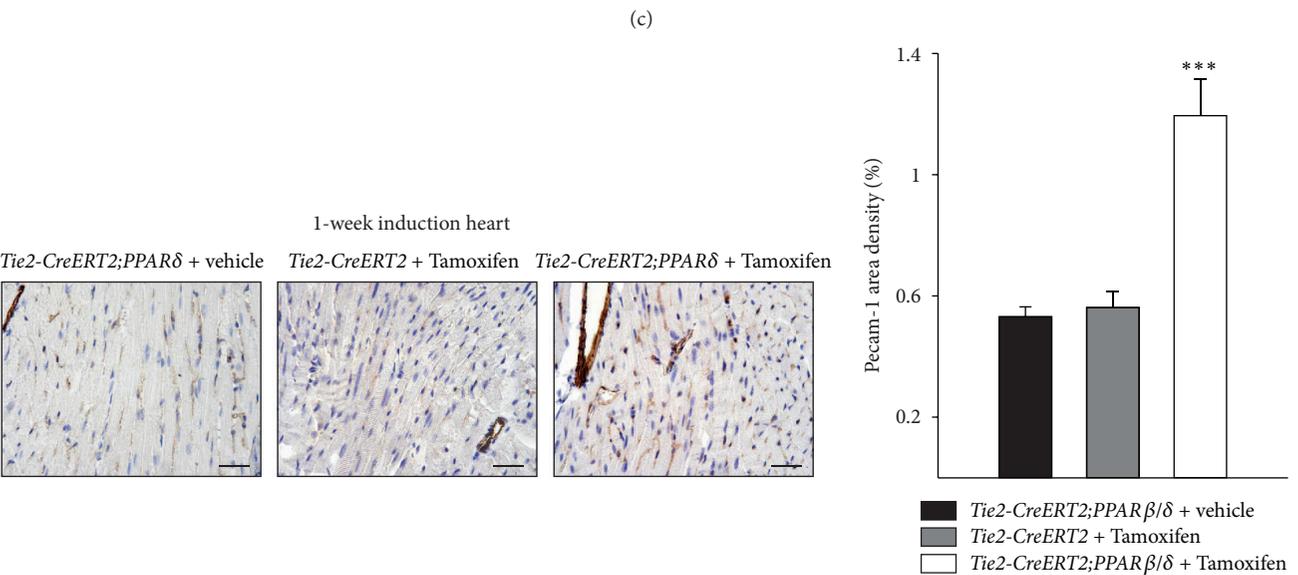
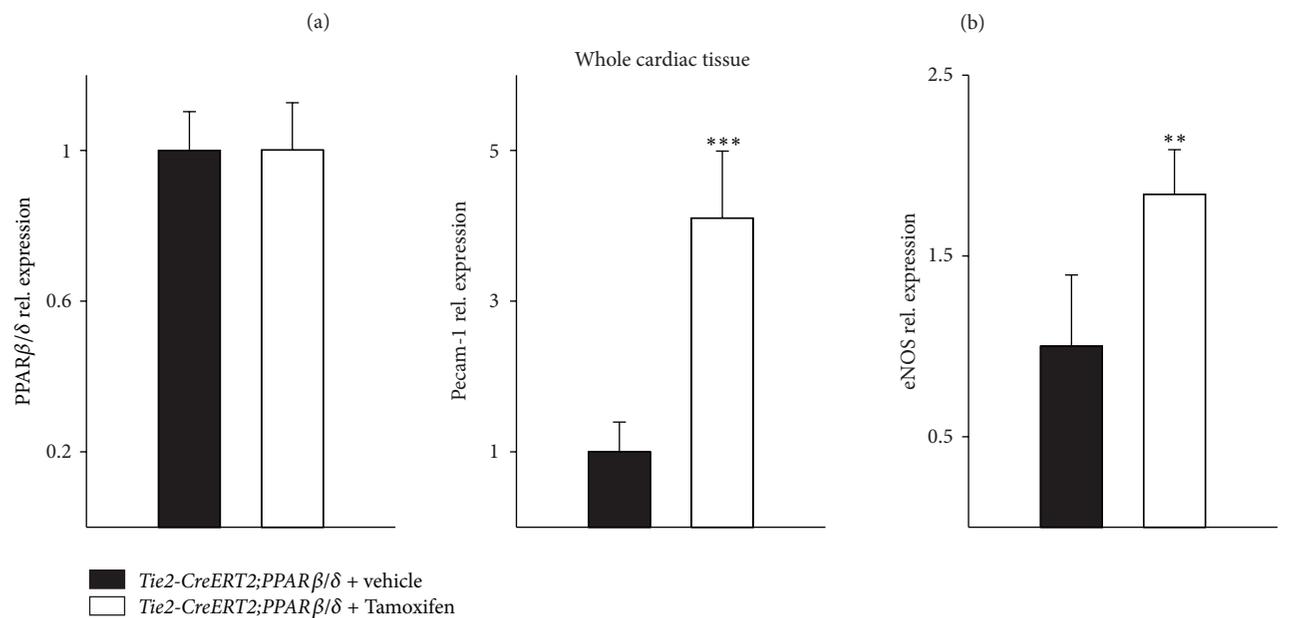
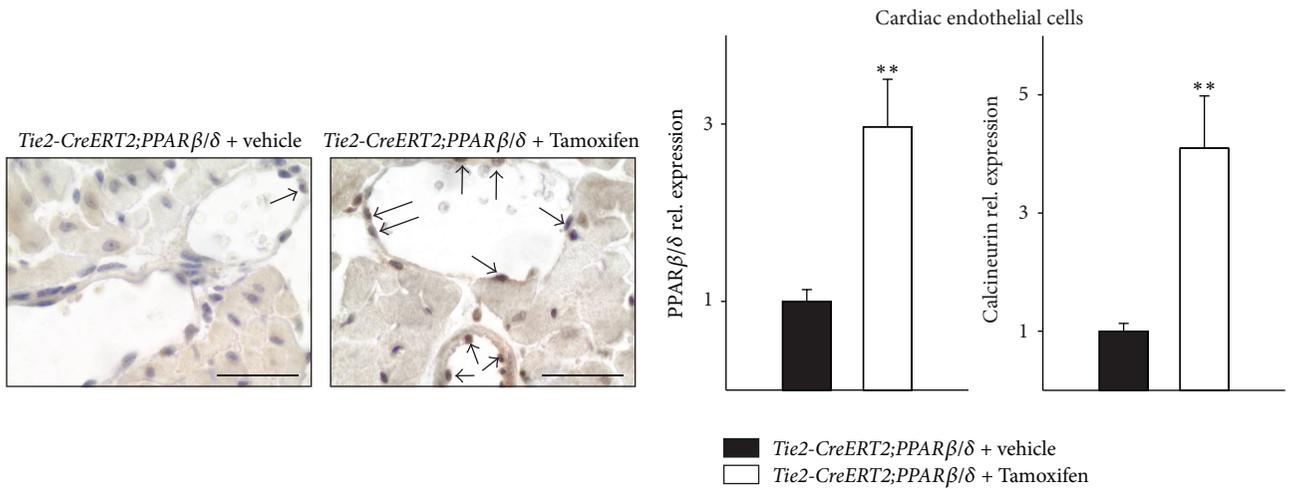


FIGURE 1: Continued.

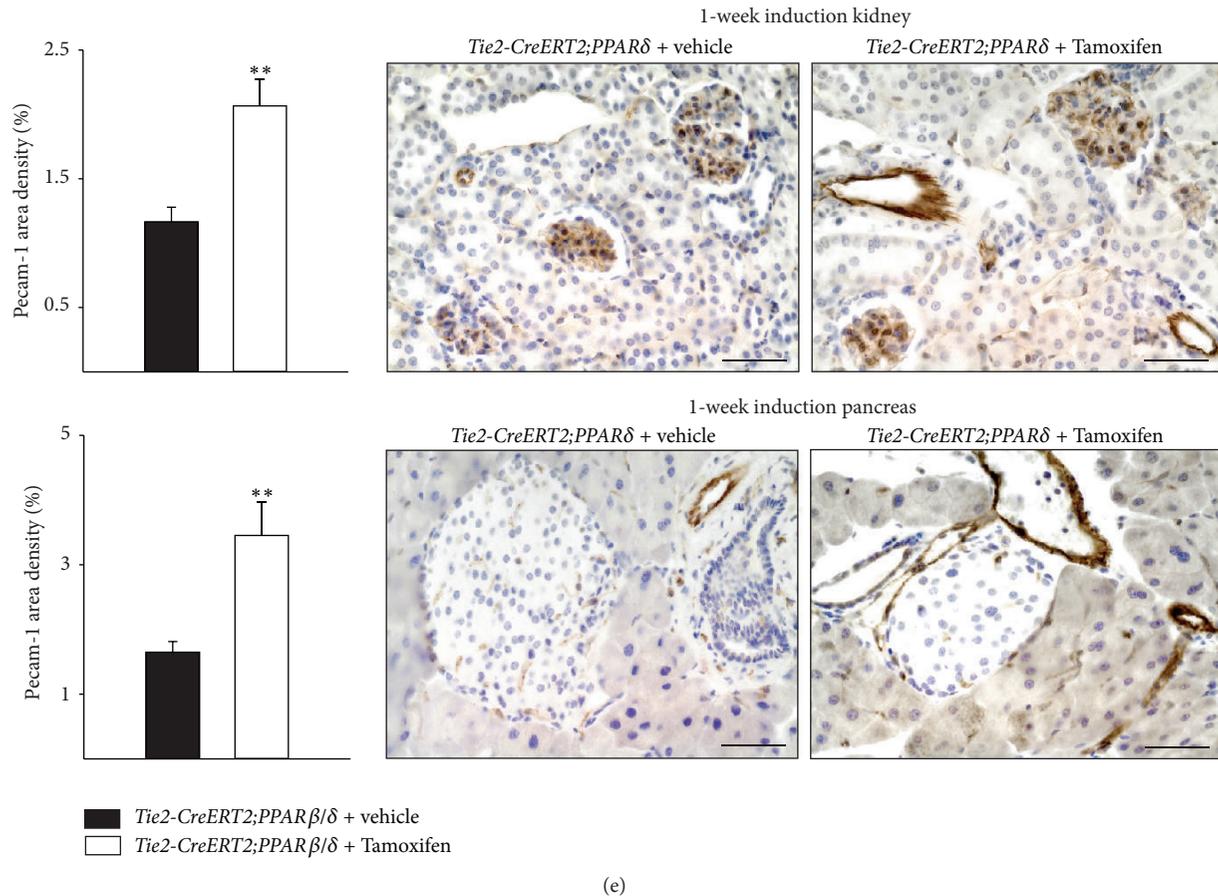


FIGURE 1: Increased cardiac vessel density upon Tie2-Cre-mediated conditional PPAR β/δ overexpression. (a) PPAR β/δ immunostaining from heart sections of Tie2-CreERT2; PPAR β/δ + vehicle and Tie2-CreERT2;PPAR β/δ + Tamoxifen animals indicates higher expression levels in the endothelium of Tie2-CreERT2;PPAR β/δ + Tamoxifen animals. Arrows mark PPAR β/δ positive endothelial cells. (b) Quantitative real-time PCRs for PPAR β/δ and Calcineurin in cardiac endothelial cells from Tie2-CreERT2;PPAR β/δ + vehicle and Tie2-CreERT2;PPAR β/δ + Tamoxifen animals ($n = 5$ for each group). (c) Expression levels for PPAR β/δ , Pecam-1, and eNOS determined by quantitative real-time PCRs from whole mouse heart RNA preparations for both groups ($n = 5$ for each group). (d) Pecam-1-immunostaining in mouse heart sections and quantification of Pecam-1 signal area density (Tie2-CreERT2;PPAR β/δ + Tamoxifen, $n = 5$, Tie2-CreERT2;PPAR β/δ + vehicle, $n = 5$, and Tie2-CreERT2 + Tamoxifen, $n = 5$). (e) Quantification of Pecam-1 signal area densities and Pecam-1-immunostainings in mouse kidney (upper panel) and pancreas (lower panel) sections (Tie2-CreERT2;PPAR β/δ + Tamoxifen, $n = 3$, and Tie2-CreERT2;PPAR β/δ + vehicle, $n = 3$). Scale bars indicate 50 μm . Data are means \pm SEM. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

2.4. Real-Time RT-PCR. Total RNA was isolated from hearts and cardiac endothelial cells, sorted with CD31 MicroBeads (Miltenyi Biotec) from the mouse hearts using the Trizol reagent (Invitrogen). The RNA pellet was dissolved in diethyl pyrocarbonate-treated H₂O. First-strand cDNA synthesis was performed with 0.5 μg of total RNA using oligo(dT) primers and Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). One μL of the reaction product was taken for real-time RT-PCR amplification (ABI Prism 7000, Applied Biosystems) using a commercial SYBR[®] Green kit (Eurogentec, Angers, France). Primer sequences are available on request. Expression of each gene was normalized to the respective *Gapdh*, *Actb*, and *Rplp0* expression.

2.5. Statistical Analysis. Data are expressed as means \pm SEM. ANOVA with Bonferroni test as *post hoc* test or

Mann-Whitney tests was performed as indicated. A p value of less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results and Discussion

3.1. PPAR β/δ Vascular-Specific Overexpression Rapidly Increases Cardiac Vessel Density. Immunohistochemistry for PPAR β/δ of heart sections proved the upregulation of PPAR β/δ protein expression in the endothelium of Tie2-CreERT2;PPAR β/δ mice induced with Tamoxifen as compared to vehicle-treated Tie2-CreERT2;PPAR β/δ animals (Figure 1(a)). Quantitative RT-PCRs from cardiac endothelial cells enriched with Pecam-1/CD31 MicroBeads were performed to confirm the vascular overexpression of PPAR β/δ upon Cre-mediated recombination. Endothelial cells isolated from hearts of Tamoxifen induced Tie2-CreERT2;PPAR δ animals

showed a modest upregulation of PPAR β/δ and Calcineurin expression compared to cardiac vascular cells of vehicle-treated animals (Figure 1(b)). In contrast, no significant changes in PPAR β/δ expression levels in whole heart RNA preparations could be detected (Figure 1(c)), additionally confirming specificity of vascular PPAR β/δ overexpression, as endothelial cells contribute only to around seven percent of the total cell numbers in the mouse heart [20]. An increase in cardiac vessel density became evident on the RNA (Figure 1(c)) as well as on the protein level (Figure 1(d)) already one week after Cre-mediated vascular PPAR β/δ overexpression. Additionally, increased cardiac eNOS expression confirmed the enhanced cardiac angiogenesis (Figure 1(c)). The detection of Pecam-1 protein expression by immunohistochemistry allowed determining that this upregulation of Pecam-1 was due to the formation of new microvessels (for comparison, see Figure 1(d) right photomicrograph, which depicts higher microvessel formation in the hearts of *Tie2-CreERT2;PPAR β/δ* animals induced with Tamoxifen as compared to vehicle-treated *Tie2-CreERT2;PPAR β/δ* animals on the left or Tamoxifen treated *Tie2-CreERT2* animals in the middle). Determination of Pecam-1 area density indicated a doubling of Pecam-1 positive vascular structures (Figure 1(d)). This angiogenic response to transgenic overexpression of PPAR β/δ in the endothelium was also observed in the kidney and the pancreas (Figure 1(e)), indicating a general proangiogenic action of PPAR β/δ in endothelial cells. These findings are in line with previous studies, which reported a rapid enhancement of vessel density upon pharmacological PPAR β/δ activation [6, 14] and the general view of PPAR β/δ as a proangiogenic factor [21].

3.2. Specific Vascular Overexpression of PPAR β/δ Induces Cardiac Hypertrophy. Already one week after induction of PPAR β/δ expression in vessels, it became evident that cardiac growth was enhanced in the animals with Cre-mediated recombination as compared to both controls, vehicle-treated *Tie2-CreERT2;PPAR β/δ* and *Tie2-CreERT2* mice treated with Tamoxifen. Heart/body weight measurements confirmed the macroscopic observation. This growth induction became more enhanced after three weeks and remained then stable for up to two months, the latest time point studied (Figure 2). The cause of this cardiac growth was an increase in cardiomyocyte size, as determined by cardiomyocyte diameter measurements at the different time points. On average, the cardiomyocyte diameter increased about 30% compared to the respective controls (Figure 3). Vascular formation during embryonic development is crucial for organ growth; for example, the inhibition of coronary vessel formation abolishes cardiac growth [22]; however, the factors determining organ size in an adult organism are not completely understood, but some lines of evidence suggest that, during tissue repair or in response to physiological stimuli vessel formation is required for organ enlargement [23]. Some evidence that at least for the heart vascular growth indeed led to an increase in the cardiac mass under normal conditions came from a study using transgenic mice with a cardiomyocyte-specific on/off regulatable system for

the secretion of the proangiogenic factor PR39. The authors concluded that myocardial hypertrophy observed after three weeks was due to the induction of angiogenesis. They suggested that increased NO production due to increased endothelial cell mass mediated the observed hypertrophy [24]. This is in accordance with our finding of enhanced eNOS expression in the hearts of mice with vascular-specific overexpression of PPAR β/δ (Figure 1(b)). However, PR39 is a macrophage derived peptide, which inhibits degradation of hypoxia inducible factor 1 α protein, thus activating angiogenesis through the induction of VEGF and fibroblast growth factor signalling and acting on all cardiac and other cell types. It can therefore not be excluded that part of the observed effects in this study was due to actions of PR39 on other cell types of the heart compared to only endothelial cells. The fact that we could observe cardiac hypertrophy already one week after vascular-specific overexpression of PPAR β/δ is mostly due to the overexpression of PPAR β/δ in endothelial cells, which induced angiogenesis leading to hypertrophy of the cardiomyocytes. Our approach was more direct as targeting the secretion of a proangiogenic factor like PR39 by cardiomyocytes, which affects secondarily the endothelium and in the end the increase in cardiomyocyte size is solely attributed to the increased angiogenesis. However, in the mentioned study, it cannot be excluded that the forced secretion of a proangiogenic molecule by cardiomyocytes also acts on other cell types compared to only endothelial cells, including cardiomyocytes themselves. The endothelial-specific conditional induction of PPAR β/δ in our model excludes a potential interference with possibly in parallel ongoing actions in other cardiac cell types.

3.3. PPAR β/δ Vascular-Specific Overexpression Also Increases Capillary Density in the Setting of Myocardial Infarction but Fails to Ameliorate the Outcome after Chronic Ischemic Heart Disease. To investigate the effect of PPAR β/δ driven angiogenesis on myocardial function in pathological settings, the left anterior descending (LAD) coronary artery in *Tie2-CreERT2;PPAR β/δ* animals induced with Tamoxifen or treated with vehicle was ligated. Immunohistochemical investigation of Pecam-1 expression demonstrated a significant increase in capillary density not only in the infarct zone but also in the border zone of the infarcted area and in the remote myocardial area of the right ventricle of *Tie2-CreERT2;PPAR β/δ* animals induced with Tamoxifen compared to those treated with vehicle only. This was additionally confirmed by quantification of Pecam-1 area densities (Figure 4). Heart/body weight determination demonstrated a hypertrophic effect of vascular-specific overexpression of PPAR β/δ also in the setting of chronic ischemic heart disease, due to an increase in cardiomyocyte size (Figure 5(a)). Interestingly, histological analyses revealed much bigger infarct sizes in animals with vascular-specific overexpression of PPAR β/δ as compared to controls (Figure 5(b)) and an enhanced cardiac fibrosis, as determined by Picrosirius red staining for collagen (Figure 5(c)). This is in contrast to the study using a cardiomyocyte-specific on/off regulatable system for

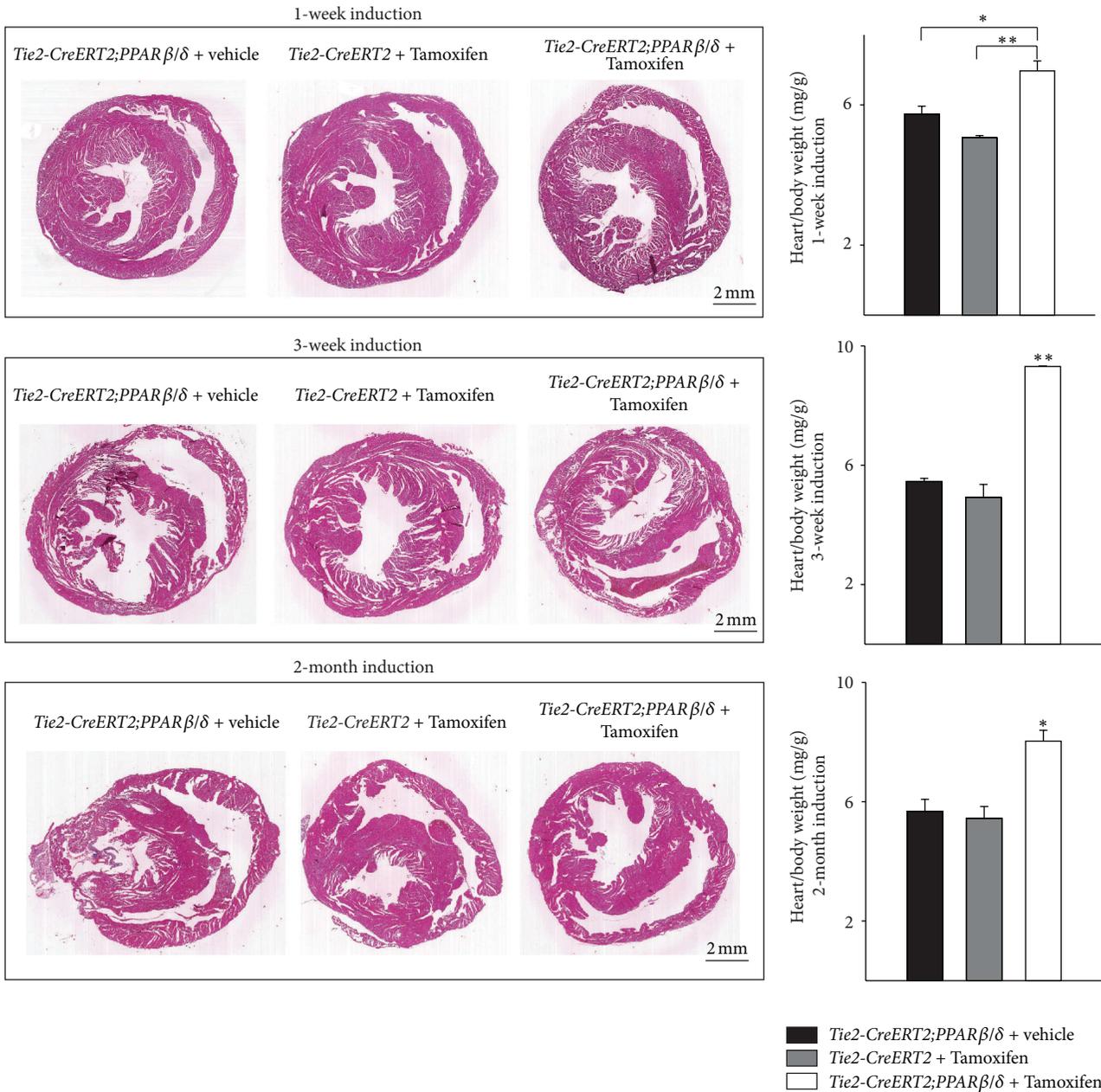


FIGURE 2: Rapid induction of cardiac growth by Tie2-Cre-mediated conditional PPAR β/δ overexpression. Photomicrographs of Hematoxylin-Eosin- (HE-) stained cross sections of the hearts and respective heart-to-body weight ratios (*Tie2-CreERT2;PPARβ/δ* + Tamoxifen, $n = 7$, *Tie2-CreERT2;PPARβ/δ* + vehicle, $n = 6$, and *Tie2-CreERT2* + Tamoxifen, $n = 6$). Scale bars indicate 2 mm. Data are means \pm SEM. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

the secretion of the proangiogenic factor PR39 from cardiomyocytes; the secretion of PR39 reduced infarct sizes after myocardial infarction [24]. However, as stated before, this study was based on the effects of PR39, a macrophage derived proangiogenic molecule, which might act on all cardiac cell types rather than solely on endothelial cells. Our results are in agreement with clinical studies suggesting cardiac hypertrophy as a risk factor for arteriosclerosis, myocardial

infarction, and heart failure [25]. This is probably due to the increased energy consumption of hypertrophic myocardium.

To test whether the angiogenesis induced cardiac hypertrophy affects cardiac function, we performed premyocardial and three-week postmyocardial infarction echocardiographic examinations in *Tie2-CreERT2;PPARβ/δ* animals induced with Tamoxifen and the respective controls treated with vehicle. Consistent with the observed cardiac

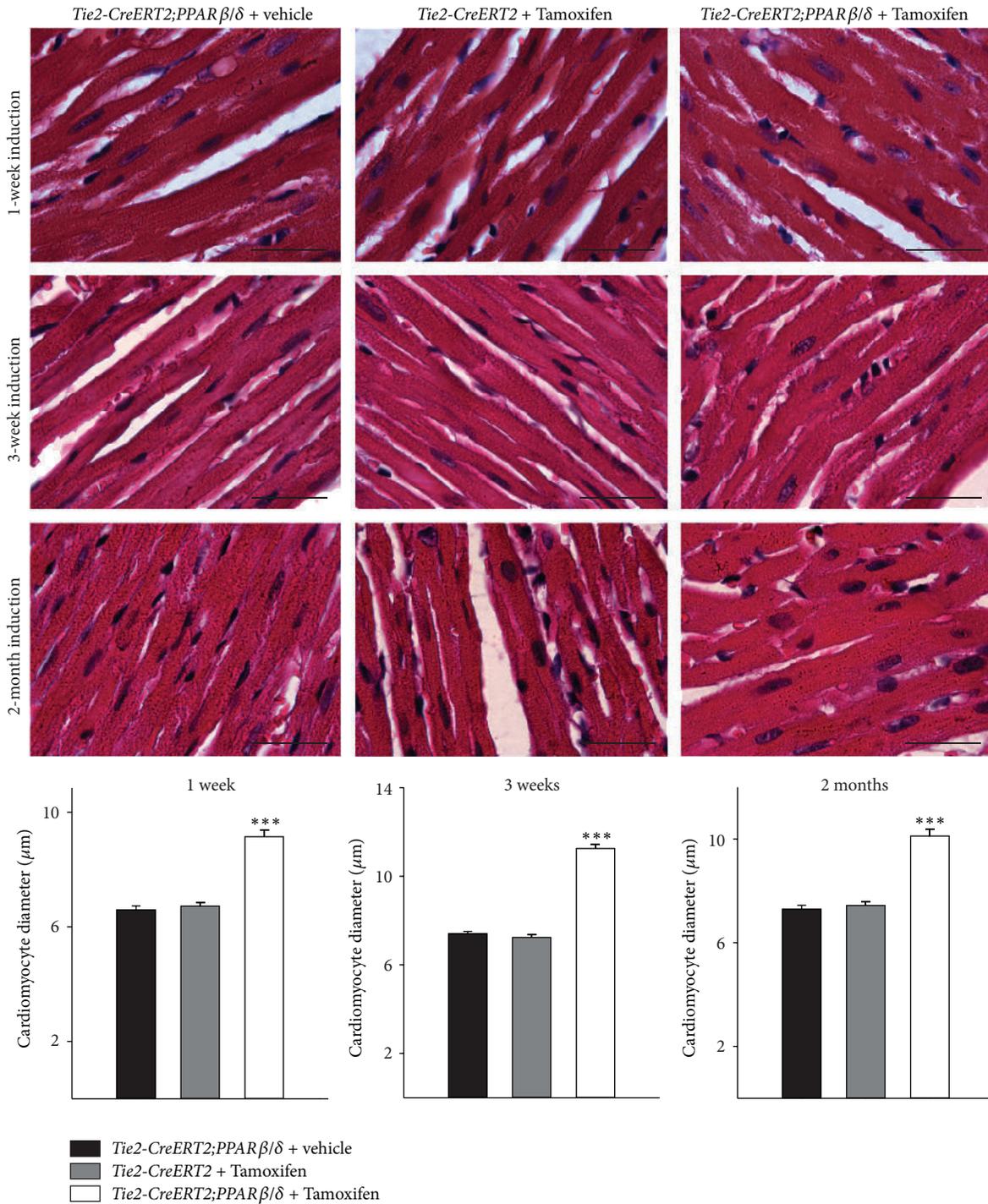


FIGURE 3: Enhanced cardiomyocyte diameter upon vascular-specific PPARβ/δ overexpression. High power photomicrographs of HE-stained sections showing individual cardiomyocytes and quantification of cardiomyocyte diameters. Scale bars indicate 50 μm. Data are means ± SEM. *** $p < 0.001$.

hypertrophy, mice with vascular-specific overexpression of PPARβ/δ showed an increase in left ventricular end-diastolic (LVED) and -systolic (LVES) volume. Fractional shortening and the ejection fraction were slightly reduced as compared to the respective controls (Figure 6(a)).

Three weeks after myocardial infarction, control *Tie2-CreERT2;PPARβ/δ* animals treated with vehicle also showed an increase in the left ventricular end-diastolic and -systolic volume as well as a reduction in the fractional shortening and ejection fraction when compared to their healthy status

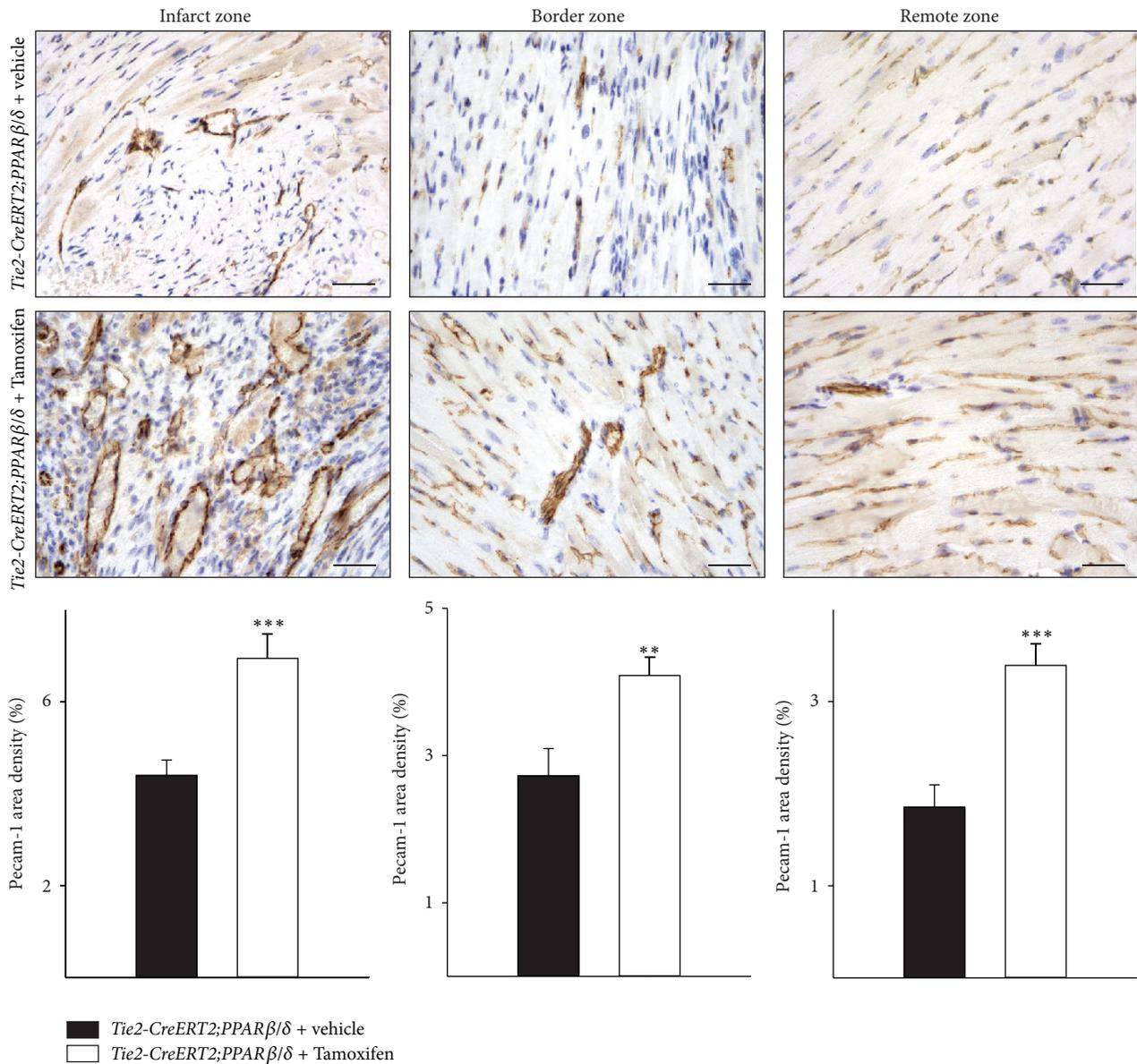


FIGURE 4: Increased vessel formation after myocardial infarction in the hearts of mice with vascular-specific PPAR β/δ overexpression. Pecam-1-immunostaining in mouse heart sections and quantification of Pecam-1 signal area density (Tie2-CreERT2;PPAR β/δ + Tamoxifen, $n = 5$, and Tie2-CreERT2;PPAR β/δ + vehicle, $n = 5$). Scale bars indicate 50 μm . Data are means \pm SEM. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

before chronic ischemic heart disease. However, the situation was far worse in the mice with vascular-specific overexpression of PPAR β/δ ; both LVED and LVES volume were highly increased and the fractional shortening and ejection fraction severely diminished (Figure 6(b)). Most studies attributed to PPAR β/δ a cardioprotective role, as *in vitro* and *in vivo* data suggested that PPAR β/δ inhibits cardiomyocyte apoptosis [26], protects against lipotoxicity [2], reduces cardiomyocyte hypertrophy [27], and, if overexpressed in cardiomyocytes, reduces myocardial injury due to ischemia/reperfusion [5]. Animals treated with PPAR β/δ agonists showed a rapid increase of the cardiac vasculature and an enhanced cardiac

growth without functional impairment [6]. It seems as if the proper balance between PPAR β/δ activation in endothelial cells and cardiomyocytes (and maybe other cardiac cell types as fibroblasts) is required to confine the attribute “cardioprotective” to PPAR β/δ . Our results indicate that the specific, unbalanced activation of PPAR β/δ only in the vasculature, despite its effects on vessel and cardiac growth, is not sufficient to protect against chronic ischemic heart disease. Nevertheless, it is possible that activation of PPAR β/δ in the vasculature might have beneficial effects in the settings of smaller infarct sizes or in slowly developing arteriosclerosis, which will be subject of future studies.

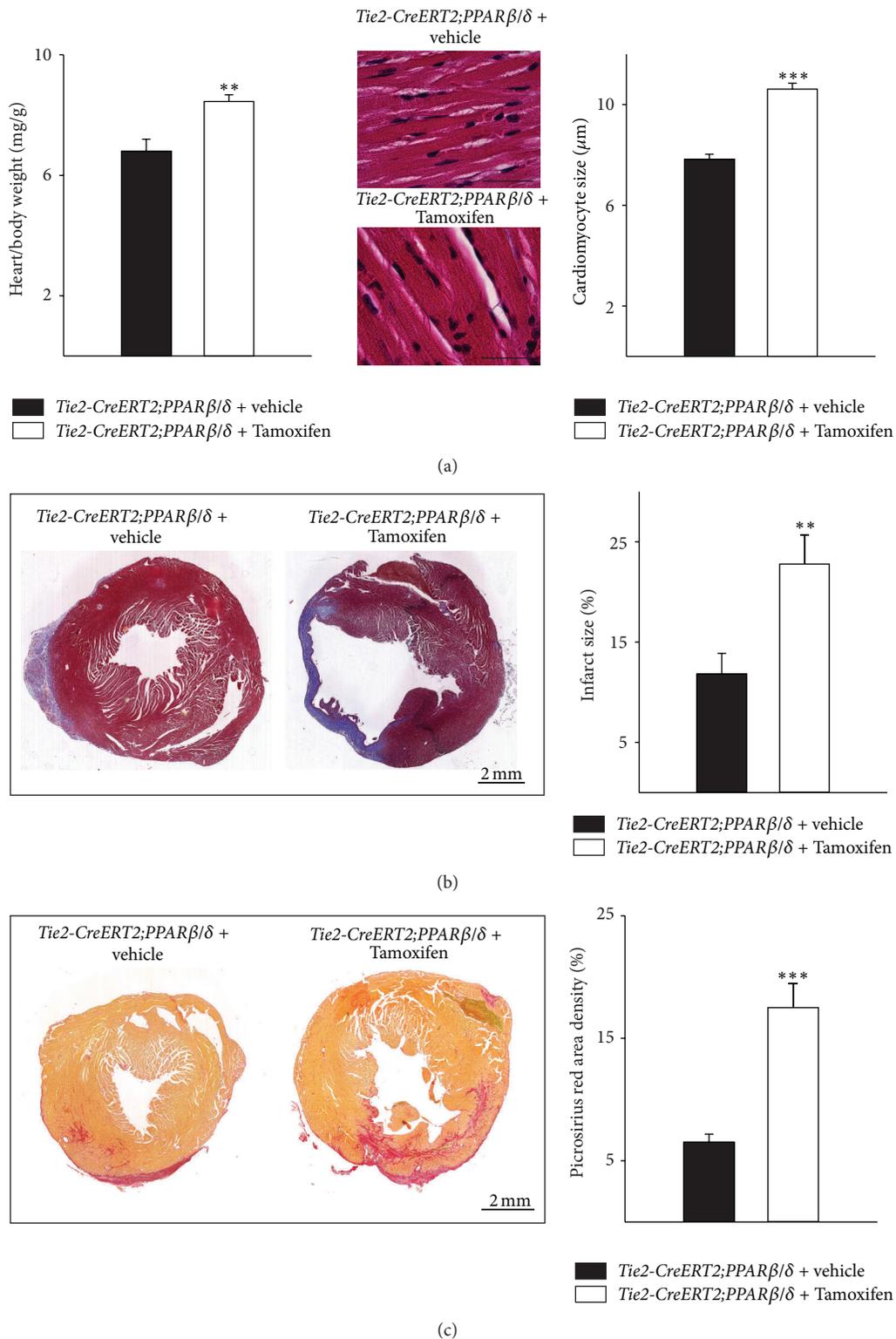
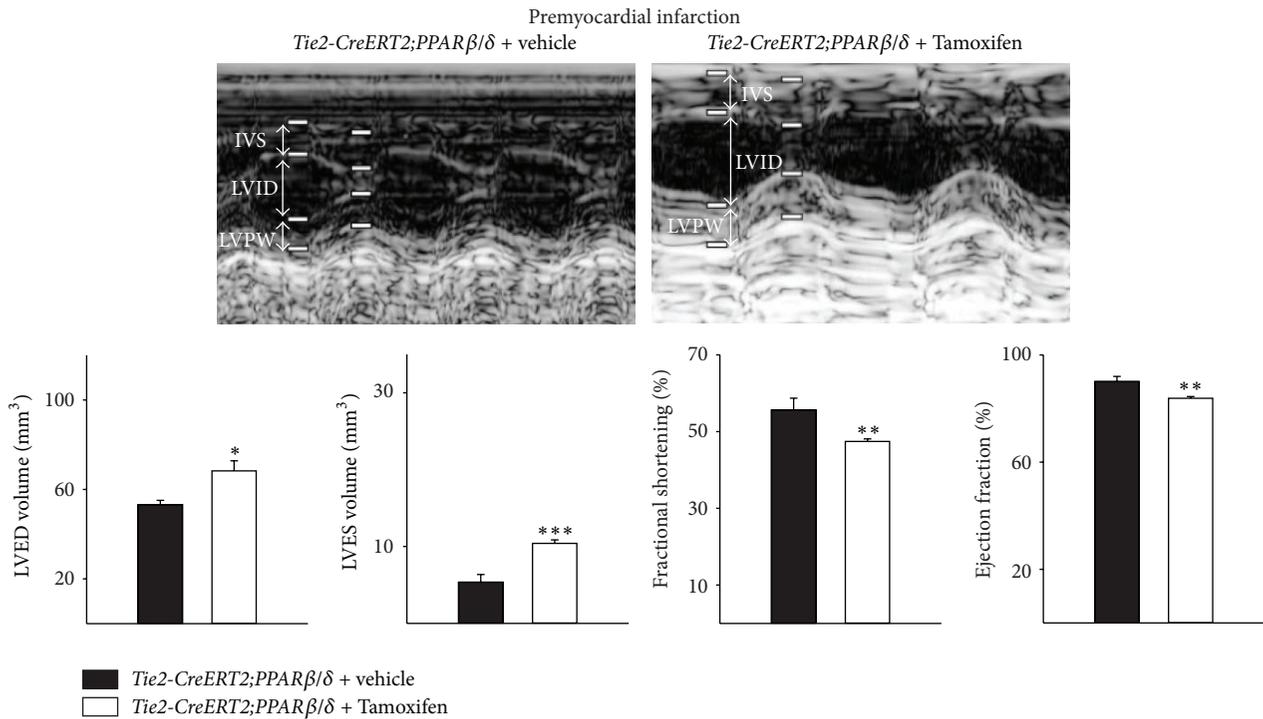
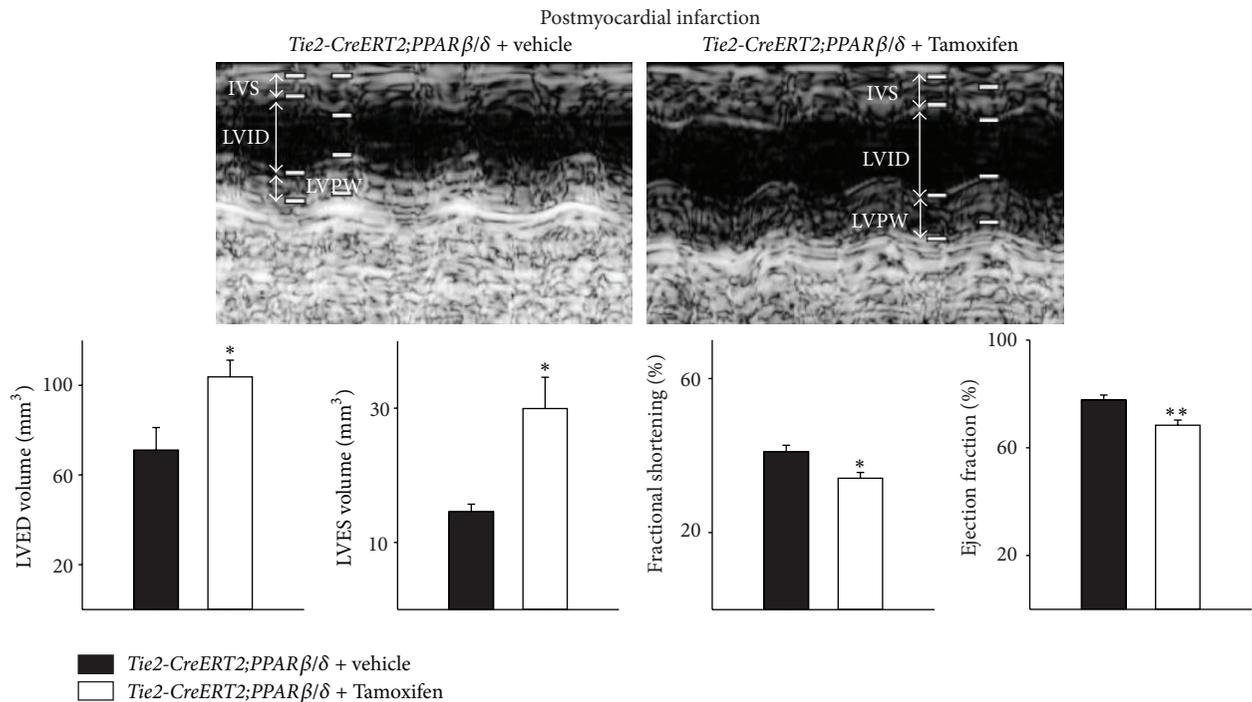


FIGURE 5: Increased infarct sizes and higher cardiac fibrosis in animals with vascular-specific PPAR β/δ overexpression. (a) Respective heart-to-body weight ratios and high power photomicrographs of HE-stained heart sections showing individual cardiomyocytes and quantification of cardiomyocyte diameters. Scale bars indicate 50 μm . (b) Photomicrographs of Trichrome Masson stained cross sections and quantification of the infarct sizes (*Tie2-CreERT2;PPAR β/δ + Tamoxifen*, $n = 8$, and *Tie2-CreERT2;PPAR β/δ + vehicle*, $n = 5$). Scale bars indicate 2 mm. (c) Photomicrographs of Picrosirius red stained cross sections and quantification of cardiac fibrosis. Scale bars indicate 2 mm. Data are means \pm SEM. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.



(a)



(b)

FIGURE 6: Impaired cardiac function upon vascular-specific PPAR β/δ overexpression, which worsens after myocardial infarction. (a) Echocardiographic examination indicates increased systolic and diastolic volumes, a reduced fractional shortening, and a decreased ejection fraction in animals with vessel-specific overexpression of PPAR β/δ , which becomes more evident after myocardial infarction (b) (*Tie2-CreERT2;PPAR β/δ + Tamoxifen*, $n = 8$, and *Tie2-CreERT2;PPAR β/δ + vehicle*, $n = 5$). IVS: interventricular septum; LVID: left ventricular internal diameter; LVPW: left ventricular posterior wall. Data are means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

4. Conclusions

In this study, we investigated the effects of a vascular-specific overexpression of PPAR β/δ on cardiac phenotype and function. The rapid induction of cardiac vessel formation was accompanied by an induction of cardiac growth, characterized by an increase in cardiomyocyte diameter. Upon myocardial infarction, the increased cardiac angiogenesis neither reduced infarct sizes nor improved the cardiac function. The proper balance of PPAR β/δ activation in the different cardiac cell types may be important for potential cardioprotective effects of PPAR β/δ .

Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interests.

Acknowledgments

PPAR β/δ -*flox*^{+/-} animals were kindly provided by M. Rasoulzadegan and P. Grimaldi. The study was supported by Fondation Cœur et Artères (FCA R09038AA), Association pour la Recherche sur le Cancer (R13026AA-ARC-WAGNER), and Fondation de France (FDF-UI081-WAGNER). The work was supported by the French Government (National Research Agency, ANR) through the “Investments for the Future” LABEX SIGNALIFE program (reference ANR-11-LABX-0028-01). The authors thank A. Borderie, S. Destrée, M. Radjkhumar, P. Lopez, M. Cutajar-Bossert, and S. M. Wagner for technical assistance.

References

- [1] K.-D. Wagner and N. Wagner, “Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPAR β/δ) acts as regulator of metabolism linked to multiple cellular functions,” *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 125, no. 3, pp. 423–435, 2010.
- [2] L. Cheng, G. Ding, Q. Qin et al., “Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy,” *Nature Medicine*, vol. 10, no. 11, pp. 1245–1250, 2004.
- [3] A. Planavila, R. Rodríguez-Calvo, M. Jové et al., “Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ activation inhibits hypertrophy in neonatal rat cardiomyocytes,” *Cardiovascular Research*, vol. 65, no. 4, pp. 832–841, 2005.
- [4] A. Planavila, J. C. Laguna, and M. Vázquez-Carrera, “Nuclear factor- κ B activation leads to down-regulation of fatty acid oxidation during cardiac hypertrophy,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 17, pp. 17464–17471, 2005.
- [5] E. M. Burkart, N. Sambandam, X. Han et al., “Nuclear receptors PPAR β/δ and PPAR α direct distinct metabolic regulatory programs in the mouse heart,” *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 12, pp. 3930–3939, 2007.
- [6] N. Wagner, C. Jehl-Piétri, P. Lopez et al., “Peroxisome proliferator-activated receptor β stimulation induces rapid cardiac growth and angiogenesis via direct activation of calcineurin,” *Cardiovascular Research*, vol. 83, no. 1, pp. 61–71, 2009.
- [7] O. F. Bueno, B. J. Wilkins, K. M. Tymitz et al., “Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin A β -deficient mice,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 7, pp. 4586–4591, 2002.
- [8] X. Y. Yang, T. T. Yang, W. Schubert, S. M. Factor, and C. W. Chow, “Dosage-dependent transcriptional regulation by the calcineurin/NFAT signaling in developing myocardium transition,” *Developmental Biology*, vol. 303, no. 2, pp. 825–837, 2007.
- [9] D. Bishop-Bailey and T. Hla, “Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 24, pp. 17042–17048, 1999.
- [10] L. Piqueras, A. R. Reynolds, K. M. Hodivala-Dilke et al., “Activation of PPAR β/δ induces endothelial cell proliferation and angiogenesis,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 27, no. 1, pp. 63–69, 2007.
- [11] J. K. Han, H. S. Lee, H. M. Yang et al., “Peroxisome proliferator-activated receptor- δ agonist enhances vasculogenesis by regulating endothelial progenitor cells through genomic and nongenomic activations of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway,” *Circulation*, vol. 118, no. 10, pp. 1021–1033, 2008.
- [12] S. Müller-Brüsselbach, M. Kömhoff, M. Rieck et al., “Deregulation of tumor angiogenesis and blockade of tumor growth in PPAR β -deficient mice,” *The EMBO Journal*, vol. 26, no. 15, pp. 3686–3698, 2007.
- [13] A. Abdollahi, C. Schwager, J. Kleeff et al., “Transcriptional network governing the angiogenic switch in human pancreatic cancer,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 31, pp. 12890–12895, 2007.
- [14] C. Gaudel, C. Schwartz, C. Giordano, N. A. Abumrad, and P. A. Grimaldi, “Pharmacological activation of PPAR β promotes rapid and calcineurin-independent fiber remodeling and angiogenesis in mouse skeletal muscle,” *The American Journal of Physiology—Endocrinology and Metabolism*, vol. 295, no. 2, pp. E297–E304, 2008.
- [15] S. Luquet, J. Lopez-Soriano, D. Holst et al., “Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability,” *The FASEB Journal*, vol. 17, no. 15, pp. 2299–2301, 2003.
- [16] A. Forde, R. Constien, H.-J. Gröne, G. Hämmerling, and B. Arnold, “Temporal Cre-mediated recombination exclusively in endothelial cells using Tie2 regulatory elements,” *Genesis*, vol. 33, no. 4, pp. 191–197, 2002.
- [17] K.-D. Wagner, N. Wagner, J.-K. Guo et al., “An inducible mouse model for PAX2-dependent glomerular disease: insights into a complex pathogenesis,” *Current Biology*, vol. 16, no. 8, pp. 793–800, 2006.
- [18] L. W. van Laake, R. Passier, J. Monshouwer-Kloots et al., “Monitoring of cell therapy and assessment of cardiac function using magnetic resonance imaging in a mouse model of myocardial infarction,” *Nature Protocols*, vol. 2, no. 10, pp. 2551–2567, 2007.
- [19] K. D. Wagner, N. Wagner, H. Ghanbarian et al., “RNA induction and inheritance of epigenetic cardiac hypertrophy in the mouse,” *Developmental Cell*, vol. 14, no. 6, pp. 962–969, 2008.
- [20] I. Banerjee, J. W. Fuseler, R. L. Price, T. K. Borg, and T. A. Baudino, “Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse,” *The American Journal of Physiology—Heart and Circulatory Physiology*, vol. 293, no. 3, pp. H1883–H1891, 2007.
- [21] D. Bishop-Bailey, “PPARs and angiogenesis,” *Biochemical Society Transactions*, vol. 39, no. 6, pp. 1601–1605, 2011.
- [22] N. Wagner, K.-D. Wagner, H. Theres, C. Englert, A. Schedl, and H. Scholz, “Coronary vessel development requires activation

- of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilms' tumor transcription factor Wt1," *Genes and Development*, vol. 19, no. 21, pp. 2631–2642, 2005.
- [23] J. Folkman, "Is tissue mass regulated by vascular endothelial cells? Prostate as the first evidence," *Endocrinology*, vol. 139, no. 2, pp. 441–442, 1998.
- [24] D. Tirziu, E. Chorianopoulos, K. L. Moodie et al., "Myocardial hypertrophy in the absence of external stimuli is induced by angiogenesis in mice," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 11, pp. 3188–3197, 2007.
- [25] D. Davies and H. L. Blumgart, "Cardiac hypertrophy: ist relation to arteriosclerosis and congestive heart failure," *Annals of Internal Medicine*, vol. 11, article 1024, 1937.
- [26] M. Pesant, S. Sueur, P. Dutartre et al., "Peroxisome proliferator-activated receptor δ (PPAR δ) activation protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced apoptosis," *Cardiovascular Research*, vol. 69, no. 2, pp. 440–449, 2006.
- [27] L. Sheng, P. Ye, Y. X. Liu, C. G. Han, and Z. Y. Zhang, "Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ activation improves angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in vitro," *Clinical and Experimental Hypertension*, vol. 30, no. 2, pp. 109–119, 2008.

La surexpression endothéliale de *PPAR β/δ* à l'état basal est responsable d'une activation de l'angiogenèse coronaire, d'une hypertrophie ventriculaire gauche (mesurée par le poids du cœur et la taille des cardiomyocytes) et d'un remodelage ventriculaire gauche, manifesté à l'échocardiographie par une augmentation modérée des volumes et une diminution très modérée de la fonction systolique. Ces effets apparaissent stables dans le temps, en comparaison avec nos groupes de souris contrôles.

En post-IDM, la surexpression endothéliale de *PPAR β/δ* est à l'origine d'une angiogenèse coronaire plus intense dans la zone nécrosée, la zone bordant l'IDM et au sein du myocarde sain. Une hypertrophie cardiaque significative est confirmée avec les mêmes paramètres qu'à l'état basal. Enfin, la surexpression endothéliale de *PPAR β/δ* n'exerce pas d'effet cardioprotecteur puisque responsable d'une augmentation de la taille de l'IDM, d'une fibrose myocardique accrue et d'un remodelage cardiaque plus marqué avec dysfonction systolique modérée et dilatation importante du ventricule gauche.

DISCUSSION

Notre étude possède l'originalité d'étudier l'isoforme la moins connue des PPARs. En effet, aucun des agonistes de PPAR β/δ ne dispose de preuves cliniques solides sur son efficacité et sa sécurité d'utilisation, à l'inverse de PPAR γ (glitazones anciennement utilisées dans le traitement du diabète de type 2) et de PPAR α (fibrates prescrits dans la dyslipidémie). Pourtant, l'importance de son expression vasculaire et cardiaque justifie une meilleure connaissance des conséquences moléculaires et fonctionnelles d'une surexpression de PPAR β/δ , préalable à l'utilisation clinique d'agonistes spécifiques. Ce travail est le premier à s'intéresser aux conséquences cardiaques de la surexpression de PPAR β/δ spécifiquement dans la cellule endothéliale. En effet, plusieurs études ont montré l'effet cardioprotecteur d'une activation globale de PPAR β/δ (Planavila A et al., 2005 ; Yue TL et al., 2008) ou d'une surexpression spécifique au cardiomyocyte (Liu J et al., 2011). Les expériences de délétion de PPAR β/δ dans les cardiomyocytes viennent confirmer ce postulat, retrouvant une hypertrophie cardiaque et une dysfonction ventriculaire gauche médiée par lipotoxicité (Cheng L et al., 2004).

De même, il a été novateur de s'intéresser aux effets vasculaires coronaires d'une augmentation d'expression de PPAR β/δ , notamment les effets sur l'angiogenèse à l'état basal et en post-IDM. Ce travail confirme les résultats antérieurs de notre équipe consécutifs à une activation globale de PPAR β/δ (Wagner N et al., 2009). De plus, l'article récent de Park et coll vient corroborer nos résultats, établissant qu'une activation pharmacologique de PPAR β/δ stimule l'angiogenèse coronaire en post-IDM chez le rat (Park JR et al., 2016).

La littérature n'est pas formelle sur les conséquences d'une surexpression PPAR β/δ sur la masse cardiaque. La majorité des études s'accorde sur un effet protecteur de la surexpression de PPAR β/δ contre l'hypertrophie cardiaque (Liu J et al., 2011). Pourtant, notre étude conclut différemment, avec l'appui d'autres travaux (Wagner N et al., 2009 ; Planavila et al., 2005). Ainsi, une hypertrophie ventriculaire gauche excentrique significative survient rapidement après surexpression endothéliale de PPAR β/δ à l'état basal et en post-IDM (indépendamment de la réponse hypertrophique attendue dans cette pathologie). Si la majorité des études menées avec des modèles de délétion ou

d'activation de *PPAR β/δ* lui prêtent un effet protecteur contre l'hypertrophie cardiaque, il faut souligner que ces travaux ont utilisé une modulation de l'expression de *PPAR β/δ* globale ou uniquement cardiomyocytaire, et non pas spécifiquement à la cellule endothéliale comme c'est le cas dans notre étude. Ceci peut expliquer la singularité de nos résultats. Les hypothèses physiopathologiques retenues font appel aux interactions cellulaires majeures existant entre cellules endothéliales et cardiomyocytes : une modification du métabolisme endothélial liée à la surexpression de *PPAR β/δ* aura des conséquences sur le fonctionnement cellulaire, potentiellement sur le transport des nutriments vers les cardiomyocytes et donc leur métabolisme, ou sur la sécrétion de facteurs paracrines trophiques   destinée des cardiomyocytes. Par ailleurs, le lien de causalité entre angiog nese accrue et hypertrophie cardiomyocytaire est bien démontré, médié par une synthèse accrue de NO (Tirziu D et al., 2007). Notre modèle de surexpression endothéliale de *PPAR β/δ* indique pour la première fois que le primum movens à l'hypertrophie cardiaque médiée par *PPAR β/δ* est bien un  v nement endothélial, la surexpression de la NOS endothéliale observée appuyant cette conclusion. Par ailleurs, on peut s'interroger sur le caractère réellement pathologique de l'hypertrophie cardiaque observée à l'état basal chez nos souris. Toute hypertrophie cardiaque n'est pas délétère, en témoigne le remodelage physiologique observé chez le sportif entraîné. Ce remodelage est caractérisé par une augmentation de la masse cardiaque, une augmentation modérée des volumes ventriculaires gauches et une fonction systolique à la limite inférieure de la normale (mais accompagnée d'une réserve de contractilité à l'effort), correspondant au phénotype échocardiographique de nos souris à l'état basal.

Enfin, les propriétés cardioprotectrices suspectées de *PPAR β/δ* décrites dans les études pré-cliniques rendent pertinente l'utilisation d'agonistes spécifiques dans la prévention de la maladie athéromateuse chez le sujet diabétique ou dyslipid mique présentant un syndrome métabolique. En effet, ces pathologies sont caractérisées par une dysfonction endothéliale, médiée par une activation importante de l'inflammation, de l'agrégation plaquettaire et du stress oxydatif, tous des cibles de *PPAR β/δ* (Münzel T et al., 2010). L'équipe de Quintela et coll. a prouvé l'action protectrice de *PPAR β/δ* contre la dysfonction endothéliale chez des rats diabétiques (Quintela AM et al., 2012). De plus, le travail de Chen et coll. décrit une amélioration de la contractilité cardiaque après activation de *PPAR β/δ* par l'agoniste GW0742 chez des rats traités par doxorubicine, une

molécule anticancéreuse responsable de la survenue d'insuffisance cardiaque (Chen ZC et al., 2013). Cette protection serait médiée par les effets anti-inflammatoires du facteur transcriptionnel Bcl-6, libéré de sa liaison d'avec *PPARβ/δ* après activation de ce dernier (Altieri P et al., 2012). Enfin, *Burkart et coll.* montrent qu'une surexpression de *PPARβ/δ* diminue les lésions d'ischémie-reperfusion après un IDM (Burkart EM et al., 2007). Tous ces travaux sont encourageants pour l'avenir de l'activation de *PPARβ/δ* dans la pathologie cardiovasculaire, mais font appel à un mécanisme d'activation globale ou spécifiquement cardiomyocytaire de *PPARβ/δ*, contrairement à notre étude.

Notre travail n'a pas confirmé ces résultats favorables sur la fonction contractile cardiaque en post-IDM. En effet, la taille de l'IDM est majorée après surexpression endothéliale de *PPARβ/δ*, avec pour conséquence un remodelage cardiaque exacerbé, une fibrose myocardique majorée, et une dilatation et une dysfonction systolique ventriculaires gauches plus importantes. Ce résultat illustre certainement la nécessité d'un équilibre de l'expression de *PPAR* dans tous les types cellulaires cardiaques, et particulièrement au sein du couple cellule endothéliale-cardiomyocyte, afin d'assurer le bon fonctionnement cellulaire. De façon intéressante, la recherche clinique moderne sur les agonistes pharmacologiques des PPARs s'oriente désormais sur une modulation du récepteur, ou sur une activation coordonnée de plusieurs isoformes de PPARs (*PPARα* et *β/δ* par exemple) afin de s'affranchir des effets secondaires observés dans les études cliniques (principalement pour les agonistes de *PPARγ*, plus accessoirement pour les agonistes de *PPARα*). Par ailleurs, les PPARs exercent sur l'expression de leur gènes cible une régulation non-génomique et post-traductionnelle, dont les mécanismes sont encore mal appréhendés, en particulier pour *PPARβ/δ* qui est l'isoforme la moins étudiée (Ajith TA et Jayakumar TG, 2016 ; Lee WS et Kim J, 2015).

Différents des effets cardioprotecteurs admis dans la littérature, nos résultats tiennent compte de la complexité de la régulation liée aux PPARs et de leurs nombreux rôles dans les cellules endothéliales. D'autres travaux sont donc nécessaires pour confirmer et étayer ces résultats. De ce fait, il semble prématuré d'envisager le recours à l'activation pharmacologique de *PPARβ/δ* avant de mieux appréhender les mécanismes soutenant nos résultats, en particulier dans la pathologie ischémique coronaire.

PARTIE II : *Wt1*

Les souris double transgéniques *Tie2-Cre-ERT2; Wt1^{LoxP+/+}* ont été soumises à l'injection de tamoxifène, afin d'obtenir la délétion de *Wt1* spécifiquement à la lignée endothéliale. Un deuxième groupe a bénéficié de l'administration de l'excipient (huile), ne permettant pas la recombinaison génétique, constituant le groupe contrôle.

Les animaux ont bénéficié d'une ligature coronaire, réalisant un IDM, ou de la procédure-leurre.

La réalisation d'échocardiographies avant et après la chirurgie, d'analyses (immuno)histochimiques, et d'analyses moléculaires a permis d'étudier les conséquences structurelles et fonctionnelles de la délétion de *Wt1* à différentes phases :

- en conditions basales (pas de lésion myocardique c'est-à-dire avant ligature coronaire),
- à la phase aiguë de l'IDM (48 heures après la ligature coronaire),
- à la phase de réparation (3 semaines après IDM).

Ces trois "conditions" régissent la trame d'écriture des résultats de l'étude.

1. Conditions basales

a. Vérification de la recombinaison génétique

Dans ce modèle, la recombinaison génétique est assurée par l'injection de tamoxifène, comme démontré dans un travail précédent de l'équipe (Wagner KD et al., 2014).

b. Masse cardiaque

Aucune différence significative du ratio poids du cœur/poids corporel n'est retrouvée entre les deux groupes contrôles (*Tie2-Cre ER^{T2};Wt1* + huile et *Tie2-Cre ER^{T2} + tamoxifène*), et le groupe induit (*Tie2-Cre ER^{T2};Wt1* + tamoxifène) (Figure 5).

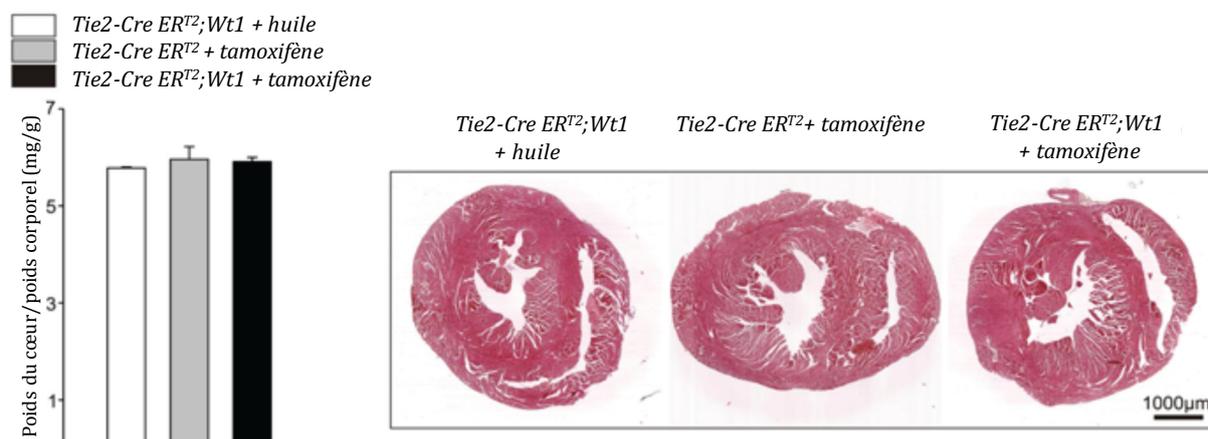


Figure 5 : Absence d'effet de l'inactivation de *Wt1* ou de l'injection de tamoxifène sur la masse cardiaque en conditions basales. Ratio poids du cœur/poids corporel et sections de cœur colorées avec HES. Données exprimées en moyenne \pm écart-type de la moyenne.

c. Echocardiographie

La figure 6 présente la comparaison des paramètres échocardiographiques des deux groupes contrôles (*Tie2-Cre ER^{T2};Wt1* + huile, n=5 et *Tie2-Cre ER^{T2} + tamoxifène*, n=5) avec le groupe induit (*Tie2-Cre ER^{T2};Wt1* + tamoxifène, n=8). Avant réalisation de la ligature coronaire, il n'existe aucune différence significative entre les trois groupes sur les volumes ventriculaires gauches (télédiastolique et télésystolique) ou sur la fonction systolique ventriculaire gauche (explorée par la fraction d'éjection et la fraction de

raccourcissement) (Figure 6a). La figure 6b illustre ces résultats au moyen d'acquisitions échocardiographiques réalisées en mode TM.

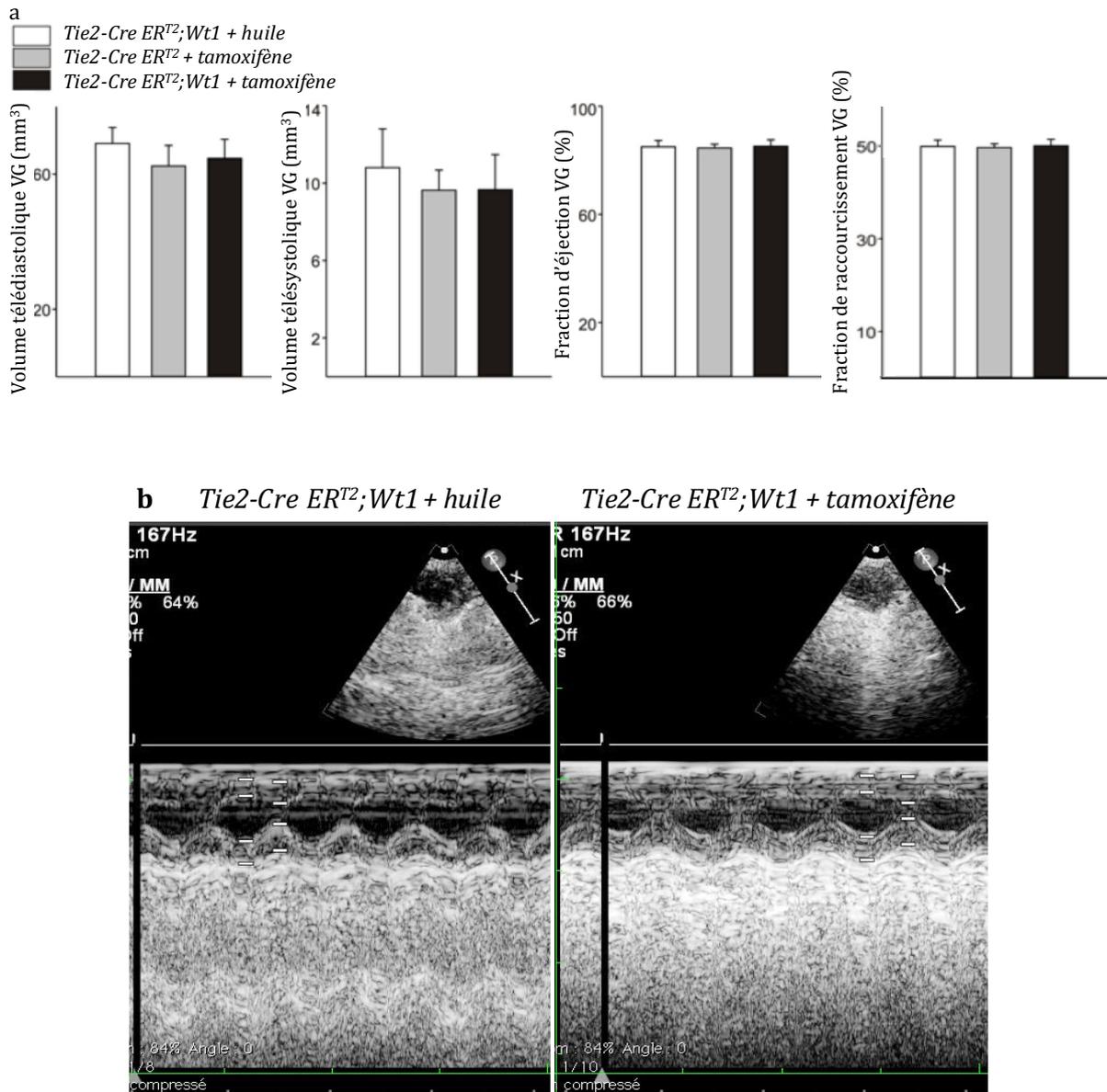


Figure 6 : Absence d'effet de l'inactivation de *Wt1* ou de l'injection de tamoxifène sur les paramètres échocardiographiques en conditions basales. a) Mesure des volumes ventriculaires gauches (VG), de la fraction d'éjection et de la fraction de raccourcissement VG. b) Acquisitions échocardiographiques en mode TM. Données exprimées en moyenne \pm écart-type de la moyenne.

En résumé, il n'existe aucune différence structurelle ou fonctionnelle cardiaque liée à l'inactivation de *Wt1*. Nous pouvons également conclure à l'innocuité de l'administration de tamoxifène sur l'anatomie et la fonction cardiaques.

2. Phase aiguë de l'IDM

a. Analyses histologiques

i. Poids du cœur et taille des cardiomyocytes

Le ratio poids du cœur/poids de l'animal est augmenté chez les souris ne réexprimant pas *Wt1* (Figure 7a).

A la phase aiguë de l'infarctus, les animaux pour lesquels *Wt1* a été invalidé présentent une hypertrophie cardiomyocytaire plus marquée (augmentation des diamètres cellulaires) (Figure 7b).

Ces résultats affirment l'hypertrophie cardiaque plus marquée par hypertrophie cardiomyocytaire chez les souris ne réexprimant pas *Wt1* en phase aiguë de l'IDM.

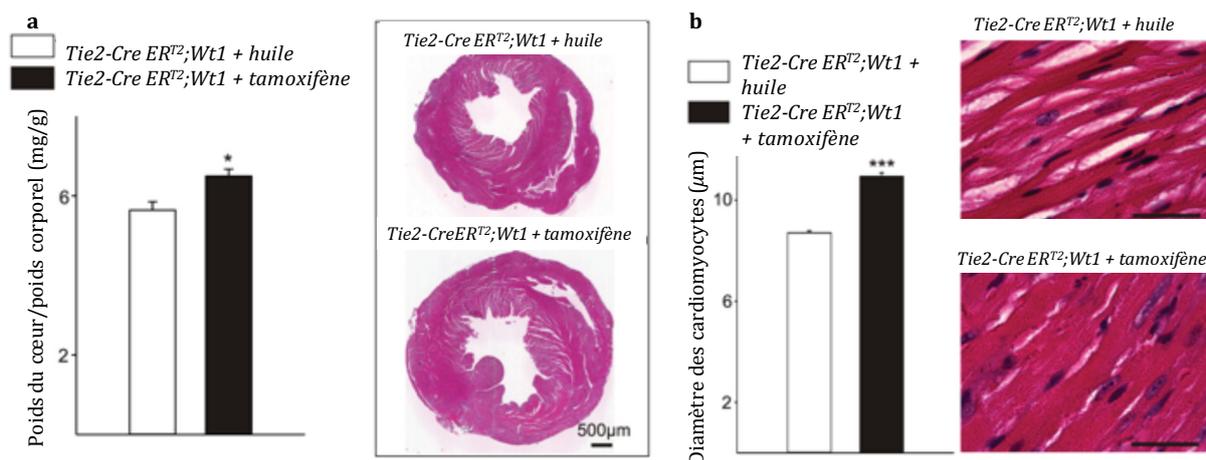


Figure 7 : Hypertrophie cardiaque par hypertrophie cardiomyocytaire plus marquée à la phase aiguë de l'IDM chez les souris présentant une invalidation endothéliale de *Wt1* (*Tie2-Cre ER^{T2};Wt1 + tamoxifène*). a) Ratio poids du cœur/poids corporel et sections de cœur colorées à l'HES. b) Diamètre des cardiomyocytes mesuré à partir de coupes de cœur colorées à l'HES et observées à fort grossissement. Données exprimées en moyenne \pm écart-type de la moyenne. * $p < 0.05$ et *** $p < 0.001$.

ii. Taille de l'IDM

A 48 heures de la ligature coronaire, la taille de l'infarctus du myocarde est augmentée dans le groupe de souris ne pouvant réexprimer *Wt1* (figure 8).

On observe également un infiltrat plus important de cellules immunitaires dans le tissu myocardique des souris invalidées pour *Wt1* (données non montrées).

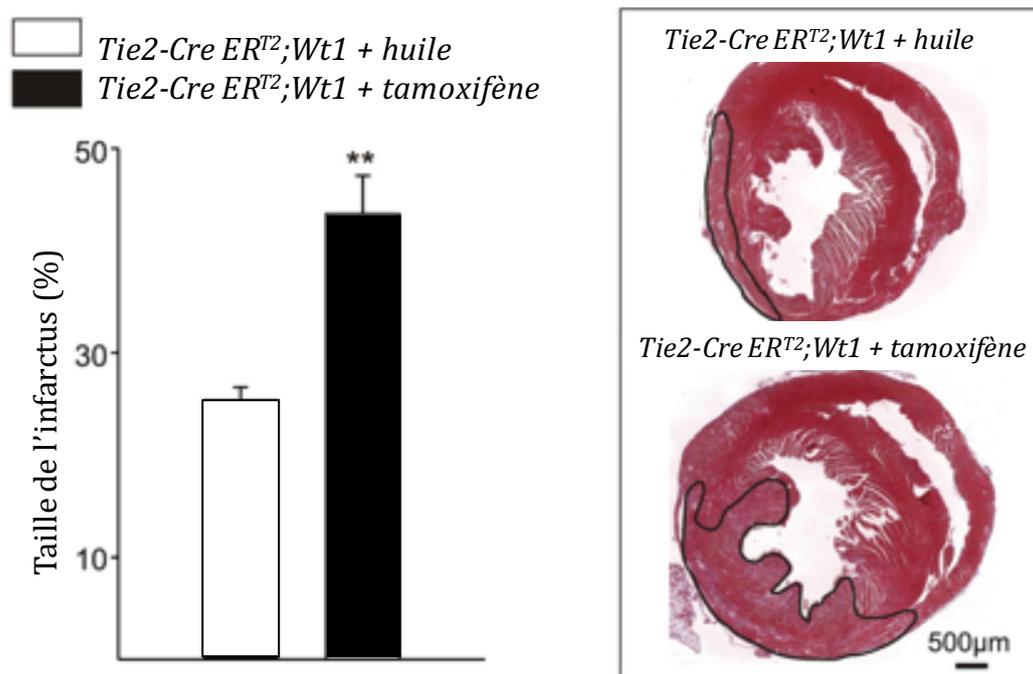


Figure 8 : Taille plus importante de l'IDM en cas d'inactivation de *Wt1* (Tie2-Cre $ER^{T2};Wt1$ + tamoxifène). Quantification à partir de sections de cœur colorées au Trichrome de Masson. Données exprimées en moyenne \pm écart-type de la moyenne. $p^{**} < 0.01$.

b. Analyses immunohistochimiques

La figure 9 présente les expériences d'immunomarquage réalisées à la phase aiguë de l'infarctus.

En cas d'inactivation endothéliale de *Wt1*, la plus faible expression de *Wt1* est confirmée au niveau des vaisseaux coronaires en phase aiguë d'IDM (Figure 9a).

De même, l'immunomarquage de Pecam-1 est moins intense lorsque *Wt1* n'est pas réexprimé en post-IDM, témoignant d'une densité vasculaire coronaire plus faible dans le tissu myocardique en l'absence de *Wt1* (Figure 9b).

Enfin, la densité myocardique de Hif-1 α augmente chez les animaux invalidés pour *Wt1*, reflétant une ischémie plus importante (Figure 9c).

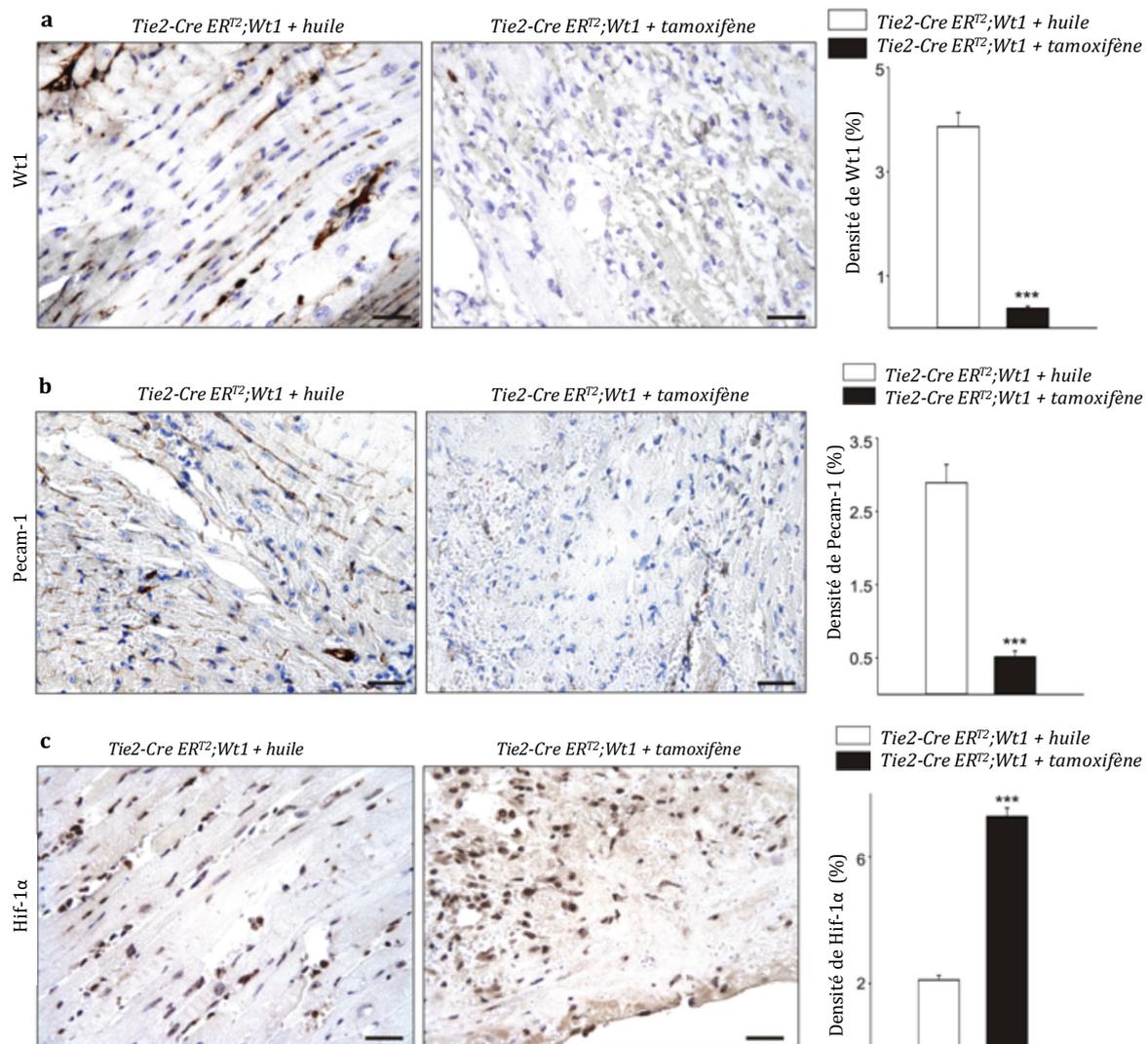


Figure 9 : Densité vasculaire plus faible et ischémie plus sévère concomitantes d'une diminution de l'expression de Wt1 en phase aiguë de l'IDM chez les souris invalidées pour le gène (Tie2-Cre ER^{T2};Wt1 + huile vs Tie2-Cre ER^{T2};Wt1 + tamoxifène). a) Immunomarquage et quantification de la densité de Wt1. b) Immunomarquage et quantification de la densité de Pecam-1. c) Immunomarquage et quantification de la densité de Hif-1α. Données exprimées en moyenne ± écart-type de la moyenne. p*** < 0.001.

c. Analyses échocardiographiques

La dilatation ventriculaire gauche semble plus importante chez les souris ne réexprimant pas *Wt1*, comme en témoignent des volumes VG télédiaastolique et télésystolique plus élevés en comparaison avec les animaux contrôles.

La fonction contractile VG, évaluée par la fraction d'éjection et la fraction de raccourcissement du VG, semble superposable entre nos deux groupes d'animaux à ce stade précoce en post-IDM.

Ainsi, bien qu'induisant une dilatation VG supérieure, l'inactivation de *Wt1* ne provoque pas d'altération précoce significative de la fonction contractile VG en post-IDM. Ces résultats sont illustrés dans la figure 10.

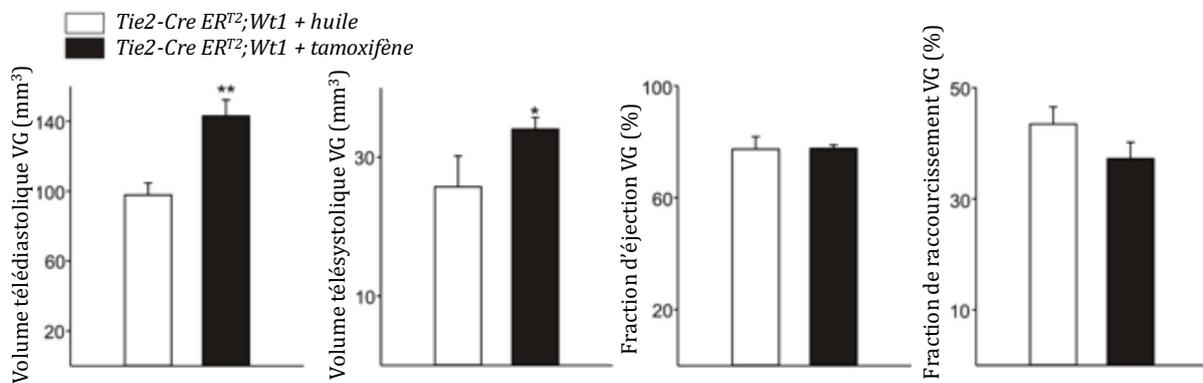


Figure 10 : Dilatation ventriculaire gauche (VG) débutante chez les souris ne réexprimant pas *Wt1*. Pas de différence concernant la fonction systolique VG. Données exprimées en moyenne \pm écart-type de la moyenne. * $p < 0.05$ et $p^{**} < 0.01$.

d. Identification des gènes cibles de *Wt1* : clonage et transfection

Des gènes cibles potentiels de *Wt1* ont été identifiés parmi un panel de facteurs angiogéniques et de gènes impliqués dans l'inflammation ou la prolifération cellulaire grâce à la réalisation de RT-qPCR à partir de tissu cardiaque prélevé à la phase aiguë de l'infarctus. La liste de ces gènes ainsi que leur niveau d'expression en fonction de *Wt1* sont fournis en annexe 1.

La présence de sites de liaison pour *Wt1* dans les régions promotrices de ces gènes candidats, sites susceptibles d'être des éléments de réponse, a été prédite in silico à l'aide du logiciel informatique TRANSFAC et de la base de données Ensembl. La liste est fournie en annexe 2.

Ces séquences promotrices ont ensuite été insérées dans des constructions plasmidiques (pGL3basic) en amont d'un gène rapporteur (luciférase). Leur cotransfection avec un plasmide vide ou un plasmide contenant un gène codant pour une des deux isoformes de *Wt1* (+KTS ou -KTS), réalisée par le Dr KD Wagner, a permis de mesurer deux niveaux d'expression du gène étudié en fonction de la forme de *Wt1*. La comparaison de ces niveaux d'expression a permis d'identifier l'endothéline 1 et l'angiopoietin-like 3 comme deux gènes cibles intéressants.

La liaison de *Wt1* aux promoteurs de ces deux gènes a été confirmée lors d'une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine (ou CHIP) par le Dr KD Wagner.

En résumé, l'inactivation de *Wt1* est responsable d'anomalies fonctionnelles dès la phase précoce du post-IDM. Les souris ne réexprimant pas *Wt1* présentent une hypertrophie ventriculaire gauche (hypertrophie cardiomyocytaire) significativement augmentée, une ischémie et une nécrose myocardiques plus importantes concomitantes d'une diminution de la densité vasculaire, responsables d'un début de remodelage cardiaque sans conséquence sur la fonction contractile cardiaque. Les analyses moléculaires ont identifié l'endothéline et l'angiopoietin-like 3 comme des gènes cibles de *Wt1* potentiellement intéressants.

3. Phase de réparation

a. Analyses histologiques

i. Poids du cœur et taille des cardiomyocytes

En phase de réparation de l'IDM, le ratio poids du cœur/poids corporel est supérieur lorsque *Wt1* est inactivé, témoin d'une hypertrophie cardiaque plus importante chez les souris ne pouvant réexprimer *Wt1*.

L'étude des dimensions des cardiomyocytes montre une augmentation de leur diamètre, révélatrice d'une hypertrophie cardiomyocytaire plus importante chez les souris ne réexprimant pas *Wt1*.

Ces données sont résumées dans la figure 11.

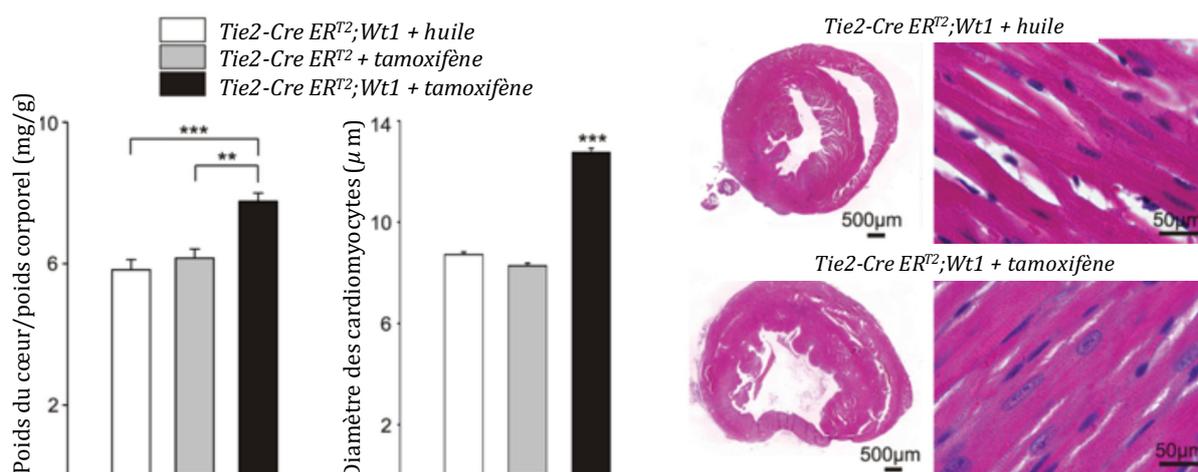


Figure 11 : Hypertrophie cardiaque par hypertrophie cardiomyocytaire plus marquée à la phase de réparation de l'IDM chez les souris présentant une invalidation endothéliale de *Wt1* (*Tie2-Cre ER^{T2};Wt1 + tamoxifène*). Ratio poids du cœur/poids corporel et diamètre des cardiomyocytes mesuré à partir de coupes de cœur colorées à l'HES et observées à fort grossissement. Données exprimées en moyenne \pm écart-type de la moyenne. ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$.

ii. Taille de l'IDM

Les souris pour lesquelles *Wt1* est inactivé présentent des infarctus plus étendus, comme illustré sur des sections de cœur colorée au Trichrome de Masson (figure 12).

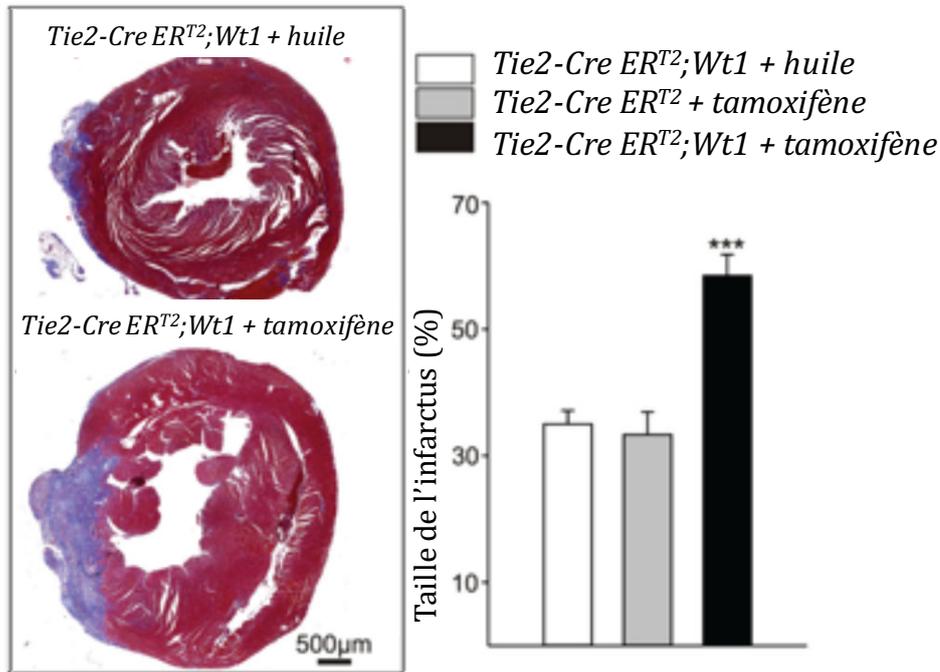


Figure 12 : Extension de l'IDM plus importante à la phase de réparation de l'IDM chez les souris ne réexprimant pas *Wt1* (*Tie2-Cre ER^{T2};Wt1 + tamoxifène*). Quantification à partir de sections de cœur colorées au Trichrome de Masson. Données exprimées en moyenne \pm écart-type de la moyenne. $p^{***} < 0.001$.

iii. Fibrose myocardique interstitielle

La figure 13 présente une comparaison des taux de collagène, représenté par la densité de coloration au rouge Sirius, dans nos groupes d'animaux en fonction de l'expression de *Wt1*. A la phase de réparation de l'IDM, la fibrose myocardique interstitielle est plus élevée dans le myocarde des animaux où *Wt1* est invalidé.

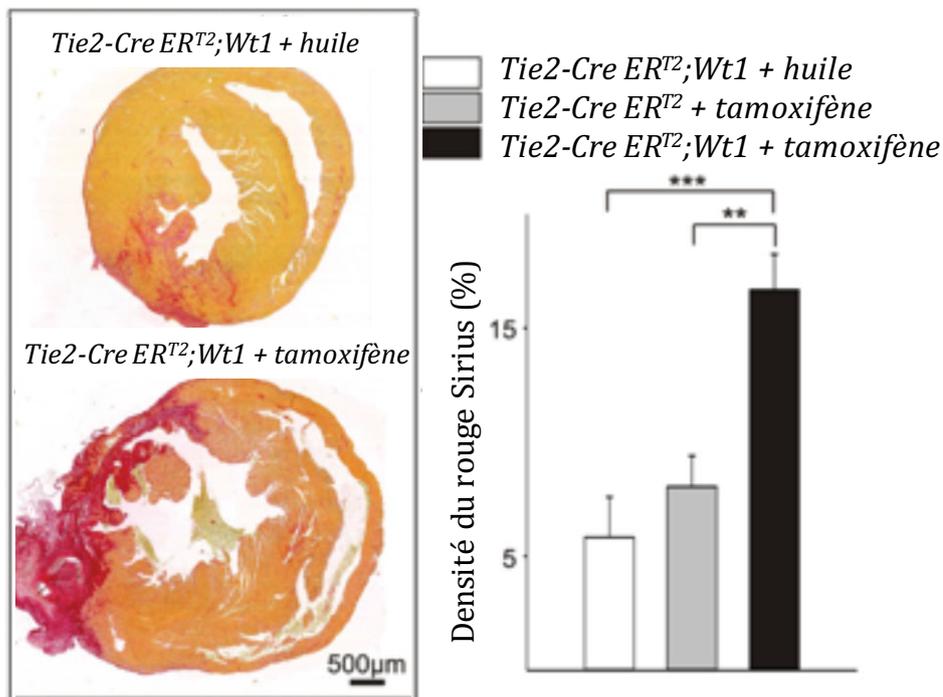


Figure 13 : Fibrose myocardique interstitielle plus marquée chez les souris présentant une invalidation endothéliale de *Wt1* (*Tie2-Cre ER^{T2};Wt1 + tamoxifène*). Sections de cœur colorées au rouge Sirius observées en microscopie optique en lumière polarisée. Données exprimées en moyenne \pm écart-type de la moyenne. ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$.

b. Analyses immunohistochimiques : expériences d'immunomarquage

A cette phase de réparation post-infarctus, les expériences d'immunomarquage de *Wt1* ont confirmé une moindre expression chez les animaux où *Wt1* est inactivé (données non montrées).

Les expériences d'immunomarquage de *Pecam-1* ont conclu à une densité vasculaire inférieure dans la zone bordante et la zone infarctée, mais pas dans le myocarde sain (à distance de l'IDM) lorsque le gène *Wt1* est invalidé (Figure 14).

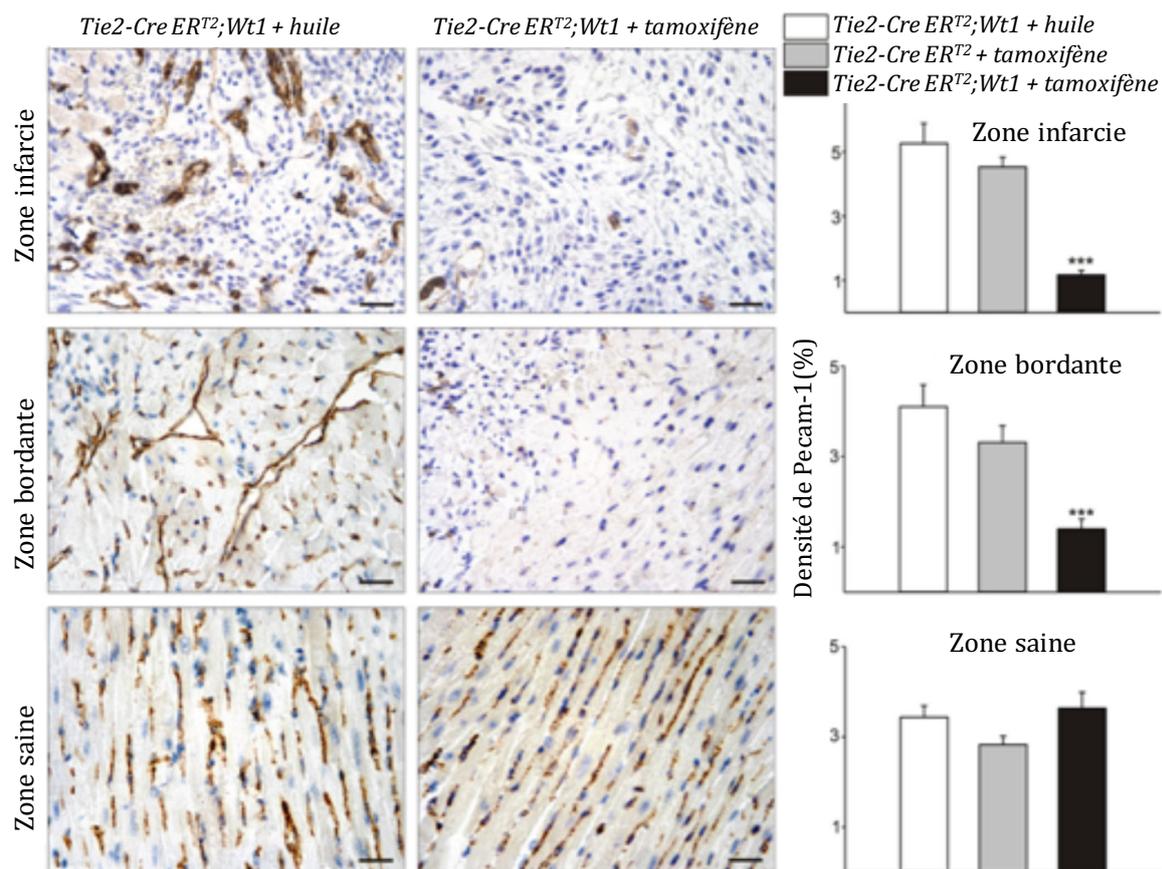


Figure 14 : Densité vasculaire plus faible dans la zone bordante et la zone infarctée à la phase de réparation chez les souris invalidées pour le gène (*Tie2-Cre ER^{T2};Wt1 + tamoxifène*). Immunomarquage et quantification de la densité de *Pecam-1*. Données exprimées en moyenne \pm écart-type de la moyenne. $p^{***} < 0.001$.

La quantification de l'immunomarquage de *Hif1 α* révèle une expression augmentée dans le tissu myocardique infarcté ou bordant l'IDM mais pas dans le myocarde sain, témoignant d'une hypoxie tissulaire plus importante chez les souris ne réexprimant pas *Wt1* (Figure 15).

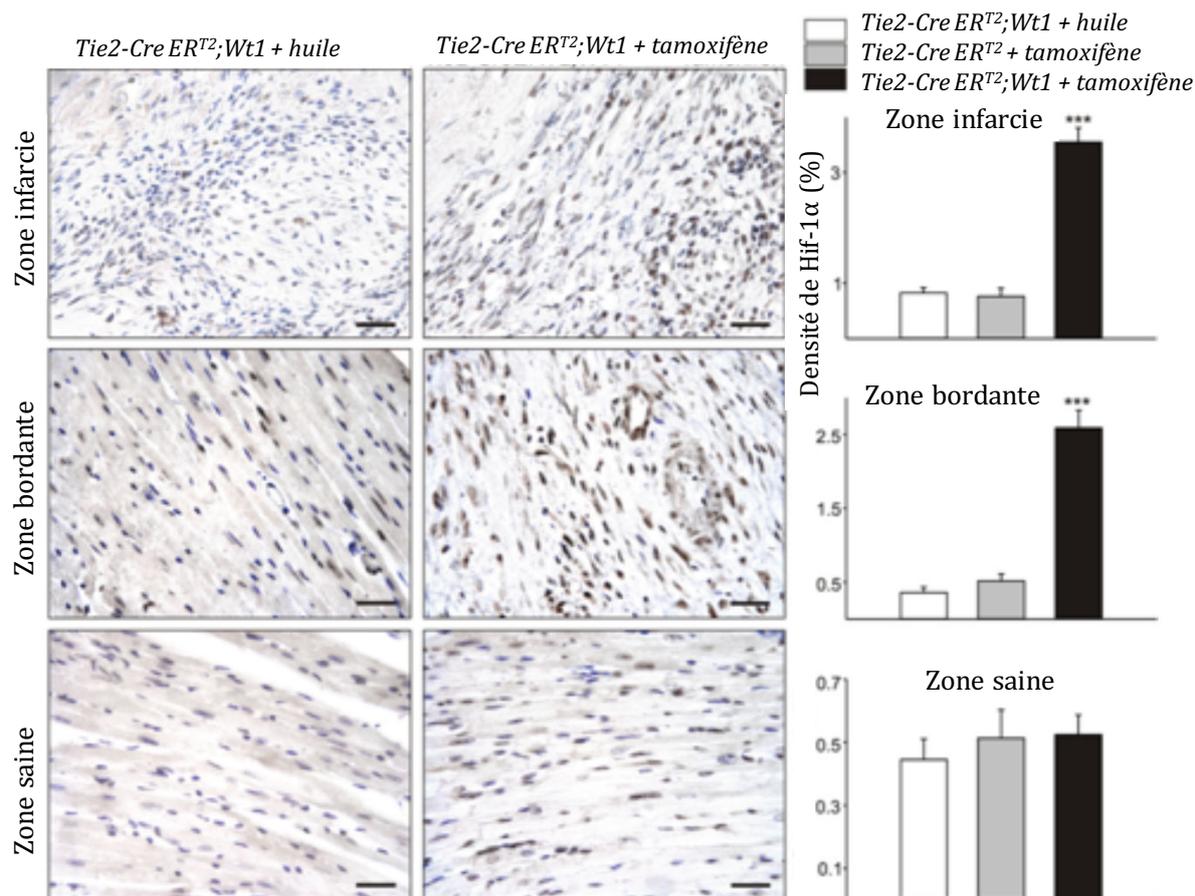


Figure 15 : Hypoxie plus importante dans la zone bordante et la zone infarctée à la phase de réparation chez les souris invalidées pour le gène *Wt1* (*Tie2-Cre ER^{T2};Wt1 + tamoxifène*). Immunomarquage et quantification de la densité de *Hif-1α*. Données exprimées en moyenne \pm écart-type de la moyenne. $p^{***} < 0.001$.

c. Analyses échocardiographiques

La procédure-leurre (ou "Sham") a été réalisée sur un petit nombre d'animaux (n=3) dont les paramètres échocardiographiques ont été recueillis 3 semaines après la chirurgie. Ces paramètres ont été comparés à ceux obtenus sur un nombre identique de souris contrôles de même génotype (*Tie2-Cre ER^{T2};Wt1 + huile*) ayant bénéficié de la ligature coronaire.

A 3 semaines de la procédure chirurgicale, le ventricule gauche des animaux contrôles ayant bénéficié de la ligature coronaire présente une dilatation (significative uniquement sur le volume téléstolique) et une dysfonction contractile ventriculaires gauches, en comparaison avec les animaux contrôles du groupe "Sham" (Figure 16). En effet, les paramètres échocardiographiques des souris ayant bénéficié de la procédure-leurre ne

sont pas significativement modifiés à la phase de réparation post-IDM par rapport aux conditions basales (résultats non montrés).

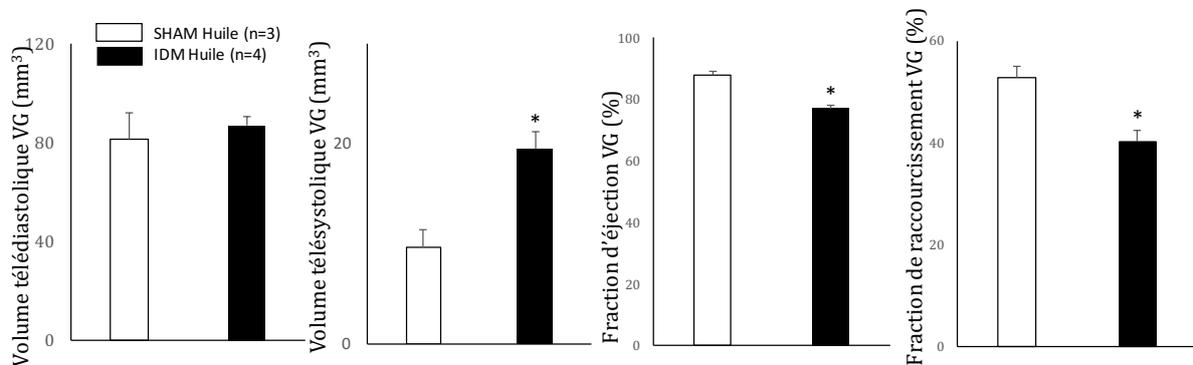


Figure 16 : Dilatation ventriculaire gauche (VG) et dysfonction systolique VG chez les souris contrôles (*Tie2-Cre ERT²;Wt1 + huile*) à 3 semaines de l'IDM, comparaison aux mêmes souris contrôles à 3 semaines de la "procédure-leurre" (SHAM). Données exprimées en moyenne \pm écart-type de la moyenne. * $p < 0.05$.

A la phase de réparation de l'IDM, la fonction contractile ventriculaire gauche est significativement plus altérée dans le groupe des animaux invalidés pour *Wt1* en comparaison avec les animaux contrôles (Figure 17). La diminution observée entre pré et post-infarctus n'est significative que dans le groupe où *Wt1* est invalidé, ce qui traduit un remodelage cardiaque plus important en cas de non-réexpression de *Wt1* (données non montrées).

A 3 semaines de l'IDM, le ventricule gauche des souris invalidées pour *Wt1* est significativement plus dilaté par rapport aux animaux contrôles (Figure 17). De même que pour la fonction contractile, cette dilatation n'est significative entre pré et post-infarctus qu'en cas d'invalidation du gène (et pas dans le groupe contrôle), traduisant un remodelage cardiaque plus intense en l'absence de réexpression de *Wt1* (données non montrées). Ces résultats sont confirmés après indexation des volumes VG au poids corporel.

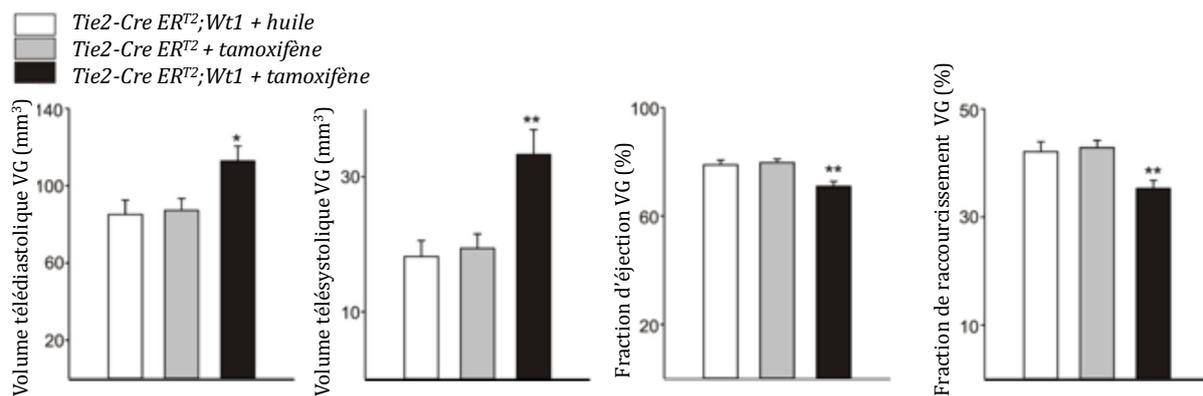


Figure 17 : Dilatation et dysfonction contractile du ventricule gauche (VG) constatées à la phase de réparation en post-IDM chez les souris ne réexprimant pas *Wt1*. Données exprimées en moyenne \pm écart-type de la moyenne. * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

d. Analyses moléculaires : expression en ARN des gènes d'intérêt

La mesure de l'expression de *Wt1* réalisée à partir d'ARN de cœur entier n'a pas mis en évidence de différence significative entre nos deux groupes à la phase de réparation post-IDM.

Parmi les gènes étudiés, seuls *PlGF* et *Cited1* (Cbp/p300-interacting transactivator with Gl/Asp-rich carboxy-terminal domain) voient leur expression augmenter en cas d'inactivation de *Wt1*. *PlGF* code pour un facteur angiogénique intervenant par le biais du signal VEGF. *Cited1* code pour une protéine transactivatrice du complexe CBP (pour CREB binding protein)/p300 qui intervient dans la voie de signalisation de TGF β et active la survie cellulaire.

En résumé, les analyses réalisées à la phase de réparation de l'IDM montrent que l'inactivation de *Wt1* est responsable d'une hypertrophie cardiomyocytaire, d'une fibrose interstitielle myocardique aggravée, d'une hypoxie plus marquée concomitante d'une moindre néovascularisation de la zone nécrosée et de la zone bordant l'IDM. La traduction fonctionnelle est un phénotype plus franc d'insuffisance cardiaque, caractérisé par un remodelage ventriculaire gauche intense : hypertrophie cardiaque, dilatation et dysfonction contractile ventriculaire gauche.

En conclusion, ce travail a montré que l'expression endothéliale de *Wt1* n'est pas nécessaire au fonctionnement cardiaque dans des conditions normales, ce que paraît corroborer la faible expression basale de *Wt1* par un nombre restreint de cellules épicaudiques et de cellules endothéliales.

L'invalidation de *Wt1* est responsable d'anomalies précoces en post-IDM : l'hypertrophie cardiaque débutante majeure l'hypoxie tissulaire non compensée par une angiogenèse insuffisante. Ainsi, en l'absence de réexpression endothéliale de *Wt1*, la masse de myocarde nécrosé et le remodelage ventriculaire gauche apparaissent déjà majorés sans avoir à ce stade de conséquence sur la fonction contractile cardiaque. Les analyses moléculaires ont identifié l'endothéline et l'angiopoietin-like 3 comme des gènes cibles de *Wt1* potentiellement intéressants.

A la phase de réparation de l'IDM, l'invalidation endothéliale de *Wt1* est à l'origine d'une hypoxie plus marquée, concomitante d'une moindre capacité de régénération vasculaire, se traduisant par un remodelage VG intense. Nous observons alors un phénotype plus franc d'insuffisance cardiaque avec hypertrophie cardiaque, dilatation et dysfonction contractile ventriculaire gauche.

Enfin, la procédure-leurre ne provoque pas de modification du phénotype échocardiographique à 3 semaines de l'IDM. De plus, nous démontrons l'innocuité de l'administration du tamoxifène sur la structure et la fonction cardiaque. Ainsi, les différences observées sont liées à la ligation coronaire et/ou à la modification de l'expression de *Wt1* et non à un facteur confondant.

DISCUSSION

Wt1 est un facteur transcriptionnel déterminant dans le contrôle de la prolifération, de la survie et de la différenciation cellulaire. Pendant la vie embryonnaire, il est impliqué dans l'organogenèse cardiovasculaire via un contrôle de la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules épocardiques, à l'origine de nombreuses populations cellulaires cardiaques. Ses propriétés pro-angiogéniques sont connues pendant l'embryogenèse mais également dans la tumorigenèse à l'âge adulte. Notre équipe a montré que *Wt1* est exprimé en post-IDM dans les cellules endothéliales de la zone bordant le myocarde nécrosé, et colocalisé avec des facteurs angiogéniques, témoignant d'un probable rôle dans la néovascularisation et la réparation cardiaque post-IDM (Wagner K-D et al., 2002). Nous nous sommes donc intéressés à la fonction du gène *Wt1* dans l'endothélium coronaire en post-IDM. L'utilisation d'un modèle murin d'inactivation conditionnelle du gène et spécifique aux cellules endothéliales a permis de s'affranchir de la létalité d'une inactivation constitutionnelle de *Wt1*.

Ce travail a montré que l'expression endothéliale de *Wt1* n'est pas nécessaire au fonctionnement cardiaque dans des conditions normales, ce que corrobore sa faible expression dans les cellules endothéliales du cœur adulte sain. A l'inverse, l'inactivation de *Wt1* est responsable d'anomalies structurelles et fonctionnelles cardiaques apparaissant précocement dans le post-IDM, témoignant de l'importance de la réexpression du gène pour une réparation cardiaque de qualité.

A la phase aiguë de l>IDM, l'incapacité des cellules endothéliales coronaires à réexprimer *Wt1* est responsable d'une hypoxie myocardique plus marquée, manifestée par l'expression augmentée de *Hif-1 α* . L'augmentation de *Hif-1 α* est un des facteurs déterminant la réactivation épocardique en post-IDM (Wagner KD et al., 2003). A cette phase de la réparation post-IDM, le myocarde est déjà habituellement le siège d'un infiltrat inflammatoire associé à des vaisseaux en formation (Dum SM et al., 2015). Pourtant, nous constatons une densité vasculaire coronaire plus faible dans le groupe de souris ne réexprimant pas *Wt1*, témoignant du rôle pro-angiogénique de *Wt1* (Wagner KD et al., 2014). La conséquence fonctionnelle logique est l'expansion de la zone nécrotique par mort des cardiomyocytes hibernants insuffisamment perfusés, entretenant les phases

inflammatoire et proliférative de la réparation cardiaque. L'hypertrophie cardiaque débutante majore cette hypoxie tissulaire. Le remodelage ventriculaire gauche débutant observé chez nos souris invalidées pour *Wt1* vise à compenser la perte des cardiomyocytes, et se manifeste par une dilatation ventriculaire gauche (phénomène de Starling destiné à conserver un débit cardiaque suffisant) et une hypertrophie des cardiomyocytes survivants (moins nombreux).

Les expériences de clonage et de transfection ont identifié l'endothéline et l'angiopoietin-like 3 comme des cibles directes de *Wt1*, dont l'expression est diminuée en phase aiguë du post-IDM en l'absence de réexpression de *Wt1*. L'angiopoietine-like 3 permet l'adhésion et la migration des cellules endothéliales, nécessaires à l'angiogenèse (Camenisch G et al, 2002). L'endothéline 1 est un neuropeptide impliqué dans le contrôle du tonus vasomoteur et de la prolifération cellulaire. Sa sécrétion par l'endothélium vasculaire augmente dans l>IDM. Son rôle vasomoteur est déterminé par le type de récepteur activé : vasoconstriction pour le récepteur à l'endothéline A situé au niveau des fibres musculaires lisses vasculaires, et vasodilatation par liaison au récepteur endothélial de type B. Ainsi, une invalidation endothéliale de *Wt1* sera à l'origine d'une baisse du signal vasodilatateur et d'une plus faible prolifération des cellules endothéliales. Ces deux évènements sont délétères aux processus d'angiogenèse et de réparation cardiaque. Comme les analyses ont été réalisées à partir d'ARN extrait de cœur entier, il est possible que d'autres gènes cibles importants n'aient pas été identifiés, leur différentiel d'expression en fonction de *Wt1* n'étant significatif qu'au sein d'une population sélectionnée de cellules endothéliales.

A la phase de réparation de l>IDM, l'absence de réexpression de *Wt1* est responsable d'un remodelage ventriculaire gauche plus sévère. En effet, les processus pathologiques déjà observés en phase aiguë de l>IDM se sont poursuivis et aggravés, entretenus par l'hypoxie tissulaire. Tout d'abord, l'inactivation endothéliale de *Wt1* réduit l'angiogenèse post-IDM, aggravant l'hypoxie tissulaire secondaire à l'occlusion coronaire. L'ischémie du myocarde encore vivant est amplifiée par l'hypertrophie cardiomyocytaire réactionnelle à l>IDM. L'expansion de la zone nécrosée est inéluctable en l'absence d'une néovascularisation de qualité, se traduisant par une augmentation de la taille de l>IDM. Un véritable cercle vicieux se forme alors, la nécrose myocardique plus importante majorant les contraintes hémodynamiques sur le myocarde sain et aggravant le remodelage cardiaque. Ensuite, la réparation cardiaque ne peut se faire correctement en l'absence

d'un soutien vasculaire de qualité, conséquence de l'inactivation de *Wt1*. La fibrose interstitielle myocardique exacerbée est liée à une réponse inflammatoire moins bien contrôlée dans l'espace (IDM plus étendu) et dans le temps. Ces mécanismes participent à majorer le remodelage cardiaque en post-IDM chez les souris invalidées pour *Wt1*. Ainsi, l'hypertrophie cardiaque, la dilatation et la dysfonction contractile ventriculaire gauche plus sévères révèlent un phénotype plus franc d'insuffisance cardiaque en l'absence de réexpression de *Wt1*.

Parmi les gènes étudiés, seuls *Plgf* et *Cited1* voient leur expression augmenter à la phase de réparation de l'IDM en cas d'inactivation endothéliale de *Wt1*. *Plgf* code pour un facteur angiogénique activant le signal de VEGF. *Cited1* code pour une protéine qui intervient dans la voie de signalisation de TGF β et active la survie cellulaire endothéliale. Ces deux gènes semblent donc favoriser l'angiogenèse en post-IDM. A la phase de réparation, l'approche choisie n'a pas consisté à rechercher des cibles directes de *Wt1*. Le différentiel d'expression observé pour ces deux gènes peut donc traduire des mécanismes de compensation en réponse à l'inactivation de *Wt1*, et non pas l'action directe de *Wt1* sur ses cibles génomiques. De plus, les mesures d'expression des gènes ont été réalisées à partir d'ARN extrait à partir de cœur entier, comme à la phase aiguë. Il est donc possible que certaines différences d'expression n'aient pas été identifiées. Pour faire face à ces limites, nous projetons d'utiliser une lignée de souris triple-transgéniques où l'expression de la protéine fluorescente verte GFP est soumise au contrôle du promoteur endogène *Wt1* (*Wt1-GFP^{ki};Tie2-Cre-ERT²;Wt1loxP^{+/-}*). L'utilisation d'expériences de FACS permettra de sélectionner les cellules réexprimant *Wt1* (GFP positives), afin d'identifier les gènes dont l'expression est modifiée par *Wt1* au cours de la réparation post-IDM.

Notre travail souligne l'importance de l'endothélium coronaire et de la réexpression de *Wt1* dans la réparation cardiaque en post-IDM. Son inactivation conduit à un phénotype d'insuffisance cardiaque, conséquence d'un remodelage ventriculaire gauche exacerbé. En effet, l'endothélium possède des propriétés anti-inflammatoires, contrôle la perméabilité vasculaire (tonus vasomoteur régulé par la sécrétion de médiateurs vasoactifs tels le NO ou l'endothéline, migration transendothéliale des cellules inflammatoires) et permet la néovascularisation en post-IDM. *Wt1* participe au contrôle de ces fonctions endothéliales et apparaît donc comme un acteur majeur de l'homéostasie vasculaire et tissulaire, et de la réparation cardiaque en post-IDM (McCarty G et al., 2011 ; Sciesielski LK et al., 2010). Une altération de ces fonctions, ou dysfonction endothéliale,

est un marqueur de la maladie athéromateuse et un facteur de mauvais pronostic à tous les stades de la pathologie (Lerman A et al., 1998 ; Fichtlscherer S et al., 2004).

De par ses effets dans la réparation cardiaque, Wt1 apparait être une cible très intéressante dans le traitement de l'IDM. En conséquence, la compréhension des mécanismes médiés par Wt1 en post-IDM est essentielle afin d'envisager des thérapeutiques ciblées dans la cardiopathie ischémique stimulant l'expression du gène.

PARTIE III : *Cyp51*

Cette partie a pour objet de présenter les résultats de notre travail, de façon à identifier les conséquences cardiaques structurelles et fonctionnelles d'une délétion endothéliale de *Cyp51* dans des conditions physiologiques et en post-IDM.

Les analyses réalisées sur les souris à la phase basale (avant ligature coronaire) ont révélé des différences phénotypiques significatives, nous poussant à une analyse plus précoce des effets de la délétion endothéliale de *Cyp51* et à mettre de côté le modèle d'IDM. Ainsi, les résultats sont organisés en deux parties correspondant aux conditions basales (en l'absence d'IDM) :

- Condition basale précoce après recombinaison génétique : pas de lésion myocardique (pas de ligature coronaire), 3 jours après l'induction éventuelle de la délétion de *Cyp51*,
- Condition basale tardive après recombinaison : pas de lésion myocardique (pas de ligature coronaire), 7 jours après l'induction éventuelle de la délétion.

1. Condition basale précoce (3 jours après la recombinaison)

a. Analyses histologiques

i. Poids du cœur

Il n'existe pas de différence significative du ratio poids du cœur/poids corporel entre nos deux groupes d'animaux (*Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51* + huile, n = 4 vs *Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51* + tamoxifène, n = 4, respectivement 5.92 ± 0.27 mg/g vs 5.59 ± 0.31 mg/g, p = 0.41).

ii. Fibrose myocardique interstitielle

La figure 18 présente une comparaison des taux de collagène dans le tissu interstitiel myocardique de nos groupes d'animaux en fonction de l'expression de *Cyp51*. Il n'existe pas de différence significative à 3 jours de l'inactivation éventuelle de *Cyp51*.

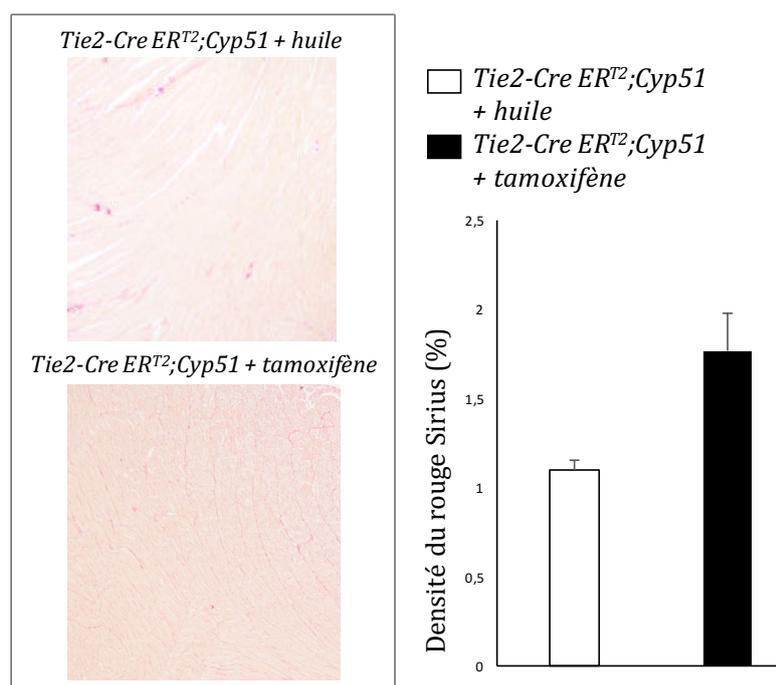


Figure 18 : Pas de modification précoce du taux de collagène interstitiel myocardique après inactivation endothéliale de *Cyp51*. Sections de cœur colorées au rouge Sirius observées en microscopie optique en lumière polarisée en grossissement x5. Souris *Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51* + huile, n = 4 et *Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51* + tamoxifène, n = 4. Données exprimées en moyenne \pm écart-type de la moyenne.

iii. Fibrose et dimensions vasculaires

La figure 19 présente une comparaison du taux de collagène vasculaire et périvasculaire coronaire dans nos groupes d'animaux en fonction de l'expression de *Cyp51*. Dès le troisième jour après l'inactivation de *Cyp51*, le taux de collagène est significativement augmenté dans la paroi vasculaire et les septa périvasculaires. Il est intéressant de noter que nous n'avons pas observé d'infiltrat de cellules inflammatoires sur les coupes étudiées (résultats non montrés).

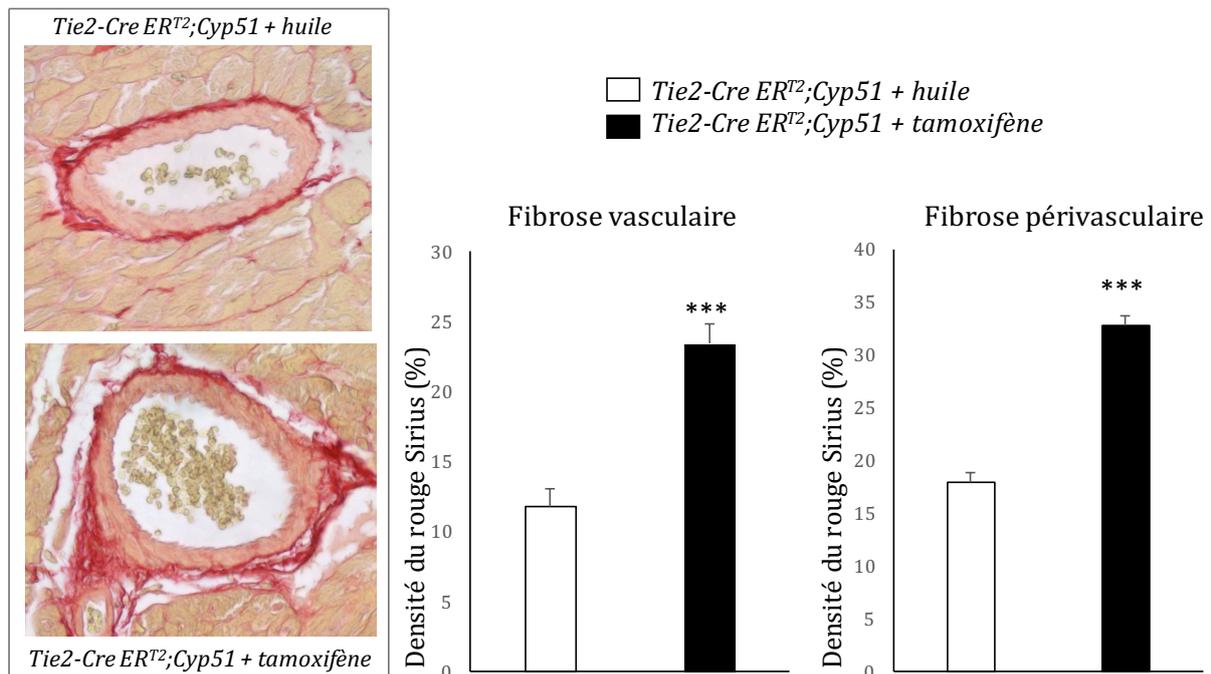


Figure 19 : Taux de collagène vasculaire et périvasculaire plus important au troisième jour après inactivation endothéliale de *Cyp51* (souris *Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51 + tamoxifène*, $n = 4$ vs Souris *Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51 + huile*, $n = 4$). Sections de cœur colorées au rouge Sirius observées en microscopie optique en lumière polarisée en grossissement $\times 40$ et montrant des vaisseaux coronaires. Données exprimées en moyenne \pm écart-type de la moyenne. *** $p < 0.001$.

L'épaisseur de la paroi vasculaire et la surface de section vasculaire ne sont pas significativement différentes en fonction de l'expression endothéliale de *Cyp51* dans nos deux groupes d'animaux (*Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51 + huile* vs souris *Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51 + tamoxifène*, $n = 4$ dans chaque groupe).

Cependant, il existe une tendance à l'épaississement pariétal et à une plus grande surface de section vasculaire en cas d'inactivation de *Cyp51* : l'épaisseur pariétale est mesurée à $7.12 \pm 0.64 \mu\text{m}$ et $8.88 \pm 0.63 \mu\text{m}$ respectivement dans le groupe contrôle et le groupe n'exprimant pas *Cyp51* ($p = 0.06$). De plus, la surface de section vasculaire est évaluée à $1015 \pm 212 \mu\text{m}^2$ et $1548 \pm 280 \mu\text{m}^2$ respectivement chez les animaux contrôles et ceux n'exprimant pas *Cyp51* ($p = 0.16$).

b. Analyses échocardiographiques

L'inactivation endothéliale de *Cyp51* n'entraîne pas de modification précoce des volumes ventriculaires gauches ou de la fonction contractile VG, comme illustré dans la figure 20.

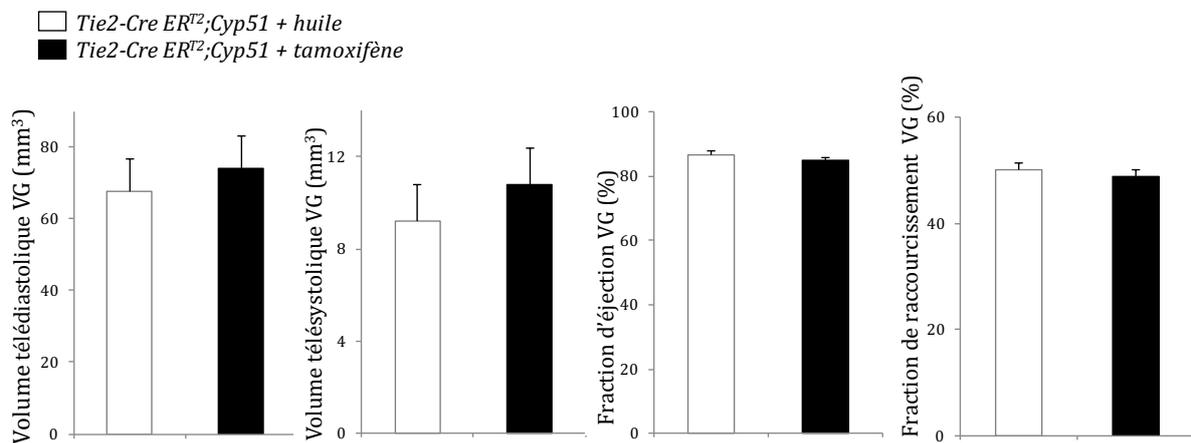


Figure 20 : Absence d'effet précoce de l'inactivation de *Cyp51* sur les paramètres échocardiographiques en condition basale précoce. Mesure des volumes ventriculaires gauches (VG), de la fraction d'éjection et de la fraction de raccourcissement VG. Souris Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51 + huile, $n = 4$ et Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51 + tamoxifène, $n = 4$. Données exprimées en moyenne \pm écart-type de la moyenne.

c. Analyses moléculaires : expression en ARN de gènes d'intérêt

Devant l'apparition précoce d'un phénotype pathologique chez les animaux présentant une invalidation endothéliale de *Cyp51*, nous nous sommes intéressés à certains gènes codant pour des protéines impliquées dans l'homéostasie de la cellule endothéliale, dans l'inflammation ou le remodelage matriciel extra-cellulaire.

Tout d'abord, il faut remarquer l'absence de différence significative d'expression en ARN de *Cyp51* entre nos deux groupes d'animaux : l'invalidation endothéliale de *Cyp51* s'accompagne d'une tendance à la diminution de l'expression du gène mesurée à partir d'ARN extrait de cœur entier (-23%, $p = 0.08$).

Nos analyses ont objectivé une diminution d'expression de gènes codant pour certaines enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol : *Sc4mol* (pour Sterol-C4-methyl oxidase, située en aval de *Cyp51*), *Sqle* (pour Squalene epoxidase, enzyme située en amont de *Cyp51*) (-25%, $p = 0.04$ et -60%, $p = 0.02$ respectivement). Cette différence d'expression n'était pas observée pour tous les gènes responsables de la synthèse du cholestérol (résultats non montrés).

Enfin, on observe une diminution de l'expression de *Connexine 43*, codant pour un composant des jonctions communicantes (-20%, $p = 0.04$).

Cadhérine-5 et *Pecam-1*, également impliquées dans les jonctions intercellulaires, ne voient pas leur expression changer précocement après l'invalidation endothéliale de *Cyp51*. Les variations d'expression des NO synthases (eNOS et iNOS) ne sont pas significatives dans ces conditions. De plus, on ne note pas de modification de l'expression de gènes codant pour les protéines des voies de Sonic hedgehog ou de CCM (Cerebral Cavernous Malformation), impliquées dans l'homéostasie cellulaire.

Ces résultats sont illustrés dans la figure 21.

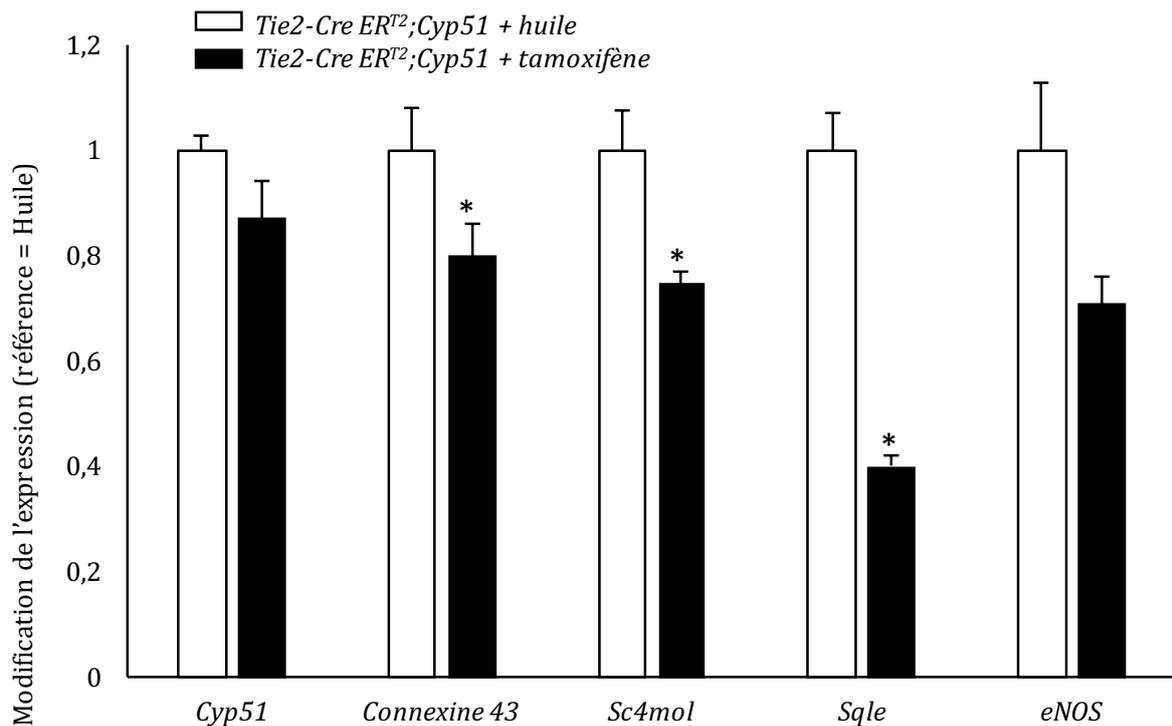


Figure 21 : Différentiel d'expression en ARN des gènes d'intérêt à 3 jours de l'inactivation de *Cyp51*. Expression du gène dans le groupe contrôle prise comme référence. Diminution significative de l'expression de *Sc4mol*, *Sqle*, et *Connexine 43*. Souris *Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51 + huile*, $n = 4$ et *Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51 + tamoxifène*, $n = 4$. Données exprimées en moyenne \pm écart-type de la moyenne. * $p < 0.05$.

En résumé, les analyses réalisées à la phase précoce après recombinaison génétique montrent que l'inactivation de *Cyp51* est responsable d'une fibrose localisée à la paroi vasculaire et dans l'espace périvasculaire coronaire, concomitante d'une tendance à l'augmentation de l'épaisseur pariétale et de la surface de section vasculaire. Les analyses moléculaires montrent une diminution d'expression de *Connexine 43*, codant pour des protéines des jonctions intercellulaires. A ce stade, aucun remodelage échocardiographique notable n'est observé.

2. Condition basale tardive (7 jours après la recombinaison)

a. Analyses histologiques

i. Poids du cœur

Le ratio poids du cœur/poids corporel est significativement augmenté pour les animaux n'exprimant pas *Cyp51* (*Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51* + tamoxifène, n = 4 vs *Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51* + huile, n = 6, respectivement 8.11 ± 0.40 mg/g vs 5.82 ± 0.33 mg/g, p=0.002).

ii. Fibrose myocardique interstitielle

La figure 22a présente une comparaison des taux de collagène dans le tissu interstitiel myocardique de nos animaux en fonction de l'expression de *Cyp51*. Il n'existe pas de différence significative entre nos deux groupes. Aucune majoration significative de la quantité de fibrose interstitielle myocardique n'est notée entre le troisième et le septième jour pour les souris contrôles ($1.12 \pm 0.05\%$ vs $1.51 \pm 0.25\%$, p=0.12) ou pour les souris n'exprimant pas *Cyp51* ($1.76 \pm 0.96\%$ vs $1.39 \pm 0.10\%$, p=0.42).

iii. Fibrose vasculaire et périvasculaire

La figure 22b présente une comparaison des taux de collagène vasculaire coronaire en fonction de l'expression de *Cyp51*. Il n'existe pas de différence significative entre nos deux groupes d'animaux.

Entre le troisième et le septième jour après recombinaison génétique, la quantité de fibrose vasculaire ne varie pas chez les souris n'exprimant pas *Cyp51* ($23.4 \pm 2.3\%$ vs $24.1 \pm 4.3\%$, p=0.95).

La figure 22c présente une comparaison des taux de collagène périvasculaire coronaire en fonction de l'expression de *Cyp51*. La fibrose périvasculaire est plus importante dans le groupe n'exprimant pas *Cyp51* en comparaison avec les souris contrôles.

Entre le troisième et le septième jour après la recombinaison génétique éventuelle, aucune modification de la quantité de fibrose périvasculaire n'est notée pour les souris n'exprimant pas *Cyp51* ($32.7 \pm 1.4\%$ vs $34.9 \pm 2.8\%$, p=0.88).

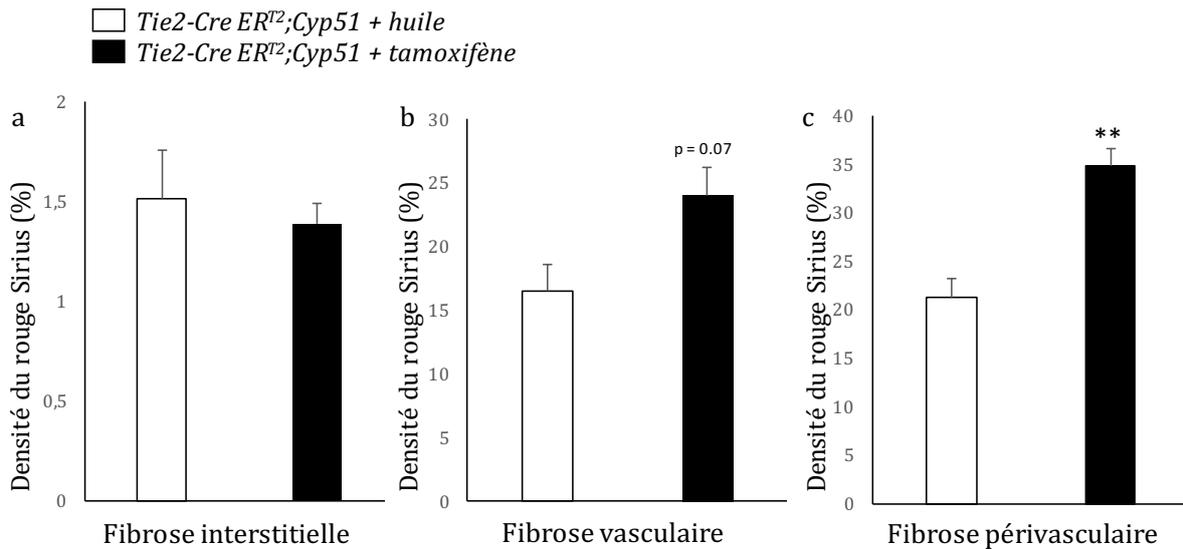


Figure 22 : Mesure du taux de collagène tissulaire myocardique dans les deux groupes de souris au septième jour après invalidation endothéliale de Cyp51 (souris Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51 + tamoxifène, n = 4 vs souris Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51 + huile, n = 3). a) Taux de collagène interstitiel myocardique inchangé. b) Tendence à un taux de collagène vasculaire supérieur dans le cœur des souris Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51 + tamoxifène. c) Taux de collagène périvasculaire plus important en cas d'invalidation de Cyp51. Données exprimées en moyenne ± écart-type de la moyenne. ** p<0.01.

iv. Dimensions vasculaires

L'épaisseur de la paroi vasculaire et la surface de section vasculaire ne sont pas significativement différentes dans nos deux groupes d'animaux (Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51 + huile, n = 3 vs souris Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51 + tamoxifène, n = 4) 7 jours après l'invalidation éventuelle de Cyp51. En effet, l'épaisseur pariétale est mesurée à $8.38 \pm 1.51 \mu\text{m}$ et $7.65 \pm 0.61 \mu\text{m}$ respectivement dans le groupe contrôle et le groupe n'exprimant pas Cyp51 (p=0.62). De plus, la surface de section vasculaire est évaluée à $1250 \pm 297 \mu\text{m}^2$ et $1297 \pm 236 \mu\text{m}^2$ respectivement chez les animaux contrôle et induits (p=0.90). Aucune évolutivité n'est notée pour ces deux paramètres entre le troisième et le septième jour.

b. Immunomarquage de Pecam-1

La figure 23 illustre une diminution du marquage membranaire endothélial de Pecam-1 dans le tissu myocardique de souris *Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51* + tamoxifène en comparaison avec les souris contrôles.

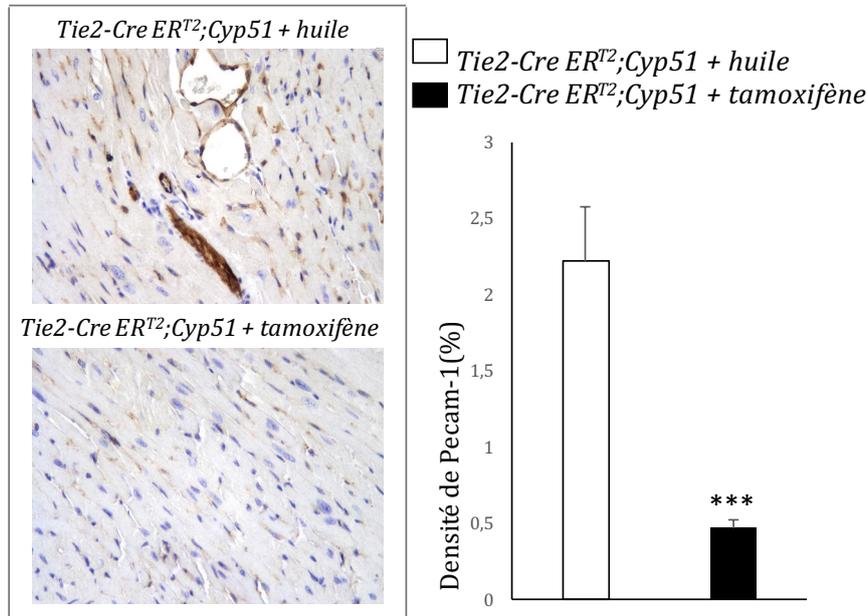


Figure 23 : Marquage membranaire endothélial coronaire de Pecam-1 plus faible à 7 jours de l'inactivation de *Cyp51* (*Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51 + tamoxifène*, $n = 5$, vs *Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51 + huile*, $n = 4$). Immunomarquage et quantification de la densité de Pecam-1. Données exprimées en moyenne \pm écart-type de la moyenne. *** $p < 0.001$.

c. Coloration au Bleu d'Evans

Le phénotype histologique observé fait s'interroger sur l'intégrité membranaire de la cellule endothéliale en cas d'inactivation de *Cyp51*, c'est-à-dire de diminution de la synthèse du cholestérol. Aussi, l'expérience de coloration au Bleu d'Evans a permis d'évaluer la perméabilité des membranes endothéliales coronaires.

La fluorescence du Bleu d'Evans dans les tissus myocardiques est plus importante pour les souris n'exprimant pas *Cyp51*, en comparaison avec les animaux contrôles (Figure 24). Ce résultat traduit une perméabilité vasculaire accrue en cas d'inactivation endothéliale de *Cyp51*.

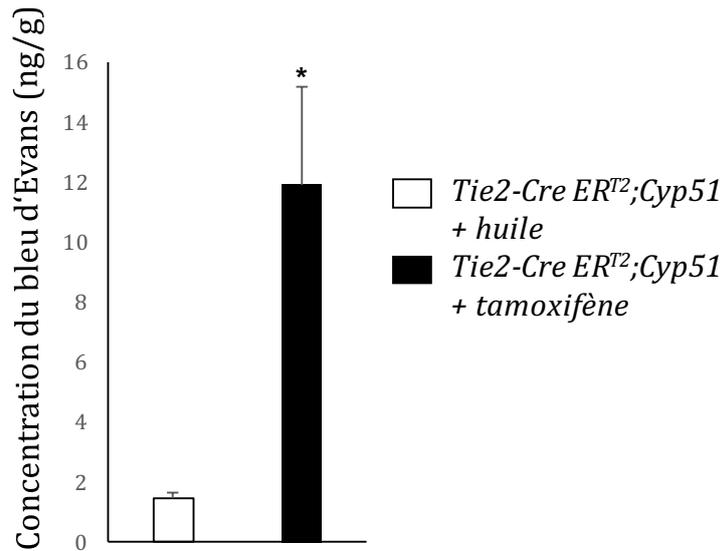


Figure 24 : Perméabilité vasculaire augmentée en cas d'inactivation endothéliale de *Cyp51*, et caractérisée par une fuite extra-capillaire précoce du Bleu d'Evans. Quantification de la concentration tissulaire du Bleu d'Evans par spectrophotométrie. Souris *Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51 + huile*, $n = 4$ et *Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51 + tamoxifène*, $n = 4$. Données exprimées en moyenne \pm écart-type de la moyenne. * $p < 0.05$.

d. Analyse en microscopie électronique

Les analyses préliminaires menées sur 3 échantillons de chaque groupe montrent l'absence d'infiltrat inflammatoire sur les régions étudiées.

Les souris invalidées pour *Cyp51* (*Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51 + tamoxifène*) présentent un endothélium capillaire coronaire épaissi et déstructuré, à l'inverse des souris contrôles (*Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51 + huile*), comme illustré dans la figure 25.

De plus, l'espace péri-vasculaire paraît plus important en l'absence d'expression endothéliale de *Cyp51*.

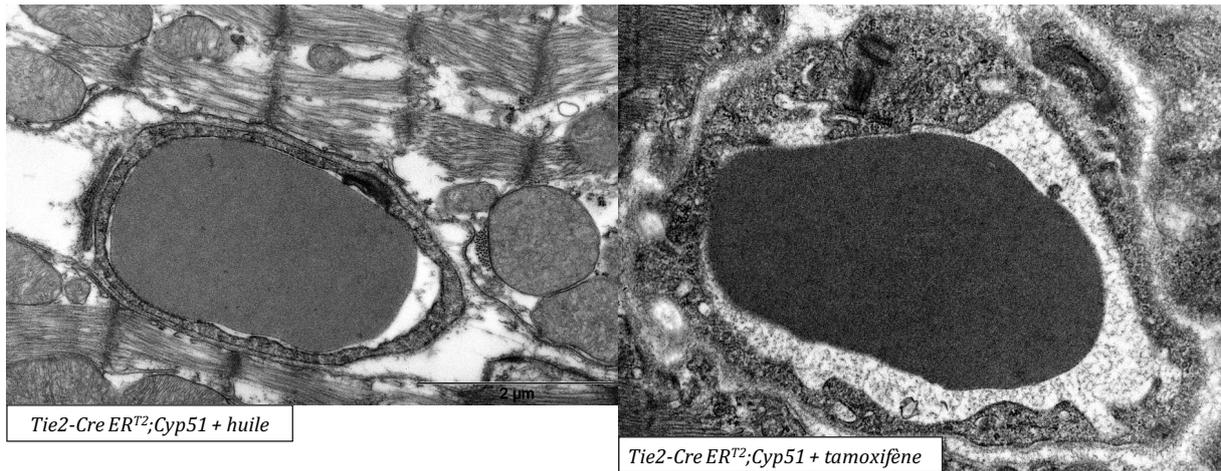


Figure 25 : Observation de vaisseaux capillaires coronaires en microscopie électronique. Aspect désorganisé et épaissi de l'endothélium coronaire en cas d'inactivation de *Cyp51*.

e. Analyses échocardiographiques

La figure 26 compare les paramètres échocardiographiques des deux groupes d'animaux en fonction de l'expression de *Cyp51*.

A 7 jours de l'inactivation endothéliale de *Cyp51*, on observe un remodelage ventriculaire gauche important, caractérisé par une dilatation significative (volume télédiastolique et volume télésystolique VG) et une altération franche de la fonction systolique ventriculaire gauche (fraction d'éjection, fraction de raccourcissement).

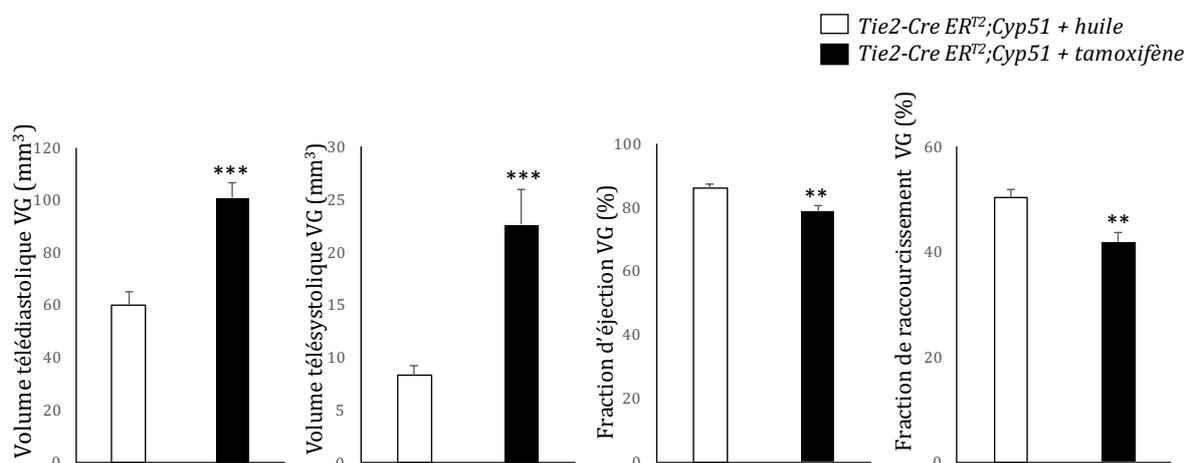
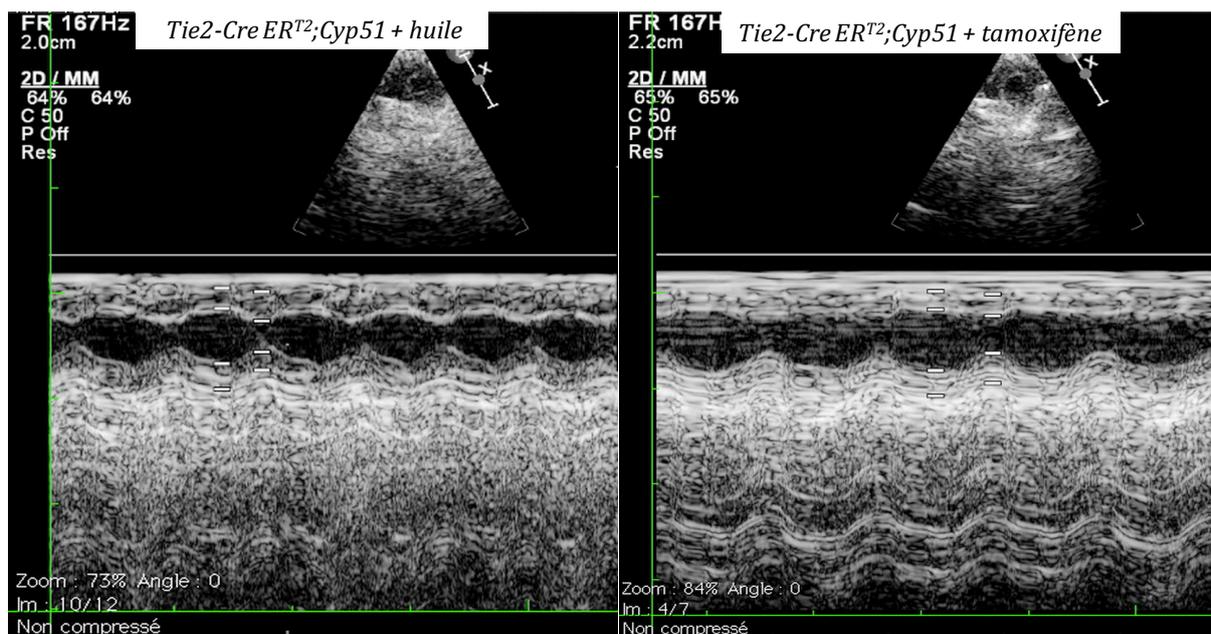


Figure 26 : Dilatation et dysfonction systolique ventriculaire gauche (VG) à 7 jours de l'inactivation de Cyp51 (souris Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51 + tamoxifène, n = 20 vs souris Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51 + huile, n = 15). Mesure des volumes ventriculaires gauches (VG), de la fraction d'éjection et de la fraction de raccourcissement VG sur une coupe parasternale petit axe. Données exprimées en moyenne ± écart-type de la moyenne. ** p<0.01 et *** p<0.001.

f. Analyses moléculaires : expression en ARN de gènes d'intérêt

Comme à la phase précoce, nous nous sommes intéressés à des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'homéostasie endothéliale (adhésion, prolifération et survie cellulaire), la synthèse du cholestérol, le processus inflammatoire ou le remodelage matriciel. Les résultats sont présentés dans la figure 27.

Il n'est pas retrouvé de différence d'expression de *Cyp51* entre nos deux groupes d'animaux. Nos analyses par RT-qPCR ont objectivé une augmentation de l'expression de *Sc4mol* et *Sqle*.

De plus, l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'inflammation est augmentée chez les animaux invalidés pour *Cyp51* : CD68 et F4/80 marquant l'activation des macrophages, CD69 et CD335 celle des cellules NK, iNOS qui augmente la synthèse de cytokines pro-inflammatoires.

En l'absence de *Cyp51*, l'expression de *CD11b* est augmentée. CD11b est une intégrine exprimée par les cellules endothéliales et permettant leur interaction avec les monocytes circulants, marqueur de l'activation de l'endothélium afin de permettre la transmigration des monocytes circulants.

Par ailleurs, on note une tendance à l'augmentation de la synthèse de eNOS en cas d'invalidation de *Cyp51* (augmentation de 57%, $p = 0.06$).

Ensuite, plusieurs gènes codant pour des protéines des jonctions cellulaires voient leur expression diminuer en parallèle de l'inactivation de *Cyp51* : Connexine 43 impliquée dans les jonctions communicantes et PECAM-1, indispensable à l'adhésion cellulaire. On observe une tendance à la diminution de 65% de l'expression de *ZO1* (Zona Occludens 1), codant pour un composant majeur des jonctions serrées ($p = 0.08$).

Enfin, nos analyses montrent une diminution de Heg (Heart of glass), régulateur de la voie de CCM. L'expression de *CCM 1, 2* et *3* n'est pas modifiée en l'absence de *Cyp51*. La voie de CCM promeut la quiescence de l'endothélium via une action anti-angiogénique, anti-proliférative et anti-migratrice par stabilisation des jonctions cellulaires endothéliales. De la même façon, le gène codant pour le récepteur Smo (Smoothened) de Sonic hedgehog voit son expression augmenter en cas d'invalidation de *Cyp51*, alors que l'expression de Shh n'est pas modifiée.

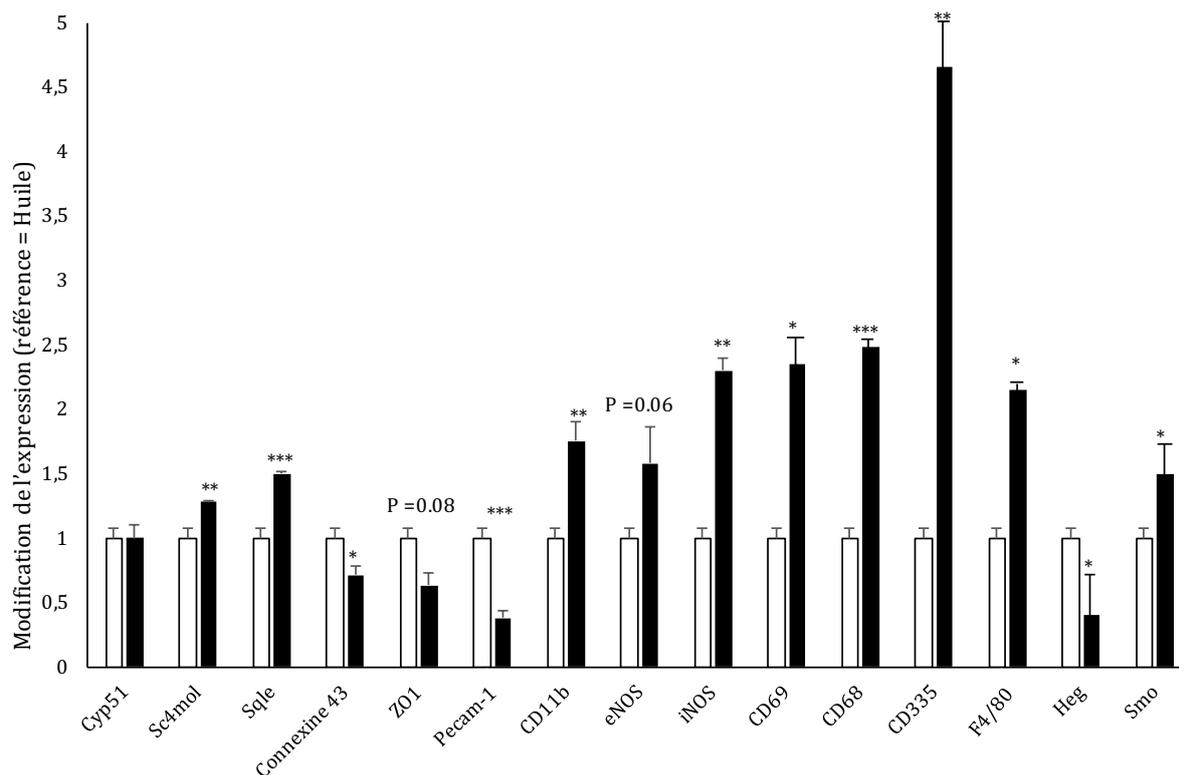


Figure 27 : Différentiel d'expression en ARN des gènes d'intérêt à 7 jours de l'inactivation de *Cyp51*. Expression du gène dans le groupe contrôle prise comme référence. Souris *Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51 + huile*, n = 6 et *Tie2-Cre ER^{T2};Cyp51 + tamoxifène*, n = 4. Données exprimées en moyenne \pm écart-type de la moyenne. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Ainsi, un phénotype d'insuffisance cardiaque apparaît entre le troisième et le septième jour après inactivation de *Cyp51*, caractérisé par une hypertrophie excentrique et une dysfonction systolique ventriculaire gauche. Le taux de collagène myocardique n'est augmenté qu'en périvasculaire coronaire, en parallèle d'une augmentation de la perméabilité membranaire vasculaire, d'une activation de l'endothélium vasculaire (en analyse moléculaire) et d'une désorganisation de l'endothélium coronaire (en analyse ultrastructurale). Aucun infiltrat immunitaire n'est observé à ce stade, bien que l'analyse moléculaire plaide pour une activation de la réaction inflammatoire chez les animaux n'exprimant pas *Cyp51*. L'immunomarquage de Pecam-1 confirme les résultats de l'analyse ARN, à savoir une diminution de l'expression du gène en cas d'inactivation de *Cyp51*. De même, l'expression de *ZO1* et *Connexine 43*, codant pour des composants des autres jonctions intercellulaires, est significativement diminuée en l'absence de *Cyp51*.

En résumé, notre recherche a montré que l'expression endothéliale de *Cyp51* est nécessaire à l'organisation structurelle et au fonctionnement normal du cœur, en l'absence de toute lésion myocardique.

La délétion endothéliale de *Cyp51* est rapidement à l'origine d'un épaissement pariétal vasculaire, d'une désorganisation de l'endothélium coronaire, d'une augmentation de la perméabilité vasculaire associée à une fibrose vasculaire et périvasculaire localisée. Le phénotype n'apparaît que plus tardivement, marqué par une dilatation, une hypertrophie et une dysfonction ventriculaires gauches significatives. A ce stade tardif, l'analyse moléculaire révèle une diminution d'expression des protéines impliquées dans les jonctions intercellulaires communicantes, serrées et adhérentes, une augmentation des gènes pro-inflammatoires ou codant pour des marqueurs de l'activation endothéliale.

DISCUSSION

Cyp51 code pour une enzyme de la voie de synthèse du cholestérol, composant essentiel des membranes cellulaires et élément indispensable à certaines voies de signalisation intracellulaire (Shh et acide rétinoïque). Pendant la vie embryonnaire, *Cyp51* est indispensable à l'angiogenèse coronaire et l'organogenèse cardiaque. En effet, la délétion constitutionnelle du gène est responsable d'anomalies ventriculaires et coronaires et d'une létalité embryonnaire chez la souris. Ces constatations en font un gène intéressant de la régulation de l'homéostasie des cellules cardiaques. De même, *Cyp51* pourrait avoir un rôle important dans le contrôle de l'angiogenèse en post-IDM, où le programme génétique embryonnaire est réactivé. Cependant, son rôle dans la fonction cardiaque et l'angiogenèse à l'âge adulte n'a pas encore été étudié. Ainsi, notre travail a cherché à préciser les conséquences structurelles et fonctionnelles cardiaques d'une invalidation endothéliale de *Cyp51* chez la souris adulte saine et en post-IDM.

Notre étude a prouvé la nécessité d'une expression endothéliale de *Cyp51* pour assurer une structure et un fonctionnement cardiaque normaux dans des conditions physiologiques. La constatation d'un remodelage ventriculaire gauche majeur après délétion de *Cyp51* dans les conditions basales a fait délaisser transitoirement le modèle d>IDM, afin de mieux comprendre les mécanismes en cause en l'absence de lésion myocardique.

Tout d'abord, la diminution de la synthèse du cholestérol dans les cellules endothéliales des animaux induits pour *Cyp51* perturbe l'organisation membranaire et les jonctions cellulaires. La première anomalie moléculaire observée est une diminution de l'expression de *Connexine 43* dans le tissu cardiaque. Plus tardivement après la recombinaison génétique, l'expression de *ZO1* et celle de *Pecam-1* décroissent à leur tour. Ces trois gènes codent pour des protéines indispensables aux jonctions cellulaires assurant la cohésion anatomique et fonctionnelle des tissus. Connexine 43 est un composant des jonctions communicantes, permettant le couplage métabolique et électrique. *ZO1* participe à la composition des jonctions serrées, qui assurent l'étanchéité de la barrière endothéliale et autorisent le rôle de filtre sélectif de l'endothélium. Enfin, *Pecam-1* intervient dans les jonctions adhérentes, jonctions nécessaires à la cohésion

tissulaire, à l'ancrage intercellulaire (via les cadhérines), à l'ancrage des cellules à la MEC (via les intégrines), et aux interactions cellulaires (via les sélectines). En parallèle, l'invalidation endothéliale de *Cyp51* se manifeste par une augmentation majeure de la perméabilité vasculaire, probablement à l'origine de la fibrose vasculaire et périvasculaire observée. Au stade précoce, aucun phénotype échocardiographique n'est retrouvé. Ces résultats montrent que l'invalidation de *Cyp51* est responsable d'une désorganisation de la membrane cellulaire endothéliale, avec perte des jonctions intercellulaires et de l'étanchéité vasculaire.

Plusieurs mécanismes physiopathologiques en lien avec une invalidation de *Cyp51* peuvent expliquer ces anomalies. La délétion du gène est connue pour être responsable d'une diminution de la synthèse du cholestérol, rendu ainsi moins disponible pour participer à la composition des membranes cellulaires, et d'une augmentation des métabolites intermédiaires (oxystérols) potentiellement toxiques (Keber R et al., 2011). Il est admis que la composition membranaire détermine le transport lipidique, l'adhésion cellulaire, la fonction des canaux ioniques et des récepteurs impliqués dans la transduction du signal intracellulaire, les interactions et la mobilité cellulaire (Lee AG 2004 ; Scaglia N et Igal RA, 2005). Ainsi, le défaut de synthèse du cholestérol peut modifier la fonction de la cellule endothéliale : un défaut en cholestérol "actif" membranaire perturbe l'organisation des protéines membranaires physiologiquement regroupées en radeaux lipidiques riches en cholestérol et indispensables à la transduction du signal (Lange Y et Steck TL, 2016). De plus, un déficit membranaire en cholestérol augmente la rigidité cellulaire, diminue la mobilité cellulaire, modifiant ainsi les propriétés de l'endothélium (Ayee MA et Levitan I, 2016). De façon intéressante, l'accumulation membranaire d'oxystérols hydrophobes (lanostérol et métabolites d'amont) a les mêmes conséquences que le défaut en cholestérol (Ayee MA et Levitan I, 2016). La concentration intracellulaire élevée de ces métabolites s'explique par l'augmentation compensatrice de l'expression des gènes codant pour les enzymes de la synthèse du cholestérol (dont *Sc4mol* et *Sqle*), confirmée par nos analyses moléculaires dès le septième jour après recombinaison génétique. Par ailleurs, une perturbation de la voie de *Shh* ne semble pas envisagée. En effet, l'expression de *Shh* et des autres gènes impliqués dans sa voie de signalisation n'est pas modifiée dans notre travail, hormis une élévation modérée de *Smo*. Des analyses moléculaires ciblées sur les cellules endothéliales pourraient confirmer ces résultats.

Ces modifications dans la composition membranaire des cellules endothéliales peuvent donc expliquer les anomalies observées des jonctions cellulaires, et modifier la perméabilité vasculaire.

Ensuite, les analyses ultrastructurelles montrent une désorganisation et un épaississement de l'endothélium coronaire. Parallèlement, l'augmentation de l'expression de *CD11b* et la diminution de l'expression de *Heg* (qui assure normalement la quiescence des cellules endothéliales) témoignent d'une activation endothéliale au septième jour après la recombinaison génétique. Cette activation endothéliale peut générer des dommages cellulaires significatifs, perturbant le fonctionnement endothélial normal.

Enfin, le remodelage cardiaque, plus tardif, est caractérisé par une dilatation, une hypertrophie et une dysfonction contractile ventriculaires gauches. Il est nécessaire de comprendre comment une modification dans la synthèse du cholestérol peut entraîner un tel phénotype échocardiographique.

Tout d'abord, une diminution de la concentration membranaire cellulaire en cholestérol diminue la solubilité et la diffusion de l'oxygène au travers de la membrane (Möller MN et al., 2016). Cette réduction de la concentration intracellulaire en oxygène peut avoir des conséquences sur le métabolisme et le fonctionnement endothélial. Il en est de même avec les autres cellules cardiaques, en particulier les cardiomyocytes. En effet, les cardiomyocytes hypoxiques modifient leur métabolisme énergétique, s'orientant vers la glycolyse moins consommatrice en oxygène mais dont le rendement énergétique est moindre (Fillmore et al., 2014 ; Paul et al., 2014). De plus, l'augmentation précoce de la perméabilité vasculaire observée dans cette étude est à l'origine d'un oedème et d'une fibrose périvasculaire, majorant la distance entre cellules endothéliales et cardiomyocytes. De ce fait, la diffusion et le transport des nutriments et de l'oxygène sont rendus moins performants, perturbant le métabolisme et la fonction des cardiomyocytes. De même, les cellules endothéliales sont chargées de l'approvisionnement des cellules cardiaques en nutriments. Une perturbation de l'organisation membranaire et une anomalie des jonctions cellulaires vont avoir un impact sur le transport et la diffusion de ces molécules indispensables à la survie et à la fonction des cardiomyocytes.

Ensuite, les interactions indispensables entre cellules endothéliales et cardiomyocytes régissent le fonctionnement de ces deux populations cellulaires. Ainsi, l'activation endothéliale et la désorganisation des jonctions cellulaires peuvent modifier la fonction

endothéliale. Un dysfonctionnement endothélial aura des conséquences majeures sur les cardiomyocytes. En effet, la cellule endothéliale sécrète des facteurs paracrines essentiels à la survie des cardiomyocytes (Kuramochi Y et al., 2004). De plus, l'endothélium module la contractilité des cardiomyocytes en stimulant la synthèse de NO par la eNOS cardiomyocytaire, à l'origine d'effets inotropes négatifs c'est-à-dire diminuant la contractilité cardiaque, et d'une hypertrophie cardiaque (Champion HC et al., 2004 ; Lemmens K et al., 2004). L'activation endothéliale stimule l'expression de eNOS, confirmée par les analyses moléculaires au septième jour après recombinaison génétique, pouvant induire une dysfonction contractile ventriculaire gauche et une hypertrophie cardiaque. Par ailleurs, la cellule endothéliale permet l'organisation des cardiomyocytes en un syncytium fonctionnel en favorisant la synthèse cardiomyocytaire de Connexine 43. Ce travail a objectivé une diminution précoce de l'expression de *Connexine 43*, analyse réalisée à partir d'ARN extrait de cœur entier. Il est ainsi difficile d'affirmer si cette modification est d'origine endothéliale, traduisant la désorganisation des jonctions cellulaires, ou alors cardiomyocytaire et correspondant à la perte des signaux trophiques endothéliaux à destinée cardiomyocytaire. Une analyse réalisée à partir de cellules endothéliales sélectionnées par expérience de FACS pourra répondre à cette question. La perte des jonctions communicantes serait certainement responsable d'une baisse de la contractilité myocardique, par altération de la coordination dans la contraction des cardiomyocytes.

Enfin, le remodelage cardiaque pathologique observé en cas d'invalidation endothéliale de *Cyp51* ne peut être simplement expliqué par une inflammation et une fibrose myocardiques accrues. En effet, au septième jour après la recombinaison génétique, le tissu myocardique est indemne de toute fibrose interstitielle ou d'infiltrat de cellules inflammatoires. Pourtant, l'expression de gènes pro-inflammatoires est augmentée au même moment, et non initialement. Cette observation pourrait découler de l'activation endothéliale et des dommages cellulaires causés par l'invalidation de *Cyp51*, et non traduire leur origine physiopathologique. Des analyses à un délai ultérieur après la recombinaison génétique seront intéressantes pour préciser la présence éventuelle d'un infiltrat inflammatoire dans le myocarde des souris n'exprimant pas *Cyp51*. Cependant, il est pour le moment impossible de retenir cette hypothèse, pourtant séduisante, incriminant une baisse de la compliance myocardique et l'augmentation des contraintes hémodynamiques du fait d'une fibrose interstitielle myocardique pathologique.

En conclusion, l'invalidation endothéliale de *Cyp51* est responsable d'une perte des jonctions cellulaires endothéliales, d'une augmentation de la perméabilité vasculaire et d'une activation endothéliale. Ces modifications sont très certainement liées à la modification de la composition membranaire, anomalie reconnue pour perturber les fonctions cellulaires. Ce travail ne s'est pas encore attaché à vérifier la diminution de la concentration en cholestérol et la présence accrue d'oxystérols dans les membranes endothéliales. Des analyses ultérieures semblent indispensables pour confirmer notre hypothèse physiopathologique (Wei X et al., 2016). De plus, la nature des dommages endothéliaux causés par ces modifications membranaires n'a pas été déterminée dans ce travail. Bien qu'une apoptose des cellules endothéliales soit envisageable, expliquant aussi la diminution de l'immunomarquage de Pecam-1, aucune expérience (TUNEL) ne s'est attachée à identifier les éventuelles cellules apoptotiques ni à mesurer l'expression des marqueurs apoptotiques dans le tissu myocardique. Ce type d'analyse doit être envisagé dans la suite du projet, afin d'améliorer la compréhension des mécanismes causaux. L'hypothèse d'un défaut de communication des cellules endothéliales avec les cardiomyocytes est privilégiée à ce stade, pouvant se manifester par une diminution de la survie ou de la contractilité des cardiomyocytes, expliquant le remodelage cardiaque observé. Afin de préciser les mécanismes physiopathologiques mis en jeu, nous réaliserons des analyses sur les cellules endothéliales sélectionnées par des expériences de FACS. En effet, les cellules endothéliales ne représentent qu'une faible proportion des cellules cardiaques analysées, pouvant masquer les différences d'expression réellement générées par l'invalidation de *Cyp51*. Ces mêmes analyses nous permettront d'affirmer l'origine endothéliale des modifications d'expression génique observées dans ce travail, ainsi que de confirmer la perte d'expression endothéliale de *Cyp51*, non significativement retrouvée sur nos analyses réalisées à partir d'ARN extrait de cœur entier. Une fois ces mécanismes mieux appréhendés, il sera intéressant d'étudier les conséquences d'une invalidation endothéliale de *Cyp51* en post-IDM en utilisant notre modèle d>IDM murin, étape ultérieure dans la compréhension du rôle de *Cyp51* dans la réparation cardiaque, et en particulier dans la néovascularisation cardiaque.

Partie IV : *Dnmt2*

RESEARCH ARTICLE

Dnmt2/Trdmt1 as Mediator of RNA Polymerase II Transcriptional Activity in Cardiac Growth

Hossein Ghanbarian¹✉, Nicole Wagner^{2,3}✉, Beatrice Polo³, Delphine Baudouy^{2,3}, Jafar Kiani⁵, Jean-François Michiels^{2,4}, François Cuzin³, Minoou Rassoulzadegan^{3*}, Kay-Dietrich Wagner^{2,3*}

1 Biotechnology Department, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, **2** Institute for Research on Cancer and Aging, Nice (IRCAN), University of Nice Sophia-Antipolis, CNRS UMR7284/INSERM U1081, Faculty of Medicine, Nice, France, **3** Univ. Nice Sophia Antipolis, CNRS, Inserm, iBV, 06100, Nice, France, **4** Department of Pathology, CHU Nice, Nice, France, **5** Department of Molecular Medicine, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

✉ These authors contributed equally to this work.

* minoou@unice.fr (MR); kwagner@unice.fr (KDW)



OPEN ACCESS

Citation: Ghanbarian H, Wagner N, Polo B, Baudouy D, Kiani J, Michiels J-F, et al. (2016) Dnmt2/Trdmt1 as Mediator of RNA Polymerase II Transcriptional Activity in Cardiac Growth. PLoS ONE 11(6): e0156953. doi:10.1371/journal.pone.0156953

Editor: Sudhiranjan Gupta, Texas A& M University Health Science Center, UNITED STATES

Received: January 29, 2016

Accepted: May 23, 2016

Published: June 6, 2016

Copyright: © 2016 Ghanbarian et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by the French Government (National Research Agency, ANR) through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE program (reference ANR-11-LABX-0028-01), the Association pour la Recherche sur le Cancer and Fondation de France (KDW), the Ligue Nationale Contre le Cancer and Agence Nationale de la Recherche France (ANR-08-GENOPAT-011 Epipath-Parapath) (MR). HG was the recipient of a scholarship from Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Iran.

Abstract

Dnmt2/Trdmt1 is a methyltransferase, which has been shown to methylate tRNAs. Deficient mutants were reported to exhibit various, seemingly unrelated, defects in development and RNA-mediated epigenetic heredity. Here we report a role in a distinct developmental regulation effected by a noncoding RNA. We show that Dnmt2-deficiency in mice results in cardiac hypertrophy. Echocardiographic measurements revealed that cardiac function is preserved notwithstanding the increased dimensions of the organ due to cardiomyocyte enlargement. Mechanistically, activation of the P-TEFb complex, a critical step for cardiac growth, results from increased dissociation of the negatively regulating Rn7sk non-coding RNA component in Dnmt2-deficient cells. Our data suggest that Dnmt2 plays an unexpected role for regulation of cardiac growth by modulating activity of the P-TEFb complex.

Introduction

Dnmt2/Trdmt1 is a member of the cytosine-5 methyltransferase family and shows strong sequence conservation to the catalytic motifs of established DNA methyltransferases [1]. However, Dnmt2-dependent DNA methylation has been found to be very low or absent *in vivo* [2], but Dnmt2-dependent methylation of tRNAs, which protects them from cleavage, has been reported [2, 3]. In Zebrafish, Dnmt2 knockdown experiments have been shown to induce lethal differentiation defects in the retina, liver, and brain [4]. Phalke et al. have indicated that Dnmt2 controls transposable elements in *Drosophila* [5] and *Drosophila* mutants showed reduced viability under stress conditions [3]. Furthermore, Dnmt2 plays a role in non-random sister chromatid segregation in adult testicular stem cells in *Drosophila* [6]. Recent studies in mice have shown that RNA-mediated epigenetic heredity requires Dnmt2 [7] and that endochondral

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

ossification is delayed in newborn Dnmt2-deficient mice [8]. Interestingly, Tuorto et al. performed proteomic analyses in this recent study and gene ontology annotation identified cardiovascular disease as the most up-regulated category in Dnmt2-deficient mice [8]. However, the function of Dnmt2 in the heart remained elusive. We report here a cardiac hypertrophy phenotype in Dnmt2-deficient mice, which seems to be governed by noncoding RNAs.

Studies in mouse myocardium have shown that induction of Cdk9/cyclin T1 or Cdk7/cyclin H activity is linked to cardiac hypertrophy [9,10]. Cdk9/cyclin T1 acts as a principal mediator of RNAPII C-terminal domain (CTD) phosphorylation. In particular, RNAPII CTD phosphorylation increases mRNA and protein expression, which mediates cardiac growth [11].

Mouse B2 RNA inhibits RNA polymerase II (Pol II) CTD phosphorylation by TFIIF via interaction with the polymerase [12,13]. *In vitro* studies suggested that the presence of B2 RNA at a promoter prevents phosphorylation of Ser5 residues on the CTD by TFIIF. Sequence analyses of B2 families showed that they are closely related to tRNA genes [14,15].

Rn7sk is a small nuclear RNA that inhibits Cdk9 activity through physical association with the Cdk9/cyclin T complex [16,17]. Rn7sk does not inhibit Cdk9 directly, but bridges P-TEFb (Positive Transcription Elongation Factor b) to Hexim1 (hexamethylene bisacetamide-induced protein 1), which in turn inhibits Cdk9 function [18,19].

We have shown previously that transcriptional induction of Cdk9 following small non-coding RNAs (sncRNAs) injection into one-cell embryos results in cardiac hypertrophy in mice [20]. To investigate a potential role of Dnmt2 for cardiac growth, we examined Cdk9, RNA pol II phosphorylation, and Rn7sk in Dnmt2-deficient mice compared to wild-type littermates. RNA pol II was highly activated in Dnmt2-deficient hearts, which most likely results from a decreased methylation and an increased Rn7sk dissociation from P-TEFb complex. Thus, we postulate that Dnmt2 prevents over-activation of RNA pol II and cardiac hypertrophy.

Materials and Methods

Mice and genotyping

The experiments described here were carried out in compliance with the relevant institutional and French animal welfare laws, guidelines and policies. They have been approved by the French ethics committee (Comité Institutionnel d’Ethique Pour l’Animal de Laboratoire; number NCE/2012-54). Dnmt2 ^{-/-} homozygote knockout mice [2] were kindly provided by T. Bestor. Originally maintained on a mixed genetic background, the mutation was backcrossed for more than ten generations onto the C57BL/6 genetic background. Genotypes were determined by PCR analysis of Neo and LacZ expression and by Southern blot hybridization using a genomic probe. Routinely, genotyping was performed by PCR yielding bands of 350 bp and 250 bp for the wild-type and knockout allele, respectively (Fig 1A).

Cardiac experimentation procedures

Three months old male and female mice were used. Xylazine/Ketamine-anaesthetized mice (100 mg/kg body weight for Ketamine and 10 mg/kg body weight for Xylazine injected intraperitoneally) were examined by echocardiography using the iE33 xMATRIX system with a 12MHz transducer (Philips Healthcare, DA Best, Netherlands). Anesthesia lowered the heart rate compared to conscious mice without significant differences for Dnmt2 ^{-/-} and Dnmt2 ^{+/+} animals. Histology and measurement of cardiomyocyte diameters was performed according to established protocols [20,21]. Three μm paraffin sections were used for histological and immunohistological procedures. Haematoxylin-Eosin staining was routinely performed on all tissue samples; additionally, sections were stained with wheat germ agglutinin (WGA) (1:100, Life Technologies, Molecular Probes) and Picrosirius Red. Slides were photographed using a slide

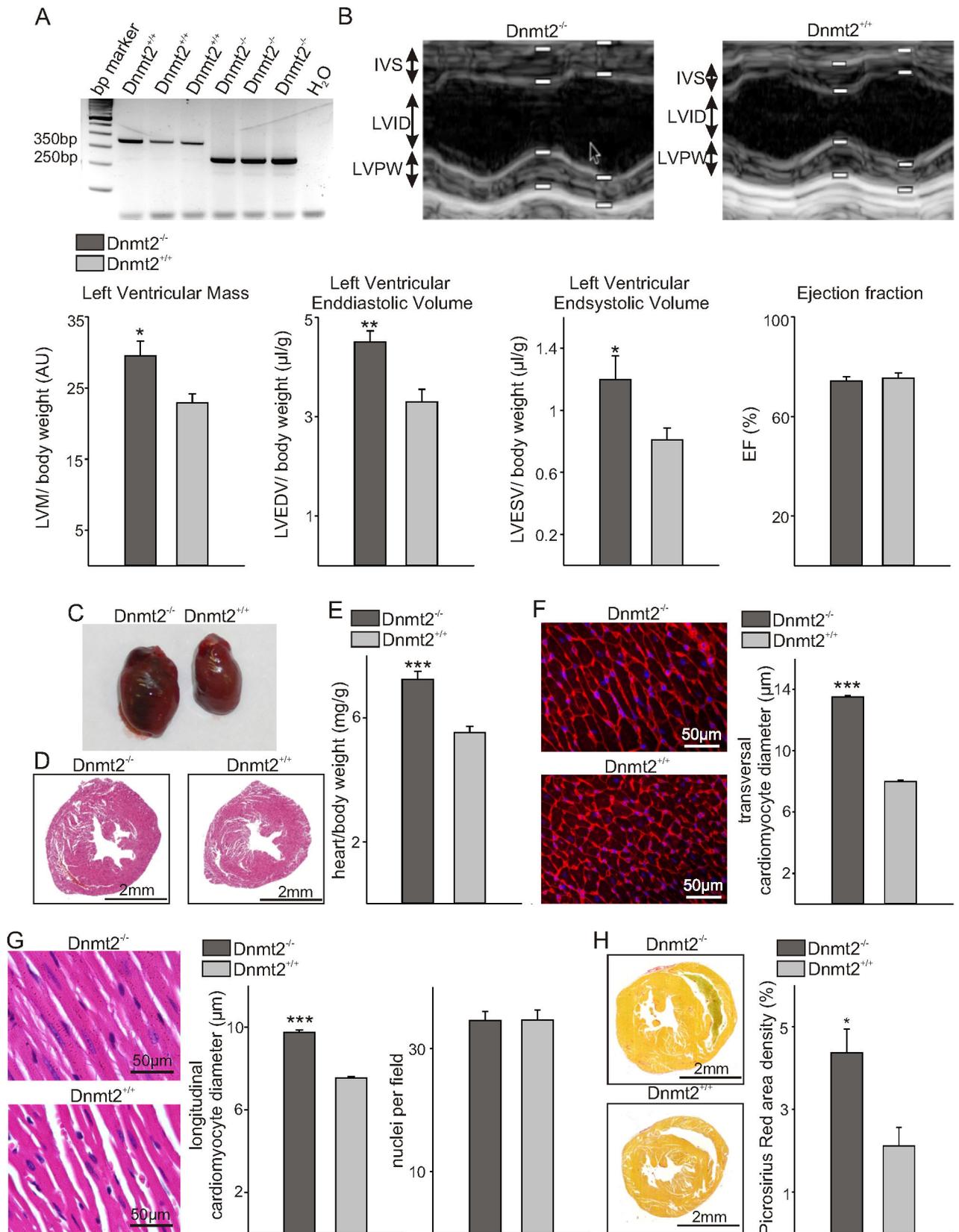


Fig 1. Dnmt2-deficiency induces cardiac growth with preserved function. (A) Representative semiquantitative RT-PCR to genotype $Dnmt2^{-/-}$ and $Dnmt2^{+/+}$ animals. (B) Representative echocardiographic recordings from $Dnmt2^{-/-}$ and $Dnmt2^{+/+}$ animals. The interventricular septum (IVS), left ventricular internal dimensions (LVID), and leftventricular posterior wall (LVPW) are indicated. White bars represent systolic and diastolic measuring points. The arrow represents the cursor position from the echocardiographic recording and has no biological meaning. Lower panel: Echocardiographic examination indicates increased left ventricular mass, systolic and diastolic volumes, but preserved ejection fraction in $Dnmt2^{-/-}$ ($n = 8$) compared to control mice ($n = 6$). (C) Representative photographs of the hearts. (D) Photomicrographs of hematoxylin-eosin (HE) stained cross-sections of the hearts. Scale bars indicate 2mm. (E) Heart-to-body weight ratios ($n = 8$). (F) Photomicrographs of WGA-stained sections showing transversal cross sections of individual cardiomyocytes and quantification of cardiomyocyte diameters ($n = 5$ for each group). (G) High power photomicrographs of HE-stained longitudinal sections showing individual cardiomyocytes and quantification of cardiomyocyte diameters and cellularity per field ($n = 5$ for each group). (H) Representative photographs of Picrosirius Red stained heart cross sections and quantification of Picrosirius Red area densities as a measure for collagen deposits ($n = 5$ for each group). Scale bars indicate 50 μ m. (F) Data are mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

doi:10.1371/journal.pone.0156953.g001

scanner (Leica Microsystems, Nanterre, France) or an epifluorescence microscope (DMLB, Leica, Germany) connected to a digital camera (Spot RT Slider, Diagnostic Instruments, Scotland). ImageJ was used to determine Picrosirius Red area densities ($n = 5$ animals each), as well as cardiomyocyte diameters at the level of the nucleus in longitudinal sectioned cells of the interventricular septum for the HE staining ($n = 255$ cells for $Dnmt2^{-/-}$ and $n = 305$ cells for $Dnmt2^{+/+}$, $n = 5$ animals each) or cardiomyocyte diameters at the level of the nucleus in transversal sectioned cells of the interventricular septum for the WGA staining ($n = 391$ cells for $Dnmt2^{-/-}$ and $n = 367$ cells for $Dnmt2^{+/+}$, $n = 5$ animals each). Investigators were blinded for the genotype of the mice.

Cell culture

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) prepared from 12.5 days embryos were inactivated by 10 μ g/ml mitomycin (Sigma). $Dnmt2$ knock out, kindly provided by T. Bestor, and control ES cells were grown on inactivated feeder cells in standard ES culture medium. According to well-established procedures [22], embryoid bodies were generated from knock out and control ES cells by culture in hanging drops, the cells were plated back on gelatin-coated plates 3 days later and cardiac differentiation was monitored by the appearance of beating cells.

Western blot analysis

Total lysates from cell cultures and hearts were prepared, electrophoresed, and blotted. The following antibodies were used for immunodetection: polyclonal anti-CDK9 antibody from rabbit (H-169, sc-8338, Santa Cruz Biotechnology) in a 1:500 dilution in PBS, 2.5% Blotto, 0.05% Tween-20, polyclonal anti-RNA Pol II from rabbit (N-20, Santa Cruz Biotechnology sc-899) 1:500, mouse monoclonal anti β -actin (Santa Cruz Biotechnology), peroxidase-coupled goat anti-rabbit secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology) 1:10000, and peroxidase-coupled rabbit anti-mouse secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology) 1:10000. Western Blots ($n = 2$) were quantified using ImageJ with the Gel Analysis tool.

RNA immunoprecipitation

Total RNA was prepared from hearts of $Dnmt2$ -deficient mice and wild-type littermates ($n = 6$ each) using Trizol Reagent (Invitrogen). Ten μ g total RNA were incubated with 2 μ g of 5-mC monoclonal antibody (33D3, Diagenode) overnight at 4°C in 500 μ l RIP buffer (150 mM KCL, 25 mM Tris pH 7.4, 5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5% NP40, 100 U/ml RNase inhibitor (Invitrogen)) complemented with protease inhibitor (Complete[®], Roche Diagnostics, Indianapolis, USA). Afterwards, protein G beads (50 μ l, GE Healthcare) were added and after 1 hour incubation, 3 washes of pelleted beads performed in RIP buffer. 5-mC antibody

precipitated RNAs were isolated using Trizol Reagent. cDNA synthesis was performed using the Maxima First strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific) and quantitative PCR for Rn7sk using SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems). Traces of non-specific bound GAPDH served for normalization.

Northern blot analysis

Northern blot analysis was performed as described [23]. Briefly, 6 µg total RNA extracted from cell cultures and hearts was loaded onto a 12% denaturing polyacrylamide gel and electrophoresed until the bromophenol blue marker reached the bottom of the gel. The separated RNA was electrotransferred to a Hybond N+ membrane (Amersham). Hybridization was carried out in the presence of 32 P-end-labeled DNA oligonucleotide probes. The following probe sequence was used 5'-GAAGAGGACGACCTTCCCCG-3'.

Quantitative RT-PCR

RNA extraction and quantitative RT-PCR were performed as described [24]. Briefly, RNA was extracted using Trizol Reagent (Invitrogen). 1 µg RNA samples were reverse transcribed to cDNA by using random primers hexamers and MLV reverse transcriptase (Invitrogen). Quantitative PCR was performed using the 'Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG' kit (Invitrogen). miR-1 determinations were performed with the Taqman MicroRNA Assay (Applied Biosystems) mmu-miR-1. Sequences of oligonucleotides primers are listed in Table 1. The 2^{-ΔΔCT} method was used for calculation.

Rn7sk-Cdk9 complex immunoprecipitation

Immunoprecipitation assays were performed as described [25]. ES cells were washed with PBS twice before formaldehyde (1% in PBS) crosslinking. Afterwards, cells were again washed with PBS twice before incubating in lysis buffer consisting of 10 mM HEPES, pH 7.0, 0.5% Nonidet P-40, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1mM DTT, 100U/ml RNasin (Promega), 2 mM vanadate (Sigma-Aldrich). One tablet of protease inhibitor mixture (Complete Mini®, Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) was added just prior to use. Whole cell lysates were incubated on ice for 30 min and the protein concentration was determined using a BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL). 500 µg proteins were incubated with 10µg polyclonal anti-Cdk9 antibody from rabbit (H-169, sc-8338, Santa Cruz Biotechnology) for 4h. Alternatively, 10 µg of a

Table 1. Primers for quantitative RT-PCR analysis.

Gene	Accession number	Primer symbol	Sequence 5'-3'
Cdk9	NT-033778	Cdk9-F	TAAAGCCAAGCACCGTCAG
		Cdk9-R	GATTTCCCTCAAGGCTGTGAT
myh6	NC_000080.5	myh6-F	CCAAGACTGTCCGGAATGA
		myh6-R	TCCAAAGTGGATCCTGATGA
myh7	NC_000014.8	myh7-F	GGCCTCCATTGATGACTCTG
		myh7-R	CGCCTGTCAGCTTGAAATG
Gapdh	NM_008084	Gapdh-F	TGTCCGTCGTGGATCTGAC
		Gapdh-R	CCTGCTTCACCACCTTCTTG
Rn7sk	NC_000075.6	Rn7sk-F	AGGACGACCTTCCCCGAATA
		Rn7sk-B	GCGCCTCATTGGATGTGTC
Ctip2	NC_000078.6	Ctip2-F	TACTGTCACCCACGAAAGGC
		Ctip2-B	TGGGAAGAGGAGGCAGCTAT

doi:10.1371/journal.pone.0156953.t001

polyclonal anti-Cyp2 antibody from rabbit (H-21, sc-133491, Santa Cruz Biotechnology) were used as a negative control. Protein A-agarose beads were added and rotated at 4°C for 4h. RNA protein complexes were washed 4 times with polysome lysis buffer (100mM KCl, 5mM MgCl₂, 10mM HEPES, 0.5% Nonidet P-40, 1mM DTT, 100U/ml RNasin RNase inhibitor (Promega), 2mM vanadyl ribonucleoside complexes solution (Sigma-Aldrich), 25μl protease inhibitor cocktail (pH 7.0). RNA protein complexes were eluted from beads with polysome lysis buffer including 0.1% SDS and 30μg proteinase K and reverse cross-linked at 50°C for 30 min, followed by TRIzol (Invitrogen) extraction and ethanol precipitation.

Statistical Analysis

Data are expressed as means ± SEM. ANOVA with the Bonferroni test as post hoc test was used versus controls. Differences between two groups were tested using the Mann-Whitney test for nonparametric samples. Differentiation of 200 wild-type and Dnmt2-deficient ES cell clones each was estimated for each time point using a contingency table with Fisher's test and Yate's correction. A p-value less than 0.05 is considered statistically significant.

Results

Cardiac hypertrophy in Dnmt2-deficient mice

Echocardiographic examination of adult Dnmt2^{-/-} mice compared to age-matched controls revealed increased left ventricular mass relative to body weight and higher left ventricular end-diastolic and end-systolic volumes whereas the ejection fraction as measure of cardiac contractility was preserved (Fig 1B). Dnmt2-deficient mice showed macroscopically and microscopically increased hearts sizes compared to controls (Fig 1C and 1D). Heart weights relative to body weights were increased on average by 20% (Fig 1E). Body weights were comparable (data not shown). Measurements of cardiomyocyte diameters revealed an increase by approximately 20% in Dnmt2^{-/-} mice compared to wild-type littermates, whereas the cellularity remained unchanged (Fig 1F and 1G). Dnmt2^{-/-} hearts displayed more fibrosis than the wild-type counterparts (Fig 1H).

Activation of RNA pol II in Dnmt2-deficient cells

To monitor RNA pol II phosphorylation in the heart, we performed Western blotting with an antibody that recognizes both, hyperphosphorylated and hypophosphorylated pol II (IIo and IIa, respectively). Interestingly the proportion of phosphorylated versus total pol II, the form required for productive transcript elongation, increased in Dnmt2-deficient mice (Fig 2A). Similarly, more active form of RNA polymerase II was detectable in Dnmt2-deficient ES cells compared to wild-type cells (Fig 2B).

Enhanced cardiac differentiation of Dnmt2 knock-out ES cells

The morphology and growth characteristics of Dnmt2-deficient ES cells were comparable to wild-type ES cells; and they did not exhibit any sign of differentiation, neither into cardiac muscle nor otherwise. As it is established that activated RNA pol II plays a key role in cardiac growth and differentiation and we could detect more active form of RNA polymerase II in Dnmt2-deficient ES cells, we tested the differentiation potency of Dnmt2-deficient ES cells *in vitro*. Culture of the Dnmt2-deficient and control ES cells in hanging drops led to their aggregation in embryoid bodies (EB) [22]. After plating the cells back on gelatin-coated plates 2 days later, cardiac differentiation, monitored by the appearance of beating cells, progressed at a faster rate in Dnmt2-deficient cells compare to wild-type ES cells (Fig 3A). While the fraction

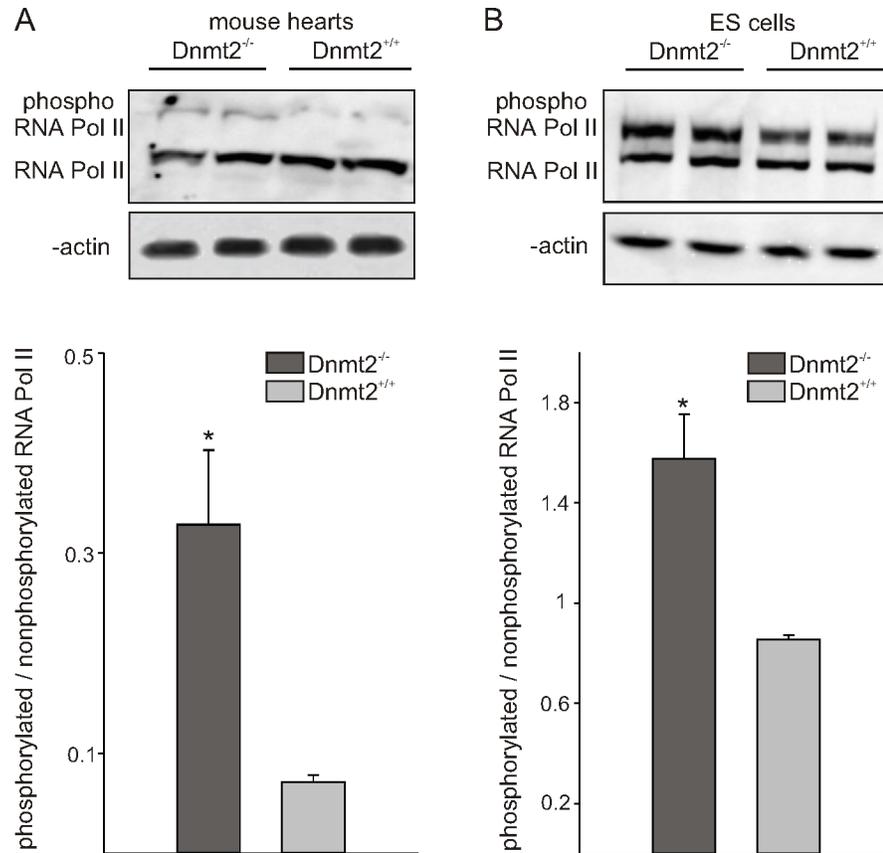


Fig 2. Dnmt2-deficiency is associated with increased phosphorylation of RNA polymerase II. Representative Western Blots for RNA polymerase II (RNA Pol II, upper panels) and quantification of the ratio of phosphorylated to non-phosphorylated RNA Pol II (lower panels) in mouse hearts (A) and ES cells (B) with knockout of Dnmt2 and controls. β -actin was used as a standard. Data are mean \pm SEM. * $p < 0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0156953.g002

of beating wild-type EBs was about 50%, it was almost 100% for Dnmt2 Dnmt2-deficient EBs on day 6 of differentiation. Accordingly, quantitative RT-PCR determination of cardiac marker genes showed higher values in Dnmt2-deficient EBs than in wild-type EBs. Myh6, Myh7, and miR-1, which were undetectable in undifferentiated Dnmt2-deficient and wild-type ES cells (data not shown), were found, as expected [26], to be increased along with differentiation (Fig 3B and 3D). Significant up-regulation of Myh6 and Myh7 could also be detected in the hearts of Dnmt2-deficient animals as compared to their wild-type littermates (Fig 3C) whereas miR-1 expression was only slightly increased (Fig 3E).

The P-TEFb complex is activated in Dnmt2 knock-out cells

We thought that activation or over-expression of the P-TEFb complex may have a role in the observed phenotype in growth and differentiation of cardiac cells *in vivo* and *in vitro*. Cdk9 positively and Rn7sk negatively regulates the P-TEFb complex, CTIP2 represses the Cdk9 kinase activity of P-TEFb [27]. Cdk9 expression did not differ significantly in Dnmt2-deficient and wild-type ES cells and mouse hearts, neither on the RNA nor on the protein level. (Fig 4A and 4B). Expression of Ctip2 was unchanged in Dnmt2-deficient as compared to wild-type hearts (Fig 4C). Northern blot and RT-PCR assays done with RNA extracted from hearts showed no change in the expression of Rn7sk in Dnmt2-deficient mice compared to controls

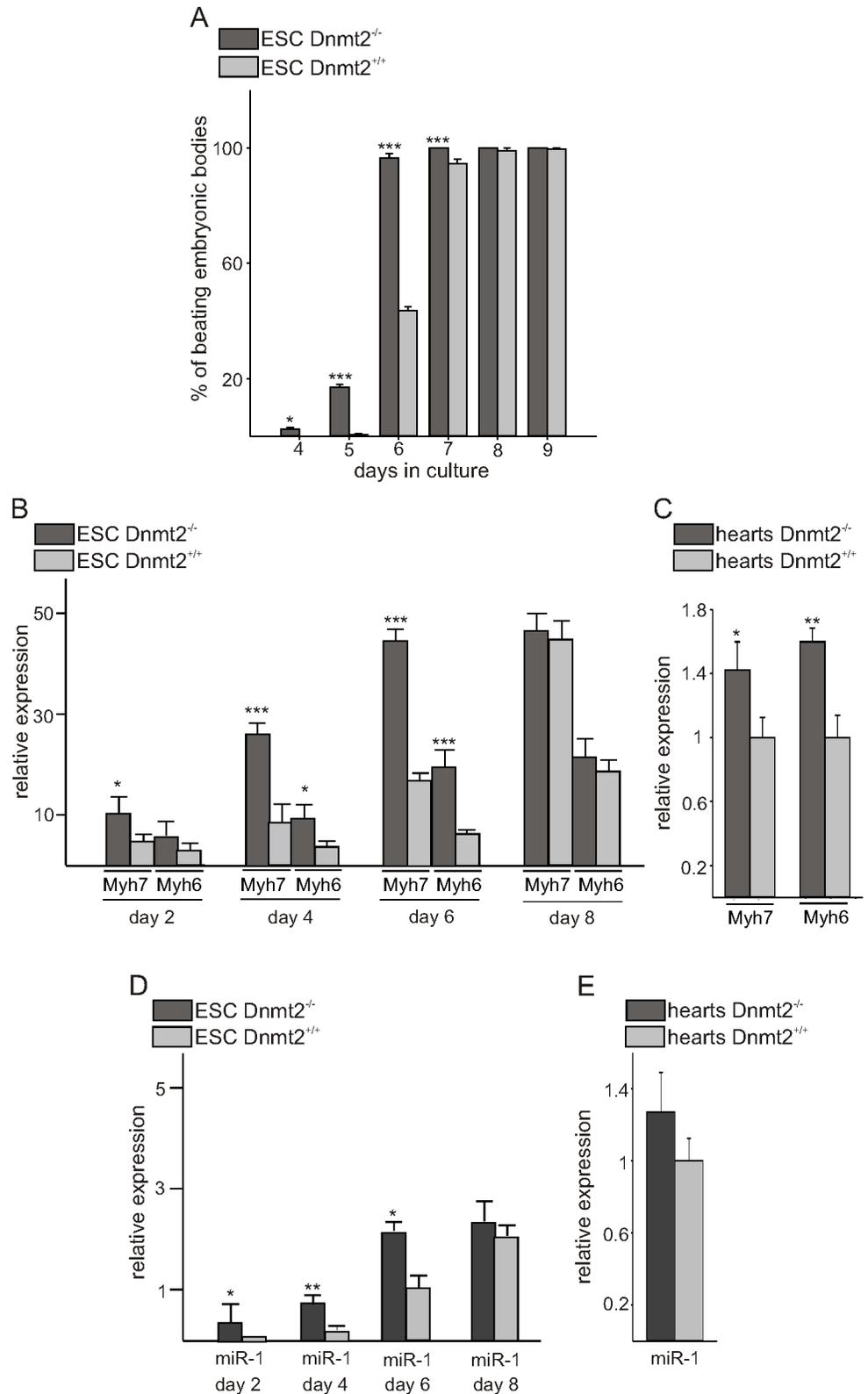


Fig 3. Dnmt2-deficiency enhances cardiac differentiation in ES cells *in vitro*. (A) Embryoid bodies of hanging drop cultures from Dnmt2^{+/+} and Dnmt2^{-/-} ES cells were seeded individually ($n = 200$ each) in 48-well tissue culture plates and the appearance of beating cells monitored daily. (B) RNA was extracted at different

timepoints of differentiation from additional Dnmt2-deficient and control ES cell clones ($n = 6$ each) and quantitative RT-PCR analysis of cardiac differentiation markers Myh6, and Myh7 was performed. (C) Quantitative RT-PCR for Myh6, and Myh7 in Dnmt2^{-/-} and Dnmt2^{+/+} hearts ($n = 6$ for each group). (D) Quantitative RT-PCR for miR1 at different timepoints of differentiation from Dnmt2-deficient and control ES cell clones ($n = 6$ each). (E) qRT-PCR for miR1 in Dnmt2^{-/-} and Dnmt2^{+/+} hearts ($n = 6$ for each group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

doi:10.1371/journal.pone.0156953.g003

(Fig 4D and 4E). It has been shown previously that Rn7sk dissociation from the P-TEFb complex is one of the most important P-TEFb activating factors [9–11]. Based on our results we hypothesized that methylation and association of Rn7sk to the P-TEFb complex might have changed in Dnmt2-deficient cells. To test this hypothesis, RNA immunoprecipitation using a 5-methyl Cytidine antibody with RNA extracted from hearts was performed, followed by RT-PCR with specific primers to amplify Rn7sk. The results demonstrate that Rn7sk is significantly less methylated in Dnmt2-deficient cardiac cells (Fig 4F). Additionally, a PTEF-b immunoprecipitation assay was done on lysates from Dnmt2-deficient and wild-type ES cells using an antibody against Cdk9. Immunoprecipitation with an antibody against Cyp2 served as negative control. RNA co-immunoprecipitated by Cdk9 and Cyp2 antibodies was thereafter analyzed by RT-PCR using specific primers to amplify Rn7sk, indicating less enrichment of Rn7sk in Dnmt2-deficient compared to wild-type samples. No enrichment was observed using the Cyp2 antibody indicating specificity for the P-TEFb complex (Fig 4G). A scheme illustrating our findings and hypotheses of Dnmt2-mediated RNA polymerase II transcriptional activity in cardiac growth is provided in Fig 5.

Discussion

It has been shown that Dnmt2 is part of the RNA processing machinery during cellular stress, by which Dnmt2-mediated tRNA methylation protects tRNA from endonucleolytic cleavage [3]. *In vitro* methylation studies failed to show other substrates for Dnmt2 other than tRNA, which was achieved by incubation of Dnmt2 protein with purified total RNA [2]. It is important to note that these *in vitro* reconstitution studies rely on purified protein components and a controlled environment may not accurately reflect the complex intracellular atmosphere. Besides these *in vitro* studies, and the recent report on the role of Dnmt2 for bone formation in mice [8], little is known about Dnmt2 function in mammals. In the present study, we report a cardiac hypertrophy phenotype in Dnmt2-deficient mice, which seems to be mediated via activation of the P-TEFb complex.

We have previously shown that small non-coding RNAs can induce hereditary epigenetic variations and act as the transgenerational signalling molecules [20, 28, 29]. To consider a role of the Dnmt2 methyltransferase in RNA mediated epigenetic inheritance, we investigated the transgenerational inheritance of previously established phenotypes in Dnmt2 deficient mice [7]. In Kit and Sox9 paramutant models, the epigenetic variants of the respected locus were prevented in Dnmt2-deficient mice [7]. Cdk9 paramutant animals displayed a hereditary cardiac hypertrophy [20]. Thus, we investigated whether Dnmt2 might also be involved in cardiac growth. Interestingly, we describe here a cardiac hypertrophy phenotype in Dnmt2-deficient mice independent from Cdk9 locus induction, mediated by the non-coding RNA Rn7sk. Activation of RNA pol II, a key player in cardiac hypertrophy, was identified not only in Dnmt2-deficient mice, but also in Dnmt2-deficient ES cells. Apart from proteins such as Cdk9, non-coding RNAs including Rn7sk and B2 RNAs tightly regulate RNA pol II activation. We focused on the identification of possible functions of non-coding RNAs in the observed cardiac hypertrophy in Dnmt2-deficient animals. Rn7sk methylation in an NSun2-dependent manner has been already demonstrated [30]. Thus, we focussed on potential methylation of

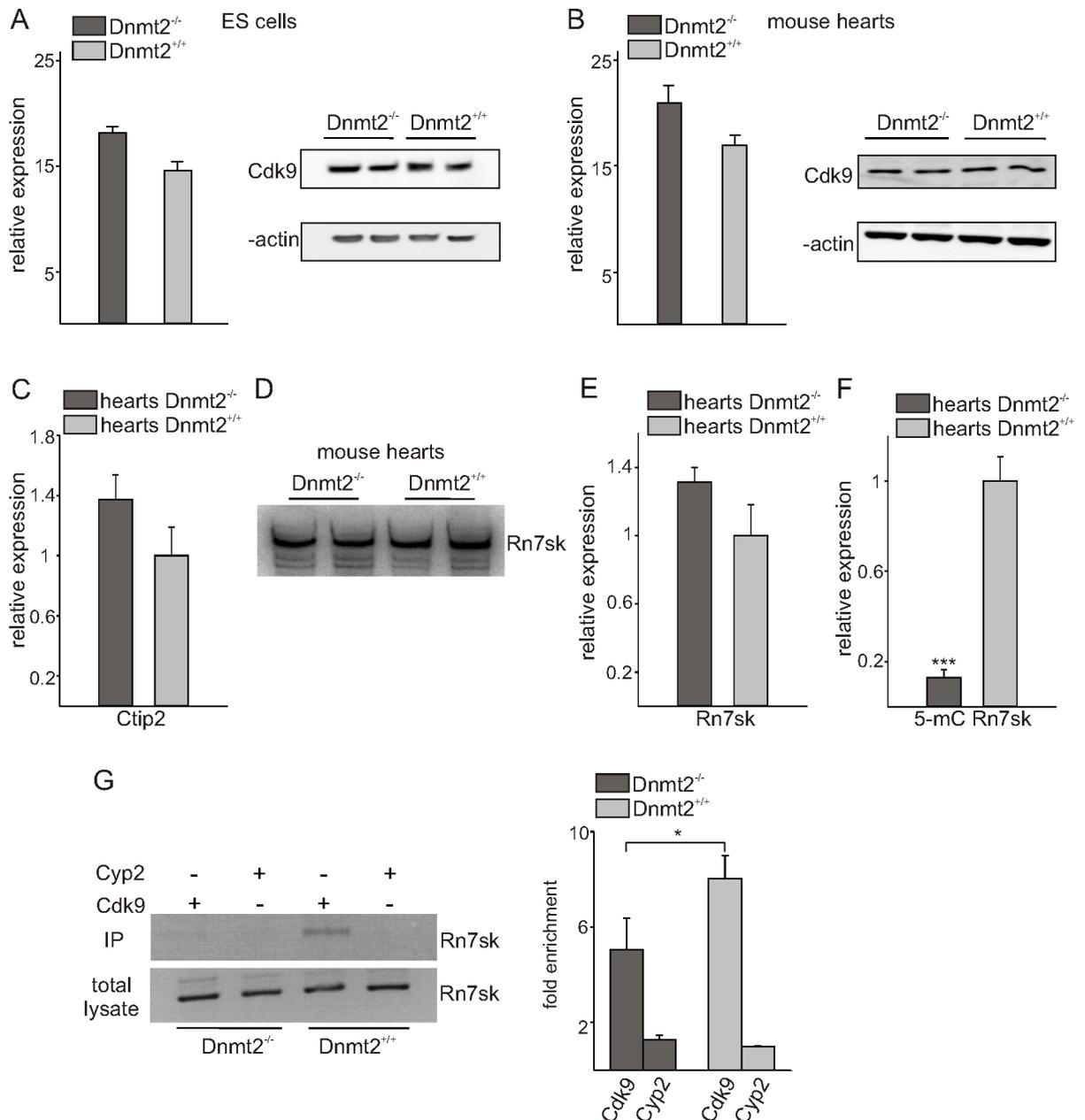


Fig 4. Dnmt2-deficiency affects the P-TEFb complex. (A) Cdk9 expression in Dnmt2-deficient and control ES cells was analyzed by quantitative RT-PCR (left) and Western blot assays (right). (B) Cdk9 expression in Dnmt2-deficient and control hearts was investigated by quantitative RT-PCR (left) ($n = 5$) and Western blot assays (right). (C) Quantitative RT-PCR for Ctip2 expression in the hearts of Dnmt2^{-/-} and Dnmt2^{+/+} mice ($n = 6$). Northern blot assay (D) and quantitative RT-PCR (E) for Rn7sk (7SK) expression in the hearts of Dnmt2^{-/-} and Dnmt2^{+/+} mice. (F) RNA immunoprecipitation using a 5-methyl Cytidine antibody with RNA extracted from Dnmt2^{-/-} and Dnmt2^{+/+} hearts, followed by RT-PCR for Rn7sk ($n = 6$). Note that Rn7sk is significantly less methylated in Dnmt2^{-/-} hearts. (G) PTEF-b immunoprecipitation using an antibody against Cdk9 on lysates from Dnmt2^{-/-} mutant and control ES cells followed by RT-PCR for Rn7sk ($n = 3$) and subsequent quantification. An anti Cyp2 antibody served as negative control. Note that less Rn7sk is associated to the P-TEFb complex in Dnmt2-deficient cells.

doi:10.1371/journal.pone.0156953.g004

Rn7sk by the other known RNA methyltransferase Dnmt2. Initial bisulfite sequencing was not sensitive enough in our hands to detect robust methylation differences for Rn7sk (data not shown). By RNA immunoprecipitation using a 5-methyl Cytidine antibody followed by

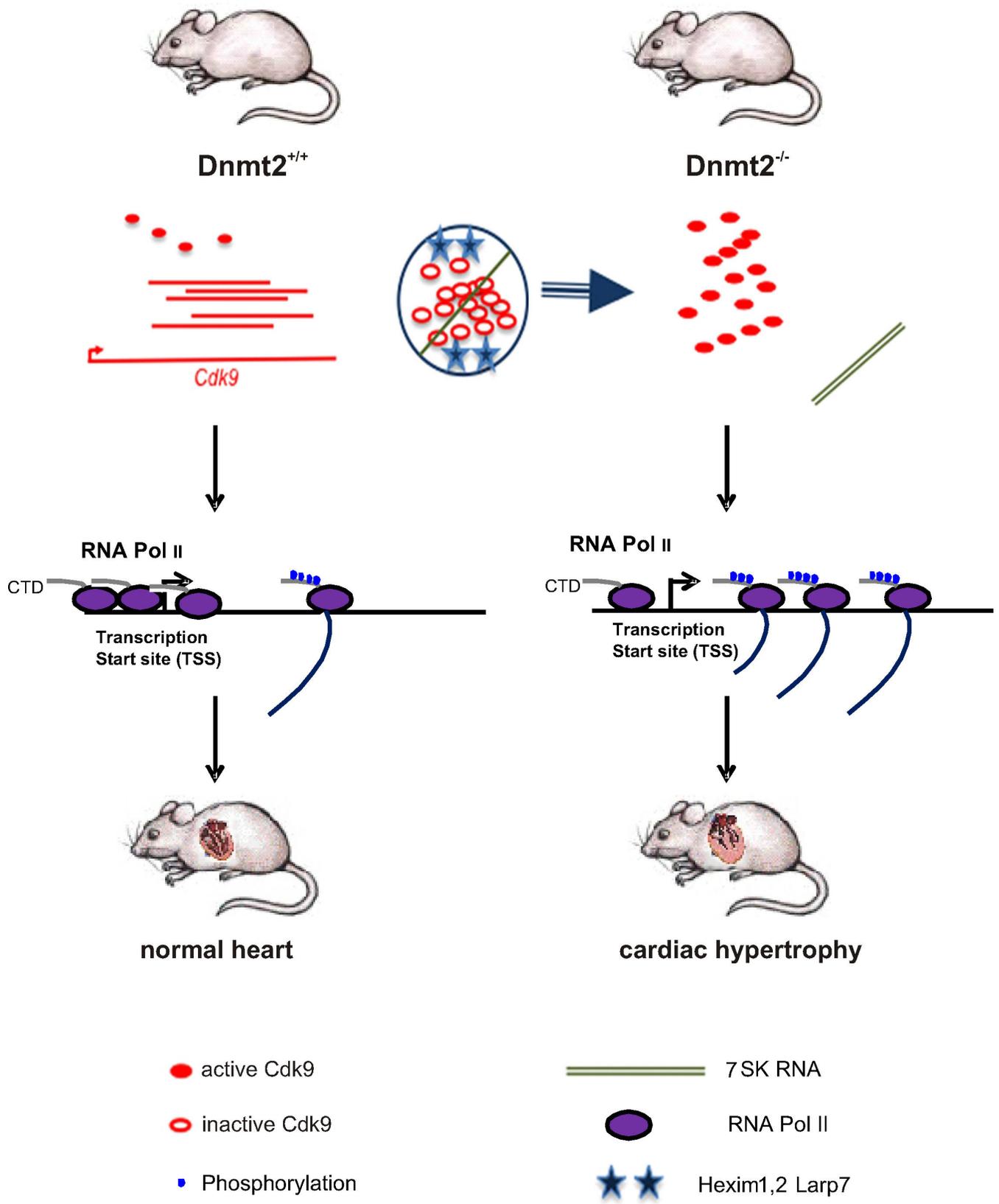


Fig 5. Schematic representation of Dnmt2-mediated RNA polymerase II transcriptional activity in cardiac growth. Storage of inactive protein in a complex with 7SK RNA and inhibitory proteins, release of active kinase (P-TEFb) in Dnmt2 knock out conditions. The phosphorylation of a C-terminal domain of the polymerase by P-TEFb allows elongation of the transcripts. RNAPII CTD phosphorylation increases mRNA and protein expression, which mediates cardiac growth in Dnmt2-deficient mice.

doi:10.1371/journal.pone.0156953.g005

quantitative RT-PCR we demonstrate that Rn7sk is significantly less methylated in the Dnmt2^{-/-} than in Dnmt2^{+/+} hearts. This might explain the lack of inhibition of the P-TEFb complex, as RNA methylation protects them from cleavage [2, 3]; and unmethylated Rn7sk might be less stable and more easily degraded. Furthermore, immunoprecipitation assays identified increased Rn7sk dissociation from the P-TEFb complex, which was shown to be important for RNA pol II activation and cardiac hypertrophy [11]. Whether the increased Myh6 and Myh7 expression *in vitro* and *in vivo* results from increased occupancy of the promoters of these genes by the P-TEFb complex or is simply reflecting cardiac hypertrophy remains an open question.

Although we cannot exclude that other yet unidentified mechanisms might contribute to the observed phenotype, the ablation of the Dnmt2 gene is changing the levels of several genes involved in cardiac hypertrophy *in vitro* and *in vivo*. Taken together, we suggest that Dnmt2 is required to limit cardiac growth and differentiation by regulating RNA pol II phosphorylation, which involves the non-coding RNA Rn7sk.

Acknowledgments

Dnmt2-deficient ES cells and mice were kindly provided by T. Bestor.

We thank M. Radjkhumar, S.M. Wagner, P. Lopez, F. Paput, J. Paput, M. Cutajar-Bossert, and Cecile Passot for technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MR FC JFM KDW NW. Performed the experiments: HG KDW NW DB JK BP. Analyzed the data: HG KDW NW DB JK. Wrote the paper: HG KDW NW FC.

References

1. Okano M, Xie S, Li E. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26: 2536–40. PMID: [9592134](#)
2. Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang X et al. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science.* 2006; 311: 395–8. PMID: [16424344](#)
3. Schaefer M, Pollex T, Hanna K, Tuorto F, Meusburger M, Helm M et al. RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes Dev.* 2010; 24: 1590–5. doi: [10.1101/gad.586710](#) PMID: [20679393](#)
4. Rai K, Chidester S, Zavala CV, Manos EJ, James SR, Karpf AR et al. Dnmt2 functions in the cytoplasm to promote liver, brain, and retina development in zebrafish. *Genes Dev.* 2007; 21: 261–6. PMID: [17289917](#)
5. Phalke S, Nickel O, Walluscheck D, Hortig F, Onorati MC, Reuter G. Retrotransposon silencing and telomere integrity in somatic cells of *Drosophila* depends on the cytosine-5 methyltransferase DNMT2. *Nat Genet.* 2009; 41: 696–702. doi: [10.1038/ng.360](#) PMID: [19412177](#)
6. Yadlapalli S, Yamashita YM. Chromosome-specific nonrandom sister chromatid segregation during stem-cell division. *Nature.* 2013; 498: 251–4. doi: [10.1038/nature12106](#) PMID: [23644460](#)
7. Kiani J, Grandjean V, Liebers R, Tuorto F, Ghanbarian H, Lyko F et al. RNA-mediated epigenetic heredity requires the cytosine methyltransferase Dnmt2. *PLoS Genet.* 2013; 9: e1003498. doi: [10.1371/journal.pgen.1003498](#) PMID: [23717211](#)
8. Tuorto F, Herbst F, Alerasool N, Bender S, Popp O, Federico G et al. The tRNA methyltransferase Dnmt2 is required for accurate polypeptide synthesis during haematopoiesis. *EMBO J.* 2015; 34: 2350–62. doi: [10.15252/emj.201591382](#) PMID: [26271101](#)

9. Sano M, Wang SC, Shirai M, Scaglia F, Xie M, Sakai S. et al. Activation of cardiac Cdk9 represses PGC-1 and confers a predisposition to heart failure. *EMBO J.* 2004; 23: 3559–69. PMID: [15297879](#)
10. Kulkarni PA, Sano M, Schneider MD. Phosphorylation of RNA polymerase II in cardiac hypertrophy: cell enlargement signals converge on cyclin T/Cdk9. *Recent Prog Horm Res.* 2004; 59: 125–39. PMID: [14749500](#)
11. Sano M, Abdellatif M, Oh H, Xie M, Bagella L, Giordano A et al. Activation and function of cyclin T-Cdk9 (positive transcription elongation factor-b) in cardiac muscle-cell hypertrophy. *Nat Med.* 2002; 8: 1310–7. PMID: [12368904](#)
12. Yakovchuk P, Goodrich JA, Kugel JF. B2 RNA and Alu RNA repress transcription by disrupting contacts between RNA polymerase II and promoter DNA within assembled complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 5569–74. doi: [10.1073/pnas.0810738106](#) PMID: [19307572](#)
13. Yakovchuk P, Goodrich JA, Kugel JF. B2 RNA represses TFIIH phosphorylation of RNA polymerase II. *Transcription* 2011; 2: 45–49. doi: [10.4161/trns.2.1.14306](#) PMID: [21326911](#)
14. Daniels GR, Deininger PL. Repeat sequence families derived from mammalian tRNA genes. *Nature.* 1985; 317: 819–22. PMID: [3851163](#)
15. Allen TA, Von Kaenel S, Goodrich JA, Kugel JF. The SINE-encoded mouse B2 RNA represses mRNA transcription in response to heat shock. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 816–21. PMID: [15300240](#)
16. Nguyen VT, Kiss T, Michels AA, Bensaude O. 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature.* 2001; 414: 322–5. PMID: [11713533](#)
17. Yang Z, Zhu Q, Luo K, Zhou Q. The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. *Nature* 2001; 414: 317–22. PMID: [11713532](#)
18. Yik JH, Chen R, Nishimura R, Jennings JL, Link AJ, Zhou Q. Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA. *Mol Cell.* 2003; 12: 971–82. PMID: [14580347](#)
19. Michels AA, Nguyen VT, Fraldi A, Labas V, Edwards M, Bonnet F, Lania L, Bensaude O. MAQ1 and 7SK RNA interact with CDK9/cyclin T complexes in a transcription-dependent manner. *Mol Cell Biol.* 2003; 23: 4859–69. PMID: [12832472](#)
20. Wagner KD, Wagner N, Ghanbarian H, Grandjean V, Gounon P, Cuzin F, Rassoulzadegan M. RNA induction and inheritance of epigenetic cardiac hypertrophy in the mouse. *Dev Cell* 2008; 14: 962–969. doi: [10.1016/j.devcel.2008.03.009](#) PMID: [18539123](#)
21. Coelho-Filho OR, Shah RV, Mitchell R, Neilan TG, Moreno H Jr, Simonson B, Kwong R, Rosenzweig A, Das S, Jerosch-Herold M. *Circulation* 2013; 128: 1225–33. doi: [10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000438](#) PMID: [23912910](#)
22. Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. Quantification of cardiomyocyte hypertrophy by cardiac magnetic resonance: implications for early cardiac remodeling. *Circ Res* 2002; 91: 189–201. PMID: [12169644](#)
23. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 2001; 294: 862–4. PMID: [11679672](#)
24. Wagner KD, Cherfils-Vicini J, Hosen N, Hohenstein P, Gilson E, Hastie ND, Michiels JF, Wagner N. The Wilms' tumour suppressor Wt1 is a major regulator of tumour angiogenesis and progression. *Nat Commun.* 2014; 5: 5852. doi: [10.1038/ncomms6852](#) PMID: [25510679](#)
25. Peritz T, Zeng F, Kannanayakal TJ, Kilk K, Eiríksdóttir E, Langel U, Eberwine J. Immunoprecipitation of mRNA-protein complexes. *Nat Protoc.* 2006; 1, 577–80. PMID: [17406284](#)
26. Ivey KN, Muth A, Arnold J, King FW, Yeh RF, Fish JE et al. MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 219–229. doi: [10.1016/j.stem.2008.01.016](#) PMID: [18371447](#)
27. Cherrier T, Le Douce V, Eilebrecht S, Riclet R, Marban C, Dequiedt F et al. CTIP2 is a negative regulator of P-TEFb. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110: 12655–60. doi: [10.1073/pnas.1220136110](#) PMID: [23852730](#)
28. Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, Vincent S, Gillot I, Cuzin F. RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 2006; 441: 469–474. PMID: [16724059](#)
29. Grandjean V, Gounon P, Wagner N, Martin L, Wagner KD, Bernex F, Cuzin F, Rassoulzadegan M. The miR-124-Sox9 paramutation: RNA-mediated epigenetic control of embryonic and adult growth. *Development* 2009; 136: 3647–3655. doi: [10.1242/dev.041061](#) PMID: [19820183](#)
30. Hussain S, Sajini AA, Blanco S, Dietmann S, Lombard P, Sugimoto Y et al. NSun2-mediated cytosine-5 methylation of vault noncoding RNA determines its processing into regulatory small RNAs. *Cell Rep.* 2013; 4: 255–61. doi: [10.1016/j.celrep.2013.06.029](#) PMID: [23871666](#)

La délétion de *Dnmt2* est à l'origine d'une hypertrophie cardiaque excentrique, caractérisée par une hypertrophie cardiomyocytaire, une augmentation des volumes ventriculaires gauches et une fibrose myocardique interstitielle majorée. La fonction contractile cardiaque est préservée chez les animaux n'exprimant pas *Dnmt2*.

En cas de délétion du gène, les analyses moléculaires montrent une activation de l'ARN polymérase II (augmentation de la synthèse de la forme active phosphorylée) et une augmentation de la différenciation cardiaque des cellules souches embryonnaires in vitro. Une activation de P-TEFb (Positive Transcription Elongation Factor b) a également été prouvée, résultant d'une déstabilisation du complexe P-TEFb-Rn7sk, elle-même liée à une moindre méthylation de l'ARN non codant Rn7sk.

Ma contribution à ce travail s'est limitée à la réalisation des échocardiographies chez les souris.

DISCUSSION

Les rôles de Dnmt2 dans le développement cardiaque embryonnaire et la fonction cardiaque à l'âge adulte sont encore mal connus chez les mammifères.

Dans un précédent travail, notre équipe a prouvé l'importance de la régulation épigénétique par les petits ARNs (microARNs), et objectivé une hypertrophie cardiaque en réponse à l'activation de Cdk9 (Cyclin-dependent kinase 9) par le microARN miR-1 (Wagner KD et al., 2008). Cdk9 forme avec la cycline T1 un complexe activateur de l'ARN polymérase II, responsable de la régulation de la croissance cellulaire. Ce complexe est inhibé par l'ARN non codant Rn7sk, alors que miR-1 active directement Cdk9. Avec ces éléments, l'importance de Dnmt2 dans la modulation de la croissance cellulaire a été évoquée. Ce travail a cherché à préciser le rôle de Dnmt2 dans la régulation de l'activité de l'ARN polymérase II via l'intervention des petits ARNs.

Ce travail a affirmé le rôle de Dnmt2 dans la régulation transcriptionnelle de gènes impliqués dans la croissance cellulaire.

Dnmt2 stabilise le complexe P-TEFb-Rn7sk en méthylant Rn7sk. Ce complexe exerce une fonction inhibitrice sur l'ARN polymérase II, empêchant sa phosphorylation, et donc son activité transcriptionnelle sur des gènes déterminant une hypertrophie cardiaque. Ainsi, la délétion constitutionnelle de Dnmt2 est à l'origine d'une moindre méthylation de Rn7sk, d'une activation de P-TEFb, d'une phosphorylation de l'ARN polymérase II et d'un phénotype d'hypertrophie ventriculaire gauche excentrique isolée.

Dnmt2 apparaît ainsi essentielle pour limiter la différenciation cardiaque durant la période embryonnaire, et empêcher l'hypertrophie cardiaque à l'âge adulte, par l'intermédiaire de la méthylation d'ARNs non codants.

DISCUSSION GENERALE

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Malgré les progrès récents faits en terme de prise en charge de l'infarctus du myocarde, le pronostic des patients reste encore défavorable sur le long terme. Après un IDM, les mécanismes de réparation cardiaque sont insuffisants pour permettre la régénération du myocarde ad integrum. Dans cette pathologie, la médecine régénérative a pour objectif de stimuler l'angiogenèse coronaire, afin d'améliorer la qualité de vie et la survie de ces patients. Jusqu'à présent, les essais cliniques se sont montrés décevants, soulignant la nécessité d'une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires dirigeant le processus de réparation cardiaque. Notre travail s'est principalement intéressé à des gènes impliqués dans l'angiogenèse coronaire embryonnaire et/ou à l'âge adulte : *PPAR β/δ* , *Wt1* et *Cyp51* (Wagner N et al., 2009 ; Keber R et al., 2011 ; Wagner KD et al., 2002). L'utilisation de modèles de souris transgéniques dont la modulation de l'expression des gènes se fait spécifiquement dans la lignée endothéliale nous a permis d'aborder la question de l'angiogenèse sous un nouvel angle : celui des interactions entre cellules endothéliales et cardiomyocytes.

A l'état basal, la surexpression de *PPAR β/δ* , isoforme la moins étudiée de cette famille de récepteurs nucléaires, provoque une activation de l'angiogenèse associée à une hypertrophie ventriculaire gauche. En post-IDM, notre étude ne retrouve pas d'effet cardioprotecteur par surexpression du gène, et cela malgré une augmentation de la densité vasculaire coronaire. De plus, le remodelage cardiaque et la taille de l'IDM semblent plus importants lorsque le gène est surexprimé. Ces résultats justifient une utilisation prudente des agonistes *PPAR β/δ* , tout particulièrement dans la pathologie cardiovasculaire ou chez le sujet à risque.

L'inactivation de *Wt1* n'a aucune conséquence sur la structure et la fonction cardiaques basales. Réexprimé en post-IDM, *Wt1* est nécessaire à l'angiogenèse dans la réparation cardiaque. En effet, sa délétion est responsable d'une moindre densité coronaire, d'une hypoxie tissulaire et d'un remodelage cardiaque pathologique, en faisant une cible intéressante dans la réparation cardiaque post-IDM.

Cyp51 est indispensable au fonctionnement cardiaque normal. Avant toute lésion myocardique, l'inactivation du gène a pour conséquence une rupture des jonctions cellulaires endothéliales et une désorganisation marquée de l'endothélium coronaire. Nous faisons l'hypothèse qu'une diminution de la concentration du cholestérol

membranaire, et/ou une accumulation de précurseurs toxiques du lanostérol dans les membranes endothéliales en sont la cause. Suite à la délétion de *Cyp51*, notre étude objective une activation endothéliale et l'apparition d'un phénotype d'insuffisance cardiaque avec cardiopathie dilatée. De ce fait, nous avons concentré notre étude sur les conditions basales, c'est-à-dire avant la ligature coronaire chirurgicale.

Enfin, notre travail sur *Dnmt2* a permis améliorer la compréhension des mécanismes à l'origine de la cardiopathie hypertrophique, *Dnmt2* modulant l'activité transcriptionnelle par le biais de petits ARNs.

L'originalité de ce travail repose sur la modulation endothéliale de l'expression des gènes *PPAR β/δ* , *Wt1* et *Cyp51*.

Selon le modèle utilisé, une variation dans l'intensité de la réponse angiogénique n'aboutit pas aux mêmes effets structurels et fonctionnels cardiaques. En cas de surexpression endothéliale de *PPAR β/δ* , une angiogenèse plus intense est associée à une hypertrophie cardiaque et à un remodelage cardiaque plus marqué en post-IDM. Après délétion de *Wt1*, une angiogenèse diminuée s'accompagne d'un remodelage cardiaque plus intense en post-IDM. Il en est de même à l'état basal après invalidation de *Cyp51*. L'angiogenèse apparaît donc comme un processus complexe faisant intervenir de nombreuses voies moléculaires déterminant des réponses phénotypiques différentes. Ainsi, une plus forte densité vasculaire n'est pas forcément synonyme d'amélioration fonctionnelle cardiaque. En effet, une régulation fine de la synthèse des différents facteurs angiogéniques, ainsi qu'une phase de maturation vasculaire sont nécessaires à la formation de vaisseaux sanguins fonctionnels. Les liens existant entre angiogenèse et contractilité cardiaque ont été évoqués dans la cardiopathie du péri-partum où un environnement anti-angiogénique est responsable d'une insuffisance cardiaque de mauvais pronostic chez la femme enceinte (Patten IS et al., 2012).

Notre travail insiste également sur l'importance des interactions entre cellules endothéliales et cardiomyocytes dans le fonctionnement cardiaque, à l'état basal (modèles *PPAR β/δ* et *Cyp51*) et dans la réparation cardiaque en post-IDM (modèles *PPAR β/δ* et *Wt1*). Le couple cellule endothéliale/cardiomyocyte est étroitement lié sur le plan physique et fonctionnel. En physiologie, il détermine de nombreuses fonctions, dont la contractilité des cardiomyocytes et le tonus vasomoteur, par la sécrétion de facteurs paracrines (Brutsaert DL et al., 2003 ; Leucker TM et al., 2011). Dans notre étude,

l'invalidation endothéliale de *Cyp51* est rapidement responsable d'une dilatation ventriculaire gauche avec altération sévère de la fonction contractile. Nous supposons qu'une activation de l'endothélium coronaire est responsable d'une modification du métabolisme et de la fonction des cellules endothéliales en l'absence de *Cyp51*. En conséquence, la quantité d'oxygène et de nutriments disponibles pour les cardiomyocytes est réduite, entraînant des modifications métaboliques et fonctionnelles dans les cellules contractiles (Winegrad S et al., 1998). De plus, la dysfonction endothéliale peut être à l'origine d'un défaut de signalisation à destination des cardiomyocytes, participant à la dysfonction contractile observée. Cette hypothèse nécessite d'être évaluée par des expériences ultérieures, visant à identifier d'éventuelles cellules endothéliales apoptotiques et à confirmer la dysfonction endothéliale. Des analyses réalisées à partir de cellules endothéliales sélectionnées par FACS identifieront les gènes cibles de *Cyp51*. Ces expériences, reproduites dans le modèle *Wt1*, permettront de confirmer les gènes-cibles identifiés dans notre travail, et ainsi de mieux appréhender les interactions cellulaires entre endothélium et cardiomyocytes dans ces deux modèles.

Par la suite, nous étudierons les conséquences d'une invalidation de *Cyp51* sur la réparation cardiaque en post-IDM.

En conclusion, notre travail a confirmé la complexité du processus d'angiogenèse en post-IDM et le caractère indispensable d'une communication entre cellules endothéliales et cardiomyocytes à l'état basal comme dans la réparation cardiaque. Les mécanismes moléculaires médiant les effets des gènes *Wt1* et *Cyp51* seront précisés par des analyses réalisées dans une population sélectionnée de cellules endothéliales.

Si notre travail s'est focalisé sur l'angiogenèse en post-IDM, les applications thérapeutiques d'une modulation de l'angiogenèse ne se limitent pas au post-IDM. L'inhibition des mécanismes pro-angiogéniques est une voie d'avenir dans la pathologie tumorale de façon à limiter l'extension locale et la dissémination tumorale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdollahi A, Schwager C, Kleeff J, Esposito I, Domhan S, Peschke P, et al. Transcriptional network governing the angiogenic switch in human pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jul 31;104(31):12890–5.

Abdurrachim D, Luiken JJFP, Nicolay K, Glatz JFC, Prompers JJ, Nabben M. Good and bad consequences of altered fatty acid metabolism in heart failure: evidence from mouse models. *Cardiovasc Res*. 2015 May 1;106(2):194–205.

Ajith TA, Jayakumar TG. Peroxisome proliferator-activated receptors in cardiac energy metabolism and cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2016 Jul;43(7):649–58.

Altieri P, Spallarossa P, Barisione C, Garibaldi S, Garuti A, Fabbi P, et al. Inhibition of doxorubicin-induced senescence by PPAR δ activation agonists in cardiac muscle cells: cooperation between PPAR δ and Bcl6. *PLoS One*. 2012;7(9):e46126.

Anzai A, Anzai T, Nagai S, Maekawa Y, Naito K, Kaneko H, et al. Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling. *Circulation*. 2012 Mar 13;125(10):1234–45.

Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, et al. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res*. 1998 Aug 10;83(3):233–40.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997 Feb 14;275(5302):964–7.

Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet Lond Engl*. 2003 Aug 30;362(9385):697–703.

Avolio E, Meloni M, Spencer HL, Riu F, Katare R, Mangialardi G, et al. Combined intramyocardial delivery of human pericytes and cardiac stem cells additively improves the healing of mouse infarcted hearts through stimulation of vascular and muscular repair. *Circ Res*. 2015 May 8;116(10):e81–94.

Ayee MA, Levitan I. Paradoxical impact of cholesterol on lipid packing and cell stiffness. *Front Biosci Landmark Ed*. 2016 Jun 1;21:1245–59.

Bakhaï A, Ferrieres J, Iñiguez A, Sartral M, Belger M, Schmitt C, et al. Clinical outcomes, resource use, and costs at 1 year in patients with acute coronary syndrome undergoing PCI: results from the multinational APTOR registry. *J Intervent Cardiol*. 2012 Feb;25(1):19–27.

Banke NH, Wende AR, Leone TC, O'Donnell JM, Abel ED, Kelly DP, et al. Preferential oxidation of triacylglyceride-derived fatty acids in heart is augmented by the nuclear receptor PPARalpha. *Circ Res*. 2010 Jul 23;107(2):233-41.

Barish GD, Atkins AR, Downes M, Olson P, Chong L-W, Nelson M, et al. PPARdelta regulates multiple proinflammatory pathways to suppress atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Mar 18;105(11):4271-6.

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003 Sep 19;114(6):763-76.

Beohar N, Rapp J, Pandya S, Losordo DW. Rebuilding the damaged heart: the potential of cytokines and growth factors in the treatment of ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Oct 12;56(16):1287-97.

Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*. 2009 Apr 3;324(5923):98-102.

Bergmann O, Zdunek S, Felker A, Salehpour M, Alkass K, Bernard S, et al. Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell*. 2015 Jun 18;161(7):1566-75.

Bleumink GS, Knetsch AM, Sturkenboom MCJM, Straus SMJM, Hofman A, Deckers JW, et al. Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study. *Eur Heart J*. 2004 Sep;25(18):1614-9.

Brutsaert DL. Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiol Rev*. 2003 Jan;83(1):59-115.

Burkart EM, Sambandam N, Han X, Gross RW, Courtois M, Gierasch CM, et al. Nuclear receptors PPARbeta/delta and PPARalpha direct distinct metabolic regulatory programs in the mouse heart. *J Clin Invest*. 2007 Dec;117(12):3930-9.

Camenisch G, Pisabarro MT, Sherman D, Kowalski J, Nagel M, Hass P, et al. ANGPTL3 stimulates endothelial cell adhesion and migration via integrin alpha vbeta 3 and induces blood vessel formation in vivo. *J Biol Chem*. 2002 May 10;277(19):17281-90.

Canatan H. The effect of cardiac ischemic preconditioning on rat left ventricular gene expression profile. *Cell Biochem Funct*. 2008 Apr;26(2):179-84.

Cao R, Eriksson A, Kubo H, Alitalo K, Cao Y, Thyberg J. Comparative evaluation of FGF-2-, VEGF-A-, and VEGF-C-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability. *Circ Res*. 2004 Mar 19;94(5):664-70.

Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011 May 19;473(7347):298-307.

Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):653-60.

Champion HC, Georgakopoulos D, Takimoto E, Isoda T, Wang Y, Kass DA. Modulation of in vivo cardiac function by myocyte-specific nitric oxide synthase-3. *Circ Res.* 2004 Mar 19;94(5):657–63.

Chen J, Normand S-LT, Wang Y, Krumholz HM. National and regional trends in heart failure hospitalization and mortality rates for Medicare beneficiaries, 1998-2008. *JAMA.* 2011 Oct 19;306(15):1669–78.

Chen Z-C, Chen L-J, Cheng J-T. Doxorubicin-Induced Cardiac Toxicity Is Mediated by Lowering of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor δ Expression in Rats. *PPAR Res.* 2013;2013:456042.

Cheng L, Ding G, Qin Q, Huang Y, Lewis W, He N, et al. Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. *Nat Med.* 2004 Nov;10(11):1245–50.

Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al.* 2000 Oct;49(10):497–505.

Chong CR, Xu J, Lu J, Bhat S, Sullivan DJ, Liu JO. Inhibition of angiogenesis by the antifungal drug itraconazole. *ACS Chem Biol.* 2007 Apr 24;2(4):263–70.

Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. 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.* 2000 Mar 1;35(3):569–82.

Dai Z, Aoki T, Fukumoto Y, Shimokawa H. Coronary perivascular fibrosis is associated with impairment of coronary blood flow in patients with non-ischemic heart failure. *J Cardiol.* 2012 Nov;60(5):416–21.

Dehbi M, Hiscott J, Pelletier J. Activation of the wt1 Wilms' tumor suppressor gene by NF-kappaB. *Oncogene.* 1998 Apr 23;16(16):2033–9.

Deng L, Hu S, Baydoun AR, Chen J, Chen X, Cong X. Aspirin induces apoptosis in mesenchymal stem cells requiring Wnt/beta-catenin pathway. *Cell Prolif.* 2009 Dec;42(6):721–30.

Depre C, Vanoverschelde JL, Taegtmeyer H. Glucose for the heart. *Circulation.* 1999 Feb 2;99(4):578–88.

Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* 1999 Oct;20(5):649–88.

Desvergne B, Michalik L, Wahli W. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev.* 2006 Apr;86(2):465–514.

Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, et al. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res*. 2005 Apr 29;96(8):881–9.

Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. 2011 Oct;51(4):600–6.

Drenckhahn J-D, Schwarz QP, Gray S, Laskowski A, Kiriazis H, Ming Z, et al. Compensatory growth of healthy cardiac cells in the presence of diseased cells restores tissue homeostasis during heart development. *Dev Cell*. 2008 Oct;15(4):521–33.

Duim SN, Kurakula K, Goumans M-J, Kruithof BPT. Cardiac endothelial cells express Wilms' tumor-1: Wt1 expression in the developing, adult and infarcted heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2015 Apr;81:127–35.

Dumont DJ, Yamaguchi TP, Conlon RA, Rossant J, Breitman ML. tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene*. 1992 Aug;7(8):1471–80.

d'Uscio LV, He T, Santhanam AVR, Tai L-J, Evans RM, Katusic ZS. Mechanisms of vascular dysfunction in mice with endothelium-specific deletion of the PPAR- δ gene. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014 Apr 1;306(7):H1001-1010.

el Azzouzi H, Leptidis S, Dirkx E, Hoeks J, van Bree B, Brand K, et al. The hypoxia-inducible microRNA cluster miR-199a~214 targets myocardial PPAR δ and impairs mitochondrial fatty acid oxidation. *Cell Metab*. 2013 Sep 3;18(3):341–54.

Ellison GM, Vicinanza C, Smith AJ, Aquila I, Leone A, Waring CD, et al. Adult c-kit(pos) cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair. *Cell*. 2013 Aug 15;154(4):827–42.

Ertl G, Frantz S. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2005 Apr 1;66(1):22–32.

Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):669–76.

Fichtlscherer S, Breuer S, Zeiher AM. Prognostic value of systemic endothelial dysfunction in patients with acute coronary syndromes: further evidence for the existence of the “vulnerable” patient. *Circulation*. 2004 Oct 5;110(14):1926–32.

Fillmore N, Mori J, Lopaschuk GD. Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure, ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy. *Br J Pharmacol*. 2014 Apr;171(8):2080–90.

Fisher SA, Zhang H, Doree C, Mathur A, Martin-Rendon E. Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Sep 30;(9):CD006536.

Flamme I, Frölich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol.* 1997 Nov;173(2):206–10.

Forde A, Constien R, Gröne H-J, Hämmerling G, Arnold B. Temporal Cre-mediated recombination exclusively in endothelial cells using Tie2 regulatory elements. *Genes N Y N* 2000. 2002 Aug;33(4):191–7.

Fox KAA, Carruthers KF, Dunbar DR, Graham C, Manning JR, De Raedt H, et al. Underestimated and under-recognized: the late consequences of acute coronary syndrome (GRACE UK-Belgian Study). *Eur Heart J.* 2010 Nov;31(22):2755–64.

Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, et al. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation.* 1998 Aug 18;98(7):699–710.

Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol.* 2014 May;11(5):255–65.

Gale NW, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev.* 1999 May 1;13(9):1055–66.

Garbern JC, Lee RT. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell Stem Cell.* 2013 Jun 6;12(6):689–98.

Gertz EW, Wisneski JA, Stanley WC, Neese RA. Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon-labeled carbohydrate isotope experiments. *J Clin Invest.* 1988 Dec;82(6):2017–25.

Gilde AJ, van der Lee KAJM, Willemsen PHM, Chinetti G, van der Leij FR, van der Vusse GJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circ Res.* 2003 Mar 21;92(5):518–24.

Gittenberger-de Groot AC, Vrancken Peeters MP, Mentink MM, Gourdie RG, Poelmann RE. Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions. *Circ Res.* 1998 Jun 1;82(10):1043–52.

Goldberg IJ, Trent CM, Schulze PC. Lipid metabolism and toxicity in the heart. *Cell Metab.* 2012 Jun 6;15(6):805–12.

Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:481–514.

Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh C-L, Zhang X, et al. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science.* 2006 Jan 20;311(5759):395–8.

Gorin A, Gabitova L, Astsaturov I. Regulation of cholesterol biosynthesis and cancer signaling. *Curr Opin Pharmacol*. 2012 Dec;12(6):710–6.

Grego-Bessa J, Luna-Zurita L, del Monte G, Bolós V, Melgar P, Arandilla A, et al. Notch signaling is essential for ventricular chamber development. *Dev Cell*. 2007 Mar;12(3):415–29.

Haber DA, Buckler AJ, Glaser T, Call KM, Pelletier J, Sohn RL, et al. An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell*. 1990 Jun 29;61(7):1257–69.

Haffar T, Bérubé-Simard F-A, Boussette N. Cardiomyocyte lipotoxicity is mediated by Il-6 and causes down-regulation of PPARs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Mar 27;459(1):54–9.

Hammes A, Guo JK, Lutsch G, Leheste JR, Landrock D, Ziegler U, et al. Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell*. 2001 Aug 10;106(3):319–29.

Han J-K, Lee H-S, Yang H-M, Hur J, Jun S-I, Kim J-Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta agonist enhances vasculogenesis by regulating endothelial progenitor cells through genomic and nongenomic activations of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Circulation*. 2008 Sep 2;118(10):1021–33.

Hanssen M, Cottin Y, Khalife K, Hammer L, Goldstein P, Puymirat E, et al. French Registry on Acute ST-elevation and non ST-elevation Myocardial Infarction 2010. *FAST-MI 2010*. *Heart Br Card Soc*. 2012 May;98(9):699–705.

Heather LC, Pates KM, Atherton HJ, Cole MA, Ball DR, Evans RD, et al. Differential translocation of the fatty acid transporter, FAT/CD36, and the glucose transporter, GLUT4, coordinates changes in cardiac substrate metabolism during ischemia and reperfusion. *Circ Heart Fail*. 2013 Sep 1;6(5):1058–66.

Hedman M, Muona K, Hedman A, Kivelä A, Syväne M, Eränen J, et al. Eight-year safety follow-up of coronary artery disease patients after local intracoronary VEGF gene transfer. *Gene Ther*. 2009 May;16(5):629–34.

Heilmann C, von Samson P, Schlegel K, Attmann T, von Specht BU, Beyersdorf F, et al. Comparison of protein with DNA therapy for chronic myocardial ischemia using fibroblast growth factor-2. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg*. 2002 Dec;22(6):957–64.

Heinl-Green A, Radke PW, Munkonge FM, Frass O, Zhu J, Vincent K, et al. The efficacy of a “master switch gene” HIF-1alpha in a porcine model of chronic myocardial ischaemia. *Eur Heart J*. 2005 Jul;26(13):1327–32.

Heinzel FR, MacQuaide N, Biesmans L, Sipido K. Dyssynchrony of Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum as subcellular mechanism of cardiac contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol*. 2011 Mar;50(3):390–400.

Hirano K, Ikeda Y, Zaima N, Sakata Y, Matsumiya G. Triglyceride deposit cardiomyovasculopathy. *N Engl J Med*. 2008 Nov 27;359(22):2396–8.

Ho E, Shimada Y. Formation of the epicardium studied with the scanning electron microscope. *Dev Biol*. 1978 Oct;66(2):579–85.

Hofmann U, Beyersdorf N, Weirather J, Podolskaya A, Bauersachs J, Ertl G, et al. Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2012 Apr 3;125(13):1652–63.

Horckmans M, Ring L, Duchene J, Santovito D, Schloss MJ, Drechsler M, et al. Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype. *Eur Heart J*. 2016 Feb 2;

Horn MA, Trafford AW. Aging and the cardiac collagen matrix: Novel mediators of fibrotic remodelling. *J Mol Cell Cardiol*. 2016 Apr;93:175–85.

Hsieh PCH, Davis ME, Gannon J, MacGillivray C, Lee RT. Controlled delivery of PDGF-BB for myocardial protection using injectable self-assembling peptide nanofibers. *J Clin Invest*. 2006 Jan;116(1):237–48.

Hubbard T, Barker D, Birney E, Cameron G, Chen Y, Clark L, et al. The Ensembl genome database project. *Nucleic Acids Res*. 2002 Jan 1;30(1):38–41.

Huff V. Wilms' tumours: about tumour suppressor genes, an oncogene and a chameleon gene. *Nat Rev Cancer*. 2011 Feb;11(2):111–21.

Huq MDM, Tsai N-P, Gupta P, Wei L-N. Regulation of retinal dehydrogenases and retinoic acid synthesis by cholesterol metabolites. *EMBO J*. 2006 Jul 12;25(13):3203–13.

Hur J, Yoon C-H, Kim H-S, Choi J-H, Kang H-J, Hwang K-K, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Feb;24(2):288–93.

Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990 Oct 18;347(6294):645–50.

Iwasaki H, Kawamoto A, Tjwa M, Horii M, Hayashi S, Oyamada A, et al. PlGF repairs myocardial ischemia through mechanisms of angiogenesis, cardioprotection and recruitment of myo-angiogenic competent marrow progenitors. *PloS One*. 2011;6(9):e24872.

Jaffer FA, Sosnovik DE, Nahrendorf M, Weissleder R. Molecular imaging of myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2006 Dec;41(6):921–33.

Jayawardena TM, Finch EA, Zhang L, Zhang H, Hodgkinson CP, Pratt RE, et al. MicroRNA induced cardiac reprogramming in vivo: evidence for mature cardiac myocytes and improved cardiac function. *Circ Res*. 2015 Jan 30;116(3):418–24.

Jeltsch A, Nellen W, Lyko F. Two substrates are better than one: dual specificities for Dnmt2 methyltransferases. *Trends Biochem Sci*. 2006 Jun;31(6):306–8.

Jernberg T, Johanson P, Held C, Svennblad B, Lindbäck J, Wallentin L, et al. Association between adoption of evidence-based treatment and survival for patients with ST-elevation myocardial infarction. *JAMA*. 2011 Apr 27;305(16):1677–84.

Jopling C, Sleep E, Raya M, Martí M, Raya A, Izpisua Belmonte JC. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*. 2010 Mar 25;464(7288):606–9.

Jürgensen JS, Rosenberger C, Wiesener MS, Warnecke C, Hörstrup JH, Gräfe M, et al. Persistent induction of HIF-1alpha and -2alpha in cardiomyocytes and stromal cells of ischemic myocardium. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2004 Sep;18(12):1415–7.

Kain V, Prabhu SD, Halade GV. Inflammation revisited: inflammation versus resolution of inflammation following myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2014;109(6):444.

Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, Li P, Cheng W, Meggs LG, et al. Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol*. 1997 Mar;29(3):859–70.

Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 21;95(15):8801–5.

Kajstura J, Urbanek K, Perl S, Hosoda T, Zheng H, Ogórek B, et al. Cardiomyogenesis in the adult human heart. *Circ Res*. 2010 Jul 23;107(2):305–15.

Kanashiro-Takeuchi RM, Schulman IH, Hare JM. Pharmacologic and genetic strategies to enhance cell therapy for cardiac regeneration. *J Mol Cell Cardiol*. 2011 Oct;51(4):619–25.

Kastner P, Messaddeq N, Mark M, Wendling O, Grondona JM, Ward S, et al. Vitamin A deficiency and mutations of RXRalpha, RXRbeta and RARalpha lead to early differentiation of embryonic ventricular cardiomyocytes. *Dev Camb Engl*. 1997 Dec;124(23):4749–58.

Katuri V, Gerber S, Qiu X, McCarty G, Goldstein SD, Hammers H, et al. WT1 regulates angiogenesis in Ewing Sarcoma. *Oncotarget*. 2014 May 15;5(9):2436–49.

Katz TC, Singh MK, Degenhardt K, Rivera-Feliciano J, Johnson RL, Epstein JA, et al. Distinct compartments of the proepicardial organ give rise to coronary vascular endothelial cells. *Dev Cell*. 2012 Mar 13;22(3):639–50.

Keber R, Motaln H, Wagner KD, Debeljak N, Rassoulzadegan M, Ačimovič J, et al. Mouse knockout of the cholesterologenic cytochrome P450 lanosterol 14alpha-demethylase (Cyp51) resembles Antley-Bixler syndrome. *J Biol Chem*. 2011 Aug 19;286(33):29086–97.

Kiani J, Grandjean V, Liebers R, Tuorto F, Ghanbarian H, Lyko F, et al. RNA-mediated epigenetic heredity requires the cytosine methyltransferase Dnmt2. *PLoS Genet.* 2013 May;9(5):e1003498.

Kienesberger PC, Pulinilkunnil T, Nagendran J, Dyck JRB. Myocardial triacylglycerol metabolism. *J Mol Cell Cardiol.* 2013 Feb;55:101–10.

Kilian EG, Sadoni S, Vicol C, Kelly R, van Hulst K, Schwaiger M, et al. Myocardial transfection of hypoxia inducible factor-1alpha via an adenoviral vector during coronary artery bypass grafting. - A multicenter phase I and safety study -. *Circ J Off J Jpn Circ Soc.* 2010 May;74(5):916–24.

Kim H, Cho H-J, Kim S-W, Liu B, Choi YJ, Lee J, et al. CD31+ cells represent highly angiogenic and vasculogenic cells in bone marrow: novel role of nonendothelial CD31+ cells in neovascularization and their therapeutic effects on ischemic vascular disease. *Circ Res.* 2010 Sep 3;107(5):602–14.

Kim S-W, Houge M, Brown M, Davis ME, Yoon Y-S. Cultured human bone marrow-derived CD31(+) cells are effective for cardiac and vascular repair through enhanced angiogenic, adhesion, and anti-inflammatory effects. *J Am Coll Cardiol.* 2014 Oct 21;64(16):1681–94.

Kolwicz SC, Purohit S, Tian R. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res.* 2013 Aug 16;113(5):603–16.

Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, et al. WT-1 is required for early kidney development. *Cell.* 1993 Aug 27;74(4):679–91.

Kukuła K, Chojnowska L, Dąbrowski M, Witkowski A, Chmielak Z, Skwarek M, et al. Intramyocardial plasmid-encoding human vascular endothelial growth factor A165/basic fibroblast growth factor therapy using percutaneous transcatheter approach in patients with refractory coronary artery disease (VIF-CAD). *Am Heart J.* 2011 Mar;161(3):581–9.

Kuramochi Y, Cote GM, Guo X, Lebrasseur NK, Cui L, Liao R, et al. Cardiac endothelial cells regulate reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis through neuregulin-1beta/erbB4 signaling. *J Biol Chem.* 2004 Dec 3;279(49):51141–7.

Laflamme MA, Murry CE. Regenerating the heart. *Nat Biotechnol.* 2005 Jul;23(7):845–56.

Laflamme MA, Murry CE. Heart regeneration. *Nature.* 2011 May 19;473(7347):326–35.

Lange Y, Steck TL. Active membrane cholesterol as a physiological effector. *Chem Phys Lipids.* 2016 Sep;199:74–93.

Larsson SH, Charlieu JP, Miyagawa K, Engelkamp D, Rassoulzadegan M, Ross A, et al. Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell.* 1995 May 5;81(3):391–401.

Lavine KJ, Kovacs A, Ornitz DM. Hedgehog signaling is critical for maintenance of the adult coronary vasculature in mice. *J Clin Invest.* 2008 Jul;118(7):2404–14.

Lavine KJ, Yu K, White AC, Zhang X, Smith C, Partanen J, et al. Endocardial and epicardial derived FGF signals regulate myocardial proliferation and differentiation in vivo. *Dev Cell*. 2005 Jan;8(1):85–95.

Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ Res*. 2010 Jun 11;106(11):1675–80.

Leblond A-L, Klinkert K, Martin K, Turner EC, Kumar AH, Browne T, et al. Systemic and Cardiac Depletion of M2 Macrophage through CSF-1R Signaling Inhibition Alters Cardiac Function Post Myocardial Infarction. *PloS One*. 2015;10(9):e0137515.

Lee AG. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Nov 3;1666(1–2):62–87.

Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med*. 2000 Mar 2;342(9):626–33.

Lee W-S, Kim J. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and the Heart: Lessons from the Past and Future Directions. *PPAR Res*. 2015;2015:271983.

Lemmens K, Fransen P, Sys SU, Brutsaert DL, De Keulenaer GW. Neuregulin-1 induces a negative inotropic effect in cardiac muscle: role of nitric oxide synthase. *Circulation*. 2004 Jan 27;109(3):324–6.

Lerman A, Cannan CR, Higano SH, Nishimura RA, Holmes DR. Coronary vascular remodeling in association with endothelial dysfunction. *Am J Cardiol*. 1998 May 1;81(9):1105–9.

Leucker TM, Bienengraeber M, Muravyeva M, Baotic I, Weihrauch D, Brzezinska AK, Warltier DC, Kersten JR, Pratt PF Jr. Endothelial-cardiomyocyte crosstalk enhances pharmacological cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*. 2011 Nov;51(5):803–11.

Li M, Pascual G, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol*. 2000 Jul;20(13):4699–707.

Lin H, Parmacek MS, Morle G, Bolling S, Leiden JM. Expression of recombinant genes in myocardium in vivo after direct injection of DNA. *Circulation*. 1990 Dec;82(6):2217–21.

Liu J, Wang P, Luo J, Huang Y, He L, Yang H, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ activation in adult hearts facilitates mitochondrial function and cardiac performance under pressure-overload condition. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2011 Feb;57(2):223–30.

Liu L, Shi X, Bharadwaj KG, Ikeda S, Yamashita H, Yagyu H, et al. DGAT1 expression increases heart triglyceride content but ameliorates lipotoxicity. *J Biol Chem*. 2009 Dec 25;284(52):36312–23.

Liu Q, Docherty JC, Rendell JCT, Clanachan AS, Lopaschuk GD. High levels of fatty acids delay the recovery of intracellular pH and cardiac efficiency in post-ischemic hearts by inhibiting glucose oxidation. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Feb 20;39(4):718–25.

Liu X, Gu X, Li Z, Li X, Li H, Chang J, et al. Neuregulin-1/erbB-activation improves cardiac function and survival in models of ischemic, dilated, and viral cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Oct 3;48(7):1438–47.

Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Aug 20;99(17):11205–10.

Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CDL, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*. 2010 Jan;90(1):207–58.

Luquet S, Lopez-Soriano J, Holst D, Fredenrich A, Melki J, Rassoulzadegan M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2003 Dec;17(15):2299–301.

Lyngbaek S, Schneider M, Hansen JL, Sheikh SP. Cardiac regeneration by resident stem and progenitor cells in the adult heart. *Basic Res Cardiol*. 2007 Mar;102(2):101–14.

Madonna R, Van Laake LW, Davidson SM, Engel FB, Hausenloy DJ, Lecour S, et al. Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group Cellular Biology of the Heart: cell-based therapies for myocardial repair and regeneration in ischemic heart disease and heart failure. *Eur Heart J*. 2016 Jun 14;37(23):1789–98.

Makki MS, Heinzl T, Englert C. TSA downregulates Wilms tumor gene 1 (Wt1) expression at multiple levels. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jul;36(12):4067–78.

Manaenko A, Chen H, Kammer J, Zhang JH, Tang J. Comparison Evans Blue injection routes: Intravenous versus intraperitoneal, for measurement of blood-brain barrier in a mice hemorrhage model. *J Neurosci Methods*. 2011 Feb 15;195(2):206–10.

Männer J, Pérez-Pomares JM, Macías D, Muñoz-Chápuli R. The origin, formation and developmental significance of the epicardium: a review. *Cells Tissues Organs*. 2001;169(2):89–103.

Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2011 Jul 25;11(8):519–31.

Mariani JA, Smolic A, Prevolos A, Byrne MJ, Power JM, Kaye DM. Augmentation of left ventricular mechanics by recirculation-mediated AAV2/1-SERCA2a gene delivery in experimental heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2011 Mar;13(3):247–53.

Martínez-Estrada OM, Lettice LA, Essafi A, Guadix JA, Slight J, Velecela V, et al. Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nat Genet*. 2010 Jan;42(1):89–93.

Mauritz C, Schwanke K, Reppel M, Neef S, Katsirntaki K, Maier LS, et al. Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 2008 Jul 29;118(5):507–17.

McCarty G, Awad O, Loeb DM. WT1 protein directly regulates expression of vascular endothelial growth factor and is a mediator of tumor response to hypoxia. *J Biol Chem*. 2011 Dec 23;286(51):43634–43.

McManus DD, Gore J, Yarzebski J, Spencer F, Lessard D, Goldberg RJ. Recent trends in the incidence, treatment, and outcomes of patients with STEMI and NSTEMI. *Am J Med*. 2011 Jan;124(1):40–7.

Menasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, et al. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation*. 2008 Mar 4;117(9):1189–200.

Menasché P, Vanneaux V, Haguège A, Bel A, Cholley B, Cacciapuoti I, et al. Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *Eur Heart J*. 2015 Aug 7;36(30):2011–7.

Merki E, Zamora M, Raya A, Kawakami Y, Wang J, Zhang X, et al. Epicardial retinoid X receptor alpha is required for myocardial growth and coronary artery formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 20;102(51):18455–60.

Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*. 2004 Oct 29;95(9):911–21.

Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jul 18;92(15):6991–5.

Mill JG, Stefanon I, Leite CM, Vassallo DV. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovasc Res*. 1990 Sep;24(9):748–53.

Möller MN, Li Q, Chinnaraj M, Cheung HC, Lancaster JR, Denicola A. Solubility and diffusion of oxygen in phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Nov;1858(11):2923–30.

Moore AW, Schedl A, McInnes L, Doyle M, Hecksher-Sorensen J, Hastie ND. YAC transgenic analysis reveals Wilms' tumour 1 gene activity in the proliferating coelomic epithelium, developing diaphragm and limb. *Mech Dev*. 1998 Dec;79(1–2):169–84.

Morita S, Oka Y, Tsuboi A, Kawakami M, Maruno M, Izumoto S, et al. A phase I/II trial of a WT1 (Wilms' tumor gene) peptide vaccine in patients with solid malignancy: safety assessment based on the phase I data. *Jpn J Clin Oncol*. 2006 Apr;36(4):231–6.

Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2015 Jan 27;131(4):e29-322.

Münzel T, Gori T, Bruno RM, Taddei S. Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease? *Eur Heart J*. 2010 Nov;31(22):2741-8.

Murakami M, Simons M. Fibroblast growth factor regulation of neovascularization. *Curr Opin Hematol*. 2008 May;15(3):215-20.

Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, Okita K, Kim B, Matsuoka S, et al. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 2008 Jul 29;118(5):498-506.

Natoli TA, McDonald A, Alberta JA, Taglienti ME, Housman DE, Kreidberg JA. A mammal-specific exon of WT1 is not required for development or fertility. *Mol Cell Biol*. 2002 Jun;22(12):4433-8.

Neely JR, Rovetto MJ, Oram JF. Myocardial utilization of carbohydrate and lipids. *Prog Cardiovasc Dis*. 1972 Dec;15(3):289-329.

Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Mar 1;4(3).

Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet*. 1998 Jul;19(3):219-20.

Onimaru M, Yonemitsu Y, Fujii T, Tanii M, Nakano T, Nakagawa K, et al. VEGF-C regulates lymphangiogenesis and capillary stability by regulation of PDGF-B. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Nov;297(5):H1685-1696.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001 Apr 5;410(6829):701-5.

Palomer X, Capdevila-Busquets E, Botteri G, Salvadó L, Barroso E, Davidson MM, et al. PPAR β/δ attenuates palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and induces autophagic markers in human cardiac cells. *Int J Cardiol*. 2014 Jun 1;174(1):110-8.

Park JR, Ahn JH, Jung MH, Koh J-S, Park Y, Hwang S-J, et al. Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- δ Agonist on Cardiac Healing after Myocardial Infarction. *PLoS One*. 2016;11(2):e0148510.

Pascual F, Coleman RA. Fuel availability and fate in cardiac metabolism: A tale of two substrates. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Oct;1860(10):1425-33.

Patten IS, Rana S, Shahul S, Rowe GC, Jang C, Liu L, Hacker MR, Rhee JS, Mitchell J, Mahmood F, Hess P, Farrell C, Koulisis N, Khankin EV, Burke SD, Tudorache I, Bauersachs J, del Monte F, Hilfiker-Kleiner D, Karumanchi SA, Arany Z. Cardiac angiogenic imbalance leads to peripartum cardiomyopathy. *Nature*. 2012 May9;485(7398):333-8.

Paul DS, Grevengoed TJ, Pascual F, Ellis JM, Willis MS, Coleman RA. Deficiency of cardiac Acyl-CoA synthetase-1 induces diastolic dysfunction, but pathologic hypertrophy is reversed by rapamycin. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jun;1841(6):880–7.

Pérez-Pomares JM, Phelps A, Sedmerova M, Carmona R, González-Iriarte M, Muñoz-Chápuli R, et al. 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*. 2002 Jul 15;247(2):307–26.

Perman JC, Boström P, Lindbom M, Lidberg U, Ståhlman M, Hägg D, et al. The VLDL receptor promotes lipotoxicity and increases mortality in mice following an acute myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2011 Jul;121(7):2625–40.

Pesant M, Sueur S, Dutartre P, Tallandier M, Grimaldi PA, Rochette L, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta) activation protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2006 Feb 1;69(2):440–9.

Pinto AR, Ilinykh A, Ivey MJ, Kuwabara JT, D'Antoni ML, Debuque R, et al. Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res*. 2016 Feb 5;118(3):400–9.

Piqueras L, Reynolds AR, Hodivala-Dilke KM, Alfranca A, Redondo JM, Hatae T, et al. Activation of PPARbeta/delta induces endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Jan;27(1):63–9.

Pirollo JS, Hutchins GM, Moore GW. Infarct expansion: pathologic analysis of 204 patients with a single myocardial infarct. *J Am Coll Cardiol*. 1986 Feb;7(2):349–54.

Planavila A, Rodríguez-Calvo R, Jové M, Michalik L, Wahli W, Laguna JC, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta activation inhibits hypertrophy in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2005 Mar 1;65(4):832–41.

Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 2016 Jul 14;37(27):2129–200.

Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science*. 2011 Feb 25;331(6020):1078–80.

Porter JA, Young KE, Beachy PA. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science*. 1996 Oct 11;274(5285):255–9.

Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res*. 2016 Jun 24;119(1):91–112.

Puymirat E, Simon T, Steg PG, Schiele F, Guéret P, Blanchard D, et al. Association of changes in clinical characteristics and management with improvement in survival among patients with ST-elevation myocardial infarction. *JAMA*. 2012 Sep 12;308(10):998–1006.

Qian L, Huang Y, Spencer CI, Foley A, Vedantham V, Liu L, et al. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*. 2012 May 31;485(7400):593–8.

Quiñones MA, Otto CM, Stoddard M, Waggoner A, Zoghbi WA, Doppler Quantification Task Force of the Nomenclature and Standards Committee of the American Society of Echocardiography. Recommendations for quantification of Doppler echocardiography: a report from the Doppler Quantification Task Force of the Nomenclature and Standards Committee of the American Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr Off Publ Am Soc Echocardiogr*. 2002 Feb;15(2):167–84.

Raake PWJ, Schlegel P, Ksienzyk J, Reinkober J, Barthelmes J, Schinkel S, et al. AAV6.βARKct cardiac gene therapy ameliorates cardiac function and normalizes the catecholaminergic axis in a clinically relevant large animal heart failure model. *Eur Heart J*. 2013 May;34(19):1437–47.

Raher MJ, Thibault HB, Buys ES, Kuruppu D, Shimizu N, Brownell A-L, et al. A short duration of high-fat diet induces insulin resistance and predisposes to adverse left ventricular remodeling after pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Dec;295(6):H2495-2502.

Rai K, Chidester S, Zavala CV, Manos EJ, James SR, Karpf AR, et al. Dnmt2 functions in the cytoplasm to promote liver, brain, and retina development in zebrafish. *Genes Dev*. 2007 Feb 1;21(3):261–6.

Randle PJ, Newsholme EA, Garland PB. Regulation of glucose uptake by muscle. 8. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, and of alloxan-diabetes and starvation, on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles. *Biochem J*. 1964 Dec;93(3):652–65.

Reese DE, Mikawa T, Bader DM. Development of the coronary vessel system. *Circ Res*. 2002 Nov 1;91(9):761–8.

Rudat C, Kispert A. Wt1 and epicardial fate mapping. *Circ Res*. 2012 Jul 6;111(2):165–9.

Ruiz-Villalba A, Simón AM, Pogontke C, Castillo MI, Abizanda G, Pelacho B, et al. Interacting resident epicardium-derived fibroblasts and recruited bone marrow cells form myocardial infarction scar. *J Am Coll Cardiol*. 2015 May 19;65(19):2057–66.

Santhanam AVR, d’Uscio LV, He T, Katusic ZS. PPARδ agonist GW501516 prevents uncoupling of endothelial nitric oxide synthase in cerebral microvessels of hph-1 mice. *Brain Res*. 2012 Nov 5;1483:89–95.

Saudubray T, Saudubray C, Viboud C, Jondeau G, Valleron A-J, Flahault A, et al. [Prevalence and management of heart failure in France: national study among general practitioners of the Sentinelles network]. *Rev Med Interne*. 2005 Nov;26(11):845–50.

Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Jul;85(14):5166–70.

Scaglia N, Igal RA. Stearoyl-CoA desaturase is involved in the control of proliferation, anchorage-independent growth, and survival in human transformed cells. *J Biol Chem*. 2005 Jul 8;280(27):25339–49.

Schaefer M, Pollex T, Hanna K, Tuorto F, Meusburger M, Helm M, et al. RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes Dev*. 2010 Aug 1;24(15):1590–5.

Schaefer M, Steringer JP, Lyko F. The *Drosophila* cytosine-5 methyltransferase Dnmt2 is associated with the nuclear matrix and can access DNA during mitosis. *PloS One*. 2008 Jan 9;3(1):e1414.

Schaller H. The role of sterols in plant growth and development. *Prog Lipid Res*. 2003 May;42(3):163–75.

Schirmer SH, van Nooijen FC, Piek JJ, van Royen N. Stimulation of collateral artery growth: travelling further down the road to clinical application. *Heart Br Card Soc*. 2009 Mar;95(3):191–7.

Schnürch H, Risau W. Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. *Dev Camb Engl*. 1993 Nov;119(3):957–68.

Schuler M, Ali F, Chambon C, Duteil D, Bornert JM, Tardivel A, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Metzger D. PGC1alpha expression is controlled in skeletal muscles by PPARbeta, whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes. *Cell Metab*. 2006 Nov;4(5):407–14.

Schupp M, Lazar MA. Endogenous ligands for nuclear receptors: digging deeper. *J Biol Chem*. 2010 Dec 24;285(52):40409–15.

Sciesielski LK, Kirschner KM, Scholz H, Persson AB. Wilms' tumor protein Wt1 regulates the Interleukin-10 (IL-10) gene. *FEBS Lett*. 2010 Nov 19;584(22):4665–71.

Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, Yang VK, Cai L, Wang M, et al. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*. 2013 Jan 17;493(7432):433–6.

Seqqat R, Guo X, Rafiq K, Kolpakov MA, Guo J, Koch WJ, et al. Beta1-adrenergic receptors promote focal adhesion signaling downregulation and myocyte apoptosis in acute volume overload. *J Mol Cell Cardiol*. 2012 Aug;53(2):240–9.

Shearer BG, Steger DJ, Way JM, Stanley TB, Lobe DC, Grillot DA, et al. Identification and characterization of a selective peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (NR1C2) antagonist. *Mol Endocrinol Baltim Md.* 2008 Feb;22(2):523–9.

Shimazu T, Otani H, Yoshioka K, Fujita M, Okazaki T, Iwasaka T. Sepiapterin enhances angiogenesis and functional recovery in mice after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011 Nov;301(5):H2061-2072.

Shinde AV, Frangogiannis NG. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J Mol Cell Cardiol.* 2014 May;70:74–82.

Siddiqui AJ, Blomberg P, Wårdell E, Hellgren I, Eskandarpour M, Islam KB, et al. Combination of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor gene therapy enhances arteriogenesis in the ischemic myocardium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Oct 24;310(3):1002–9.

Smart N, Bollini S, Dubé KN, Vieira JM, Zhou B, Davidson S, et al. De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature.* 2011 Jun 8;474(7353):640–4.

Smolen GA, Vassileva MT, Wells J, Matunis MJ, Haber DA. SUMO-1 modification of the Wilms' tumor suppressor WT1. *Cancer Res.* 2004 Nov 1;64(21):7846–51.

Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2010 Jun;10(6):427–39.

Stamm C, Choi Y-H, Nasser B, Hetzer R. A heart full of stem cells: the spectrum of myocardial progenitor cells in the postnatal heart. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2009 Jun;3(3):215–29.

Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell.* 1996 Dec 27;87(7):1171–80.

Suzuki G, Iyer V, Cimato T, Cauty JM. Pravastatin improves function in hibernating myocardium by mobilizing CD133+ and cKit+ bone marrow progenitor cells and promoting myocytes to reenter the growth phase of the cardiac cell cycle. *Circ Res.* 2009 Jan 30;104(2):255–264, 10p following 264.

Swoap SJ, Overton JM, Garber G. Effect of ambient temperature on cardiovascular parameters in rats and mice: a comparative approach. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004 Aug;287(2):R391-396.

Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 1999 Jan;79(1):215–62.

Sznajdman ML, Haffner CD, Maloney PR, Fivush A, Chao E, Goreham D, et al. Novel selective small molecule agonists for peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)--synthesis and biological activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2003 May 5;13(9):1517–21.

Taimeh Z, Loughran J, Birks EJ, Bolli R. Vascular endothelial growth factor in heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 2013 Sep;10(9):519–30.

Takemura G, Ohno M, Hayakawa Y, Misao J, Kanoh M, Ohno A, et al. Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction. *Circ Res.* 1998 Jun 15;82(11):1130–8.

Tan C, Chen W, Wu Y, Lin J, Lin R, Tan X, et al. Chronic aspirin via dose-dependent and selective inhibition of cardiac proteasome possibly contributed a potential risk to the ischemic heart. *Exp Gerontol.* 2013 Aug;48(8):812–23.

Tang X-L, Sanganalmath SK, Sato H, Bi Q, Hunt G, Vincent RJ, et al. Atorvastatin therapy during the peri-infarct period attenuates left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *PloS One.* 2011;6(9):e25320.

Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, et al. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med.* 2000 Apr;6(4):460–3.

Tian X, Hu T, Zhang H, He L, Huang X, Liu Q, et al. Vessel formation. De novo formation of a distinct coronary vascular population in neonatal heart. *Science.* 2014 Jul 4;345(6192):90–4.

Tirziu D, Chorianopoulos E, Moodie KL, Palac RT, Zhuang ZW, Tjwa M, et al. Myocardial hypertrophy in the absence of external stimuli is induced by angiogenesis in mice. *J Clin Invest.* 2007 Nov;117(11):3188–97.

Trzaskos J, Kawata S, Gaylor JL. Microsomal enzymes of cholesterol biosynthesis. Purification of lanosterol 14 alpha-methyl demethylase cytochrome P-450 from hepatic microsomes. *J Biol Chem.* 1986 Nov 5;261(31):14651–7.

Tuorto F, Herbst F, Alerasool N, Bender S, Popp O, Federico G, et al. The tRNA methyltransferase Dnmt2 is required for accurate polypeptide synthesis during haematopoiesis. *EMBO J.* 2015 Sep 14;34(18):2350–62.

Uchida S, De Gaspari P, Kostin S, Jenniches K, Kilic A, Izumiya Y, et al. Sca1-derived cells are a source of myocardial renewal in the murine adult heart. *Stem Cell Rep.* 2013;1(5):397–410.

Unger RH, Orci L. Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Dec 30;1585(2–3):202–12.

van den Borne SWM, Diez J, Blankesteyn WM, Verjans J, Hofstra L, Narula J. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nat Rev Cardiol.* 2010 Jan;7(1):30–7.

Vandervelde S, van Amerongen MJ, Tio RA, Petersen AH, van Luyn MJA, Harmsen MC. Increased inflammatory response and neovascularization in reperfused vs. non-reperfused murine myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol.* 2006 Apr;15(2):83–90.

van Laake LW, Passier R, Monshouwer-Kloots J, Nederhoff MG, Ward-van Oostwaard D, Field LJ, et al. Monitoring of cell therapy and assessment of cardiac function using magnetic resonance imaging in a mouse model of myocardial infarction. *Nat Protoc*. 2007;2(10):2551–67.

van Wijk B, Gunst QD, Moorman AFM, van den Hoff MJB. Cardiac regeneration from activated epicardium. *PloS One*. 2012;7(9):e44692.

Velagaleti RS, Pencina MJ, Murabito JM, Wang TJ, Parikh NI, D'Agostino RB, et al. Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation*. 2008 Nov 11;118(20):2057–62.

Verma A, Meris A, Skali H, Ghali JK, Arnold JMO, Bourgoun M, et al. Prognostic implications of left ventricular mass and geometry following myocardial infarction: the VALIANT (VALsartan In Acute myocardial iNfarctiOn) Echocardiographic Study. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2008 Sep;1(5):582–91.

Virágh S, Challice CE. The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. *Anat Rec*. 1981 Sep;201(1):157–68.

von Gise A, Pu WT. Endocardial and epicardial epithelial to mesenchymal transitions in heart development and disease. *Circ Res*. 2012 Jun 8;110(12):1628–45.

von Gise A, Zhou B, Honor LB, Ma Q, Petryk A, Pu WT. WT1 regulates epicardial epithelial to mesenchymal transition through β -catenin and retinoic acid signaling pathways. *Dev Biol*. 2011 Aug 15;356(2):421–31.

Wagner KD, Wagner N, Ghanbarian H, Grandjean V, Gounon P, Cuzin F, et al. RNA induction and inheritance of epigenetic cardiac hypertrophy in the mouse. *Dev Cell*. 2008 Jun;14(6):962–9.

Wagner K-D, Wagner N, Bondke A, Nafz B, Flemming B, Theres H, et al. The Wilms' tumor suppressor Wt1 is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2002 Jul;16(9):1117–9.

Wagner K-D, Cherfils-Vicini J, Hosen N, Hohenstein P, Gilson E, Hastie ND, et al. The Wilms' tumour suppressor Wt1 is a major regulator of tumour angiogenesis and progression. *Nat Commun*. 2014 Dec 16;5:5852.

Wagner K-D, Wagner N, Wellmann S, Schley G, Bondke A, Theres H, et al. Oxygen-regulated expression of the Wilms' tumor suppressor Wt1 involves hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2003 Jul;17(10):1364–6.

Wagner K-D, Wagner N. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) acts as regulator of metabolism linked to multiple cellular functions. *Pharmacol Ther*. 2010 Mar;125(3):423–35.

- Wagner N, Michiels JF, Schedl A, Wagner K-D. The Wilms' tumour suppressor WT1 is involved in endothelial cell proliferation and migration: expression in tumour vessels in vivo. *Oncogene*. 2008 Jun 12;27(26):3662-72.
- Wagner N, Wagner K-D, Hammes A, Kirschner KM, Vidal VP, Schedl A, et al. A splice variant of the Wilms' tumour suppressor Wt1 is required for normal development of the olfactory system. *Dev Camb Engl*. 2005 Mar;132(6):1327-36.
- Wagner N, Wagner K-D, Theres H, Englert C, Schedl A, Scholz H. Coronary vessel development requires activation of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilms' tumor transcription factor Wt1. *Genes Dev*. 2005 Nov 1;19(21):2631-42.
- Wahli W, Michalik L. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends Endocrinol Metab TEM*. 2012 Jul;23(7):351-63.
- Wang Y-X, Zhang C-L, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, Bayuga-Ocampo CR, et al. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol*. 2004 Oct;2(10):e294.
- Wang P, Liu J, Li Y, Wu S, Luo J, Yang H, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor {delta} is an essential transcriptional regulator for mitochondrial protection and biogenesis in adult heart. *Circ Res*. 2010 Mar 19;106(5):911-9.
- Wang Y-X, Lee C-H, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*. 2003 Apr 18;113(2):159-70.
- Weber KT, Sun Y, Bhattacharya SK, Ahokas RA, Gerling IC. Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. *Nat Rev Cardiol*. 2013 Jan;10(1):15-26.
- Wei X, Song H, Yin L, Rizzo MG, Sidhu R, Covey DF, et al. Fatty acid synthesis configures the plasma membrane for inflammation in diabetes. *Nature*. 2016 Nov 2;539(7628):294-8.
- Wende AR, Abel ED. Lipotoxicity in the heart. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Mar;1801(3):311-9.
- Wessels A, van den Hoff MJB, Adamo RF, Phelps AL, Lockhart MM, Sauls K, et al. Epicardially derived fibroblasts preferentially contribute to the parietal leaflets of the atrioventricular valves in the murine heart. *Dev Biol*. 2012 Jun 15;366(2):111-24.
- Westenbrink BD, Damman K, Rienstra M, Maass AH, van der Meer P. Heart failure highlights in 2011. *Eur J Heart Fail*. 2012 Oct;14(10):1090-6.
- Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR, Pickering JG. Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol*. 1994 Oct;89(5):397-410.

Witzenbichler B, Asahara T, Murohara T, Silver M, Spyridopoulos I, Magner M, et al. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am J Pathol*. 1998 Aug;153(2):381–94.

WRITING GROUP MEMBERS, Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, et al. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2010 Feb 23;121(7):e46–215.

Wu JMF, Hsueh Y-C, Ch'ang H-J, Luo C-Y, Wu L-W, Nakauchi H, et al. Circulating cells contribute to cardiomyocyte regeneration after injury. *Circ Res*. 2015 Feb 13;116(4):633–41.

Yao M, Dieterle T, Hale SL, Dow JS, Kedes LH, Peterson KL, et al. Long-term outcome of fetal cell transplantation on postinfarction ventricular remodeling and function. *J Mol Cell Cardiol*. 2003 Jun;35(6):661–70.

Ye Y, Raychaudhuri B, Gurney A, Campbell CE, Williams BR. Regulation of WT1 by phosphorylation: inhibition of DNA binding, alteration of transcriptional activity and cellular translocation. *EMBO J*. 1996 Oct 15;15(20):5606–15.

Yoshida Y, Aoyama Y. Yeast cytochrome P-450 catalyzing lanosterol 14 alpha-demethylation. I. Purification and spectral properties. *J Biol Chem*. 1984 Feb 10;259(3):1655–60.

Yu S, Reddy JK. Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1771(8):936–51.

Yue T-L, Nerurkar SS, Bao W, Jucker BM, Sarov-Blat L, Steplewski K, et al. In vivo activation of peroxisome proliferator-activated receptor-delta protects the heart from ischemia/reperfusion injury in Zucker fatty rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008 May;325(2):466–74.

Zamora M, Männer J, Ruiz-Lozano P. Epicardium-derived progenitor cells require beta-catenin for coronary artery formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Nov 13;104(46):18109–14.

Zangi L, Lui KO, von Gise A, Ma Q, Ebina W, Ptaszek LM, et al. Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction. *Nat Biotechnol*. 2013 Oct;31(10):898–907.

Zeisberg EM, Kalluri R. Origins of cardiac fibroblasts. *Circ Res*. 2010 Nov 26;107(11):1304–12.

Zhang J, Li Y. Therapeutic uses of FGFs. *Semin Cell Dev Biol*. 2016 May;53:144–54.

Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, Chacko M, Askari AT, Popovic ZB, et al. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2007 Oct;21(12):3197–207.

Zhou B, Honor LB, He H, Ma Q, Oh J-H, Butterfield C, et al. Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *J Clin Invest*. 2011 May;121(5):1894–904.

Zhou B, Honor LB, Ma Q, Oh J-H, Lin R-Z, Melero-Martin JM, et al. Thymosin beta 4 treatment after myocardial infarction does not reprogram epicardial cells into cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2012 Jan;52(1):43–7.

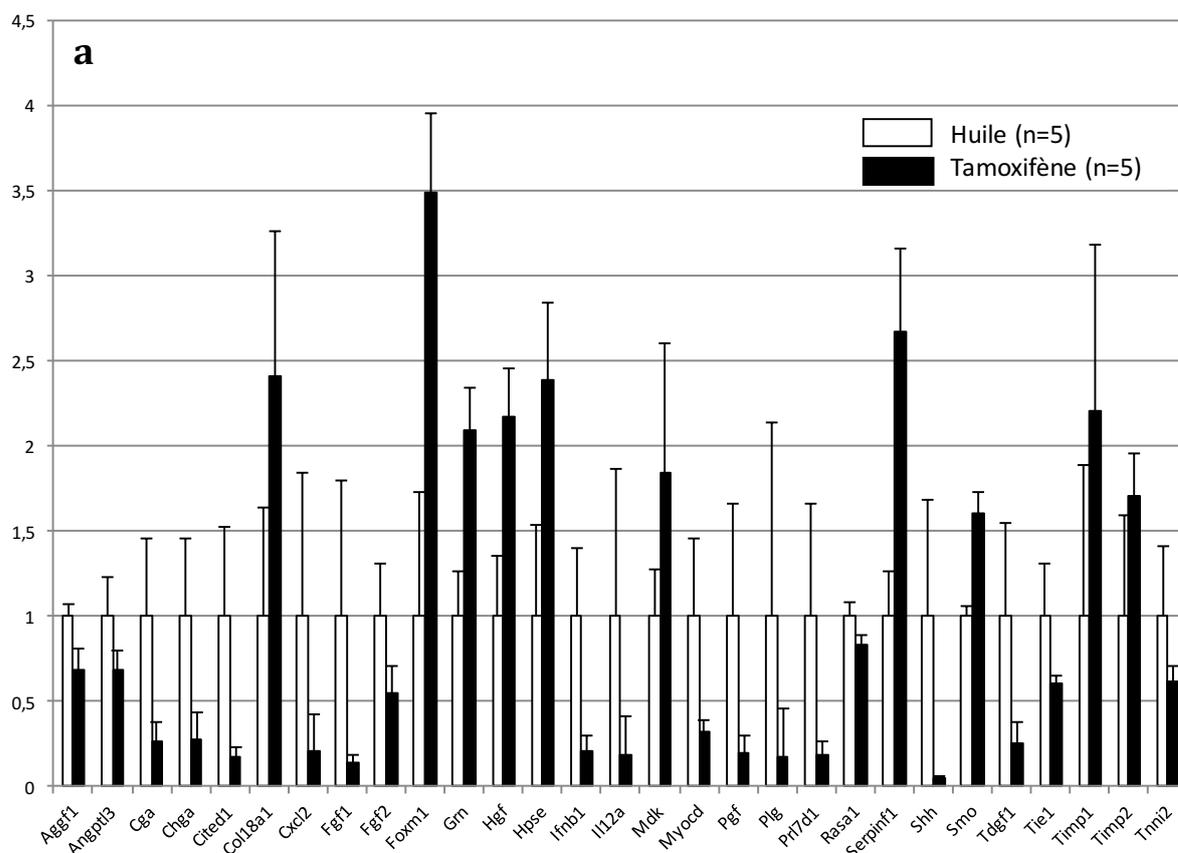
Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, Wu SM, Domian I, Rivera-Feliciano J, et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature*. 2008 Jul 3;454(7200):109–13.

Zouggari Y, Ait-Oufella H, Bonnin P, Simon T, Sage AP, Guérin C, et al. B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nat Med*. 2013 Oct;19(10):1273–80.

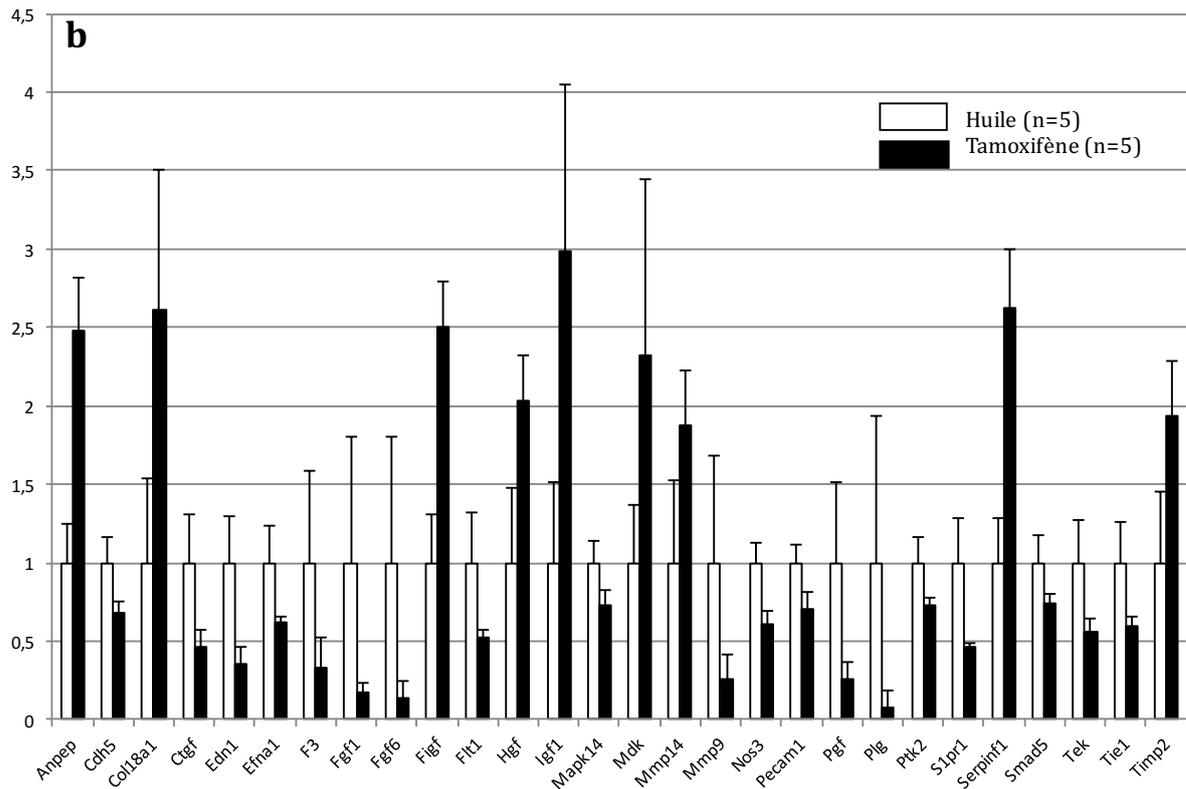
Zwetsloot PP, Végh AMD, Jansen of Lorkeers SJ, van Hout GPJ, Currie GL, Sena ES, et al. Cardiac Stem Cell Treatment in Myocardial Infarction: A Systematic Review and Meta-Analysis of Preclinical Studies. *Circ Res*. 2016 Apr 15;118(8):1223–32.

ANNEXES

Annexe 1 : Identification de potentiels gènes cibles de *WT1* via leur différentiel d'expression en fonction de l'expression de *Wt1*. Mesure de l'expression en ARN a été réalisée par qPCR en kit. a) Facteurs de croissance. b) Facteurs angiogéniques.

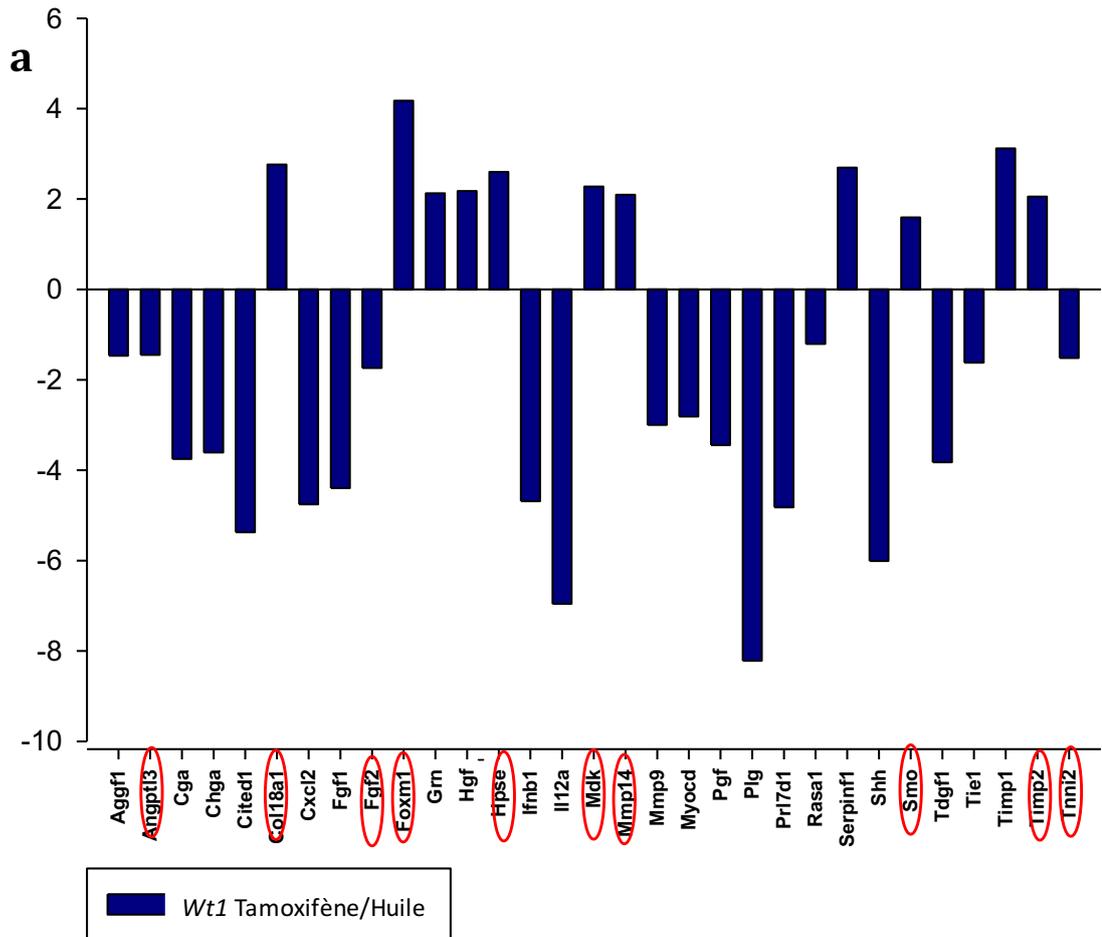


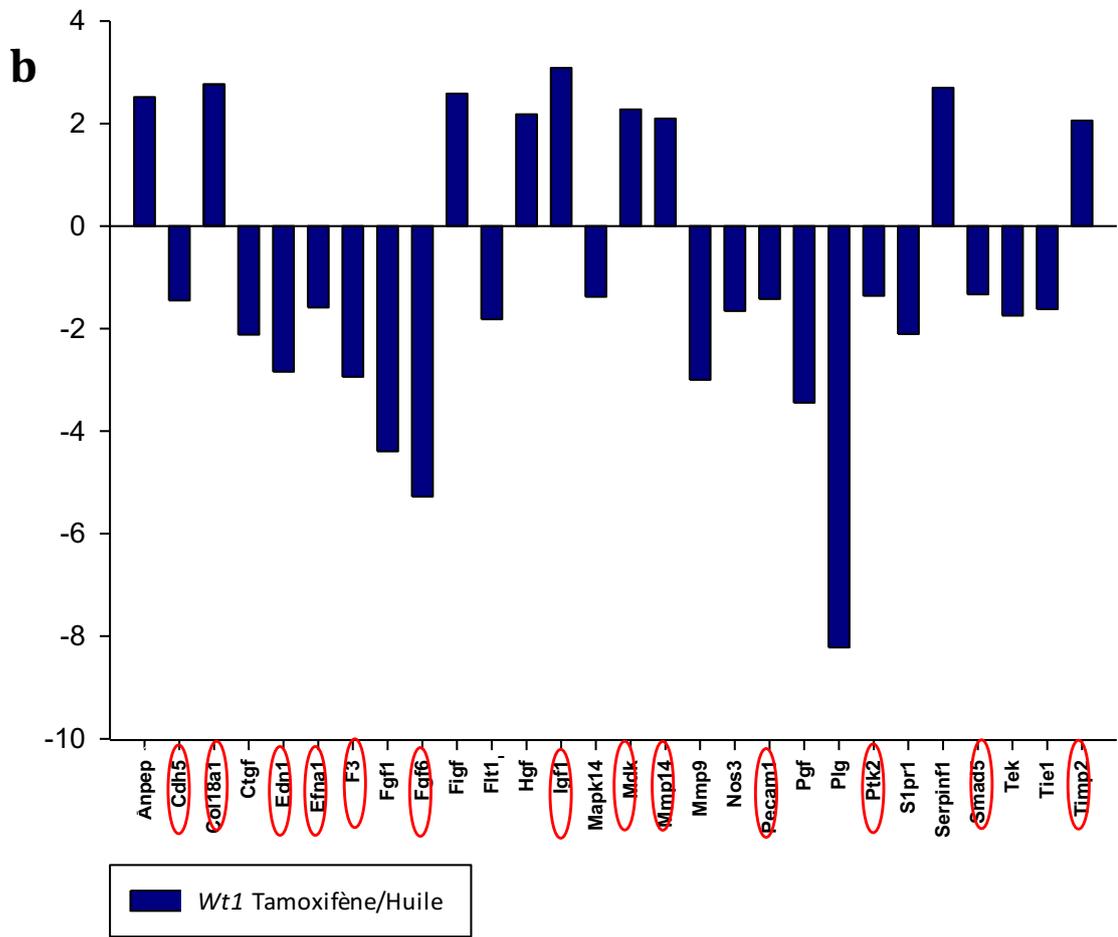
Aggf1, Angiogenic Factor with G-Patch and FHA Domains 1 ; *Cga*, Glycoprotein Hormones Alpha Polypeptide ; *Chga*, Chromogranin A ; *Col18a1*, Collagen Type XVIII Alpha 1 Chain ; *Cxcl2*, C-X-C Motif Chemokine Ligand 2 ; *Foxm1*, Forkhead box M1 ; *Gm*, Colony-Stimulating Factor 2 (Granulocyte-Macrophage) ; *Hgf*, Hepatocyte Growth Factor ; *Hpse*, Heparanase ; *Ifnb1*, Interferon Beta1 ; *Mdk*, midkine ; *Myocd*, Myocardin ; *Pgf*, Placental Growth Factor ; *Prl7d1*, Prolactin ; *Rasa1*, RAS P21 Protein Activator 1 ; *Serpinf1*, Serpin Family F Member 1 ; *Tdgf1*, Teratocarcinoma-Derived Growth Factor 1 ; *Tnni2*, Troponin I2.



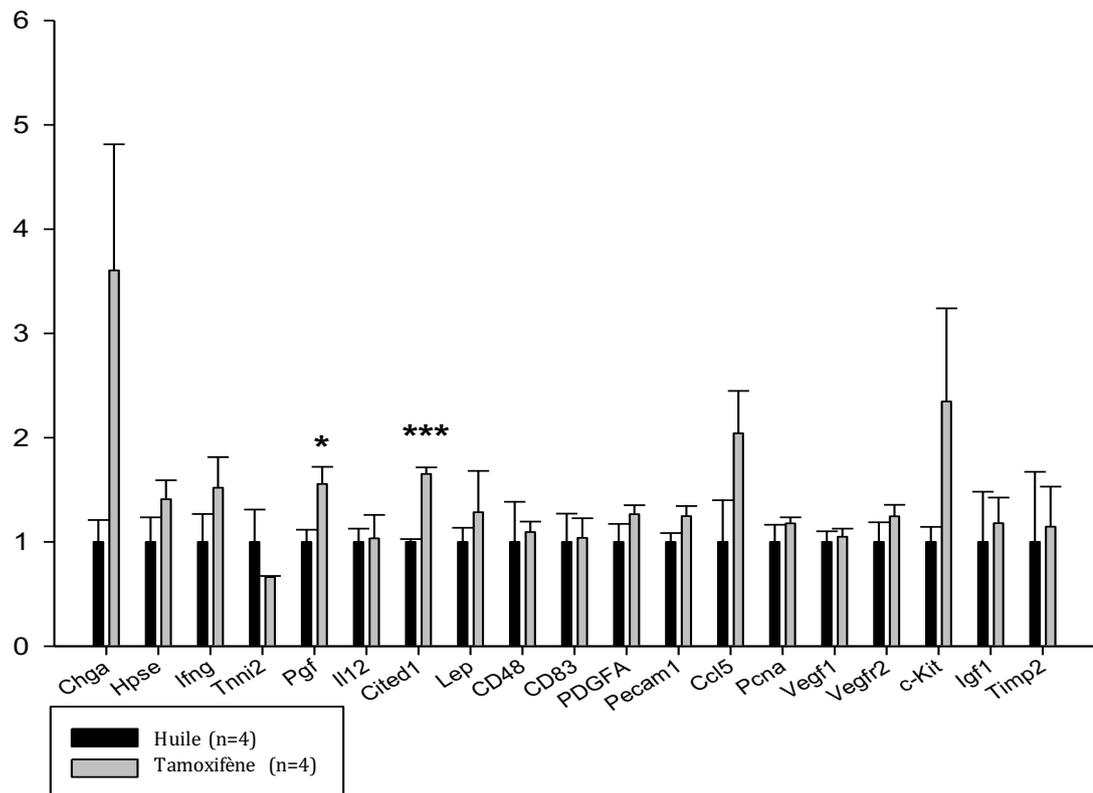
Anpep, Alanyl Aminopeptidase Membrane ; Cdh5, Cadherin5 ; Ctgf, Connective Tissue Growth Factor ; Edn1, Endothelin1 ; F3, Coagulation Factor III ; Figf, C-Fos Induced Growth Factor (VEGFD) ; Flt1, Fms Related Tyrosine Kinase 1 ; Igf1, Insulin Like Growth Factor 1 ; Pdk, Pyruvate Dehydrogenase Kinase ; Plg, Plasminogen ; Ptk2, Protein Kinase 2 ; S1pr1, Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 ; Smad5, Mothers Against DPP Homolog 5 ; Tek, Tyrosine Kinase with Ig and EGF Homology Domains-2.

Annexe 2 : Identification des potentiels gènes cibles directes de *WT1* (possédant des éléments de réponse à *WT1*) à partir de la liste présentée en annexe 1. Différentiel d'expression en ARN mesuré par qPCR en fonction du niveau d'expression de *WT1*. a) Facteurs de croissance. b) Facteurs angiogéniques.





Annexe 3 : Différentiel d'expression en ARN de gènes impliqués dans l'angiogenèse, la prolifération cellulaire, l'inflammation à la phase de réparation post-IDM. Expression des souris contrôles en référence. Normalisation pour les gènes de maison GAPDH et 36B4.



Lep, Leptin ; Ccl5, C-C Motif Chemokine Ligand 5 ; Pdna, Proliferating Cell Nuclear Antigen ; c-kit, Proto-Oncogen Tyrosine Protein Kinase Kit.

