



HAL
open science

Identification de marqueurs membranaires spécifiques de cellules progénitrices cardiaques PW1+ par une approche multiomique

Olivier Claude

► **To cite this version:**

Olivier Claude. Identification de marqueurs membranaires spécifiques de cellules progénitrices cardiaques PW1+ par une approche multiomique. Cardiologie et système cardiovasculaire. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT: 2018SORUS116 . tel-02922319

HAL Id: tel-02922319

<https://theses.hal.science/tel-02922319>

Submitted on 26 Aug 2020

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique ED394

*Unité mixte de recherches sur les maladies cardiovasculaires, du métabolisme et de la
nutrition – UMRS 1166*

Identification de marqueurs membranaires spécifiques de cellules progénitrices cardiaques PW1⁺ par une approche multiomique

Par Olivier CLAUDE

Thèse de doctorat de Physiologie et Physiopathologie

Dirigée par Pr. Jean-Sébastien HULOT

Présentée et soutenue publiquement le 28 Juin 2018

Devant un jury composé de :

Pr. Frédéric RELAIX	<i>Rapporteur</i>
Dr. Jean-Sébastien SILVESTRE	<i>Rapporteur</i>
Pr Christian FUNCK-BRENTANO	<i>Président</i>
Pr Jean-Philippe COLLET	<i>Examineur</i>
Dr. Catherine MONNOT	<i>Examinatrice</i>

Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées.

Marie Curie

Une vie individuelle est un fil de la tapisserie et qu'est-ce qu'un fil en comparaison de l'ensemble?

Isaac Asimov

Remerciements

Abréviations

β -Gal	Bêta galactosidase
ACN	Acétonitrile
ADNc	ADN complémentaire
AF	Acide formique
ARNm	ARN messenger
BSA	Bovine serum albumine
C12FDG	5-Dodecanoylamino fluorescein Di- β -D-Galactopyranoside
CD*	Cluster de différenciation
CEF	Centre d'exploration fonctionnel, plateforme d'étude du petit animal
CFU	Colony-forming unit
CSC	Cellule souche cardiaque
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco modified Eagle's medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPBS	Dulbecco phosphate buffered solution
DTT	Dithiothréitol
ECM	Matrice extra-cellulaire
EMT	Transition épithelo-mésenchymateuse
EndMT	Transition endo-mésenchymateuse
ESC	Cellule souche embryonnaire
FACS	Fluorophore activated cell sorting
FDG	5-Dodecanoylamino fluorescein Di- β -D-Galactopyranoside
FDR	False discovery rate, taux de faux positifs
FE	Fraction d'éjection
FGF	Fibroblast growth factor
FMO	Fluorescence minus one
G	Gauge
HBSS	Hank's balanced salt solution
HPLC	High performance liquid chromatography
IDM	Infarctus du myocarde
IP	Intrapéritonéal
IPA	Ingenuity pathway analysis
IRES	Internal Ribosomal entry site
LAD	Left anterior descending artery, artère antérieure gauche descendante.
LC-MS	liquid chromatography coupled to mass spectrometry
MI	Myocardial infarction, infarctus du myocarde
MS	Mass spectrometry, spectrométrie de mass
MSC	Mesenchymal stem cell
MYGDF	Myeloid derived growth factor
nLacZ	nuclear LacZ (codant pour la sous unité enzymatique de la B-Gal)

NLS	Nuclear localization signal
PBS	Phosphate buffered solution
PDGF	Platelet derived growth factor
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
Peni/Strep	Pénicilline/ Streptomycine
PI	Propidium iodide
RBCL	Red blood cells lysis, lyse des cellules rouges du sang
RNAseq	Séquençage des ARN de seconde génération
RT-qPCR	Rétro-transcription suivie d'une PCR quantitative
SDS-PAGE	Sodium dodécyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SVF	Serum de veau fœtal
TA	Température ambiante
TBS	Tris buffered solution
TBS-T	Tris buffered solution 0,1% tween
TGF- β	Transforming growth factor B
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
U	Unité enzymatique
UI	Unité internationale
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR2	Vascular endothelial growth factor receptor 2
IPA	Qiagen's Ingenuity pathway analysis
MMP*	Matrix metalloprotease

Table des matières

Partie 1 : Introduction	21
Données épidémiologiques	21
Présentation des formes d'insuffisance cardiaque	22
Cardiopathie ischémique	25
Modifications cellulaires et remodelage du myocarde après un infarctus.....	29
Origine et composition de la fibrose	34
Processus de réparation du myocarde	40
Thérapeutiques actuelles de l'infarctus	42
Les cellules souches adultes	44
Les cellules souches dans l'organisme	44
Les cellules souches hématopoïétiques.....	46
Les cellules souches adultes.....	47
Les cellules souches cardiaques.....	49
Pw1/Peg3: Protein Widely 1 / paternally expressed gene 3	53
Partie 2 : Etude des cellules exprimant PW1 dans le cœur	65
Résumé de l'article	65
Conclusions.....	74
Objectifs de travail	103
Partie 3 : Définir un membranome reflétant l'expression de PW1	107
Identification de nouveaux marqueurs membranaires.....	108
Premiers tests protéomiques.....	108
Mise en place bio-informatique.....	109
Généralités sur le système informatique prédictif	111
Outils utilisés.....	113
Stratégie d'obtention du membranome prédit.....	116

Conclusion	120
Etude du membranome des cellules PW1 ⁺ par Spectrométrie de masse	121
Généralités.....	121
Méthodologie.....	121
Résultats de MS & comparaisons avec le membranome prédit	126
Conclusion	130
Partie 4 : Validation de l'expression des marqueurs	133
Méthode de préparation des échantillons pour analyse par Cytométrie en flux.....	133
Résultats d'analyse d'expression des marqueurs par Cytométrie en flux.	136
La stratégie d'obtention des cellules PW1 ⁺	136
Test des marqueurs nouvellement identifiés	137
Vérification de l'expression des marqueurs vasculaires et myéloïdes.....	141
Peut-on trier facilement ces cellules sans l'aide du FDG ?	142
Conclusion	143
Partie 5 : Une cible pour inhiber les cellules souches cardiaques PW1 ⁺ ?.....	147
Généralités.....	147
Inhibiteurs disponibles	151
Détermination des partenaires d'alphaV dans les PW1 ⁺	153
Electrobuvardage	154
Matériel et méthodes	154
Résultats.....	159
Inhibition des intégrines alpha-V.....	162
Expérience <i>in vitro</i>	163
Expériences <i>in vivo</i>	165
Conclusions.....	172
Partie 6 : Etude du secrétome des progéniteurs cardiaques.....	211

Prédiction du secrétome.....	211
Observations des variations d'expression	211
Vérifications des résultats et suite du projet.....	212
Perspectives.....	215
Annexes	223
Bibliographie	281
Résumé.....	301
Abstract	301

Table des figures

FIGURE 1 : MORTALITE MASCULINE PAR INFARCTUS DU MYOCARDE (IDM) DE 1980 A 2015 EN EUROPE (WILKINS ET AL., 2017)..	21
FIGURE 2 : PREVALENCE DES CARDIOPATHIES ISCHEMIQUES (CPI) ET DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE SELON L'AGE ET LE SEXE EN FRANCE (SOURCE : ENQUETE HANDICAP-SANTE MENAGES 2008).	22
FIGURE 3 : REPRESENTATION DE LA SURVENUE D'UNE OCCLUSION DANS UN SYSTEME VASCULAIRE BRANCHE (A GAUCHE) ET UN SYSTEME VASCULAIRE TERMINAL (A DROITE). DANS LE CAS D'UNE CIRCULATION BRANCHEE, LA CIRCULATION COLLATERALE EST IMPORTANTE ET PRESENTE AINSI UN RISQUE D'ANOXIE MOINDRE POUR LE TISSU (ADAPTE DE SERVIER MEDICAL ART).	23
FIGURE 4 : REDUCTION DE LA FRACTION D'EJECTION (SERVIER MEDICAL ART).	24
FIGURE 5 : ADAPTE DE XING ET AL NATURE REVIEWS, 2013(XING, 2013).	27
FIGURE 6 : MODIFICATION DE L'ELECTROCARDIOGRAMME A LA PHASE AIGÛE ET CHRONIQUE POST IDM (CARRERE D'ENCAUSSE M. & CYMES M, 2007).	28
FIGURE 7 : TAILLE DE L'INFARCTUS EN FONCTION DU TRAITEMENT MIS EN PLACE : LA REPERFUSION PERMET UNE REDUCTION DRASTIQUE DE LA TAILLE DE LA ZONE REMODELEE. L'AJOUT D'UN TRAITEMENT CARDIOPROTECTEUR AGIT EN SYNERGIE AVEC LA REPERFUSION ET PERMET UNE REDUCTION SUPPLEMENTAIRE DE LA ZONE INFARCTEE (YELLON & HAUSENLOY, 2007).	29
FIGURE 8 : REACTION BIPHASIQUE DE LA REPARATION CARDIAQUE POST-INFARCTUS. RAPIDEMENT APRES L'IDM, LA NECROSE DU TISSU INDUIT UNE PHASE INFLAMMATOIRE. DANS UN SECOND TEMPS (4 JOURS POST INFARCTUS DANS UN MODELE MURIN D'IDM) COMMENCE UNE PHASE DE REPARATION CARACTERISEE PAR LA MODULATION DE LA REPOSE INFLAMMATOIRE, UNE PROLIFERATION DES MYOFIBROBLASTES, LA FORMATION D'UNE CICATRICE FIBREUSE ET UNE NEO-VASCULARISATION (PRABHU & FRANGOGIANNIS, 2016).	30
FIGURE 9 : SCHEMA RESUMANT LA PARTICIPATION DES DIFFERENTES POPULATIONS DU SYSTEME IMMUNITAIRE DANS LE PROCESSUS INFLAMMATOIRE DE LA PHASE PRECOCE POST-INFARCTUS. A GAUCHE, LES ACTEURS D'UN REMODELAGE ADVERSE ET A DROITE, LES ACTEURS DU REMODELAGE BENEFIQUE APRES UN IDM (ZLATANOVA ET AL., 2016).	32
FIGURE 10 : TEMPORALITE DE LA REPARATION DU MYOCARDE POST-INFARCTUS ET DE L'ACTIVATION INFLAMMATOIRE. LA PREMIERE PHASE EST UNE PHASE INFLAMMATOIRE AIGÛE SURVENANT DANS LES HEURES QUI SUIVENT L'IDM OU DIFFERENTS ACTEURS CELLULAIRES SE SUCCEDENT AFIN DE PREPARER LA PHASE DE REPARATION QUI A POUR BUT DE MAINTENIR L'INTEGRITE DE L'ORGANE. UNE TROISIEME PHASE APPARAÎT PLUS TARDIVEMENT APRES SURVENUE D'UN REMODELAGE DELETERE CAUSE PAR UNE FIBROSE INTERSTITIELLE EXTENSIVE CONDUISANT A L'INSUFFISANCE CARDIAQUE (PRABHU & FRANGOGIANNIS, 2016).	33
FIGURE 11 : LES FIBROBLASTES CARDIAQUES ACTIVES A L'ORIGINE DE LA FIBROSE SONT SUPPOSES ETRE DERIVES DES FIBROBLASTES RESIDENTS. DE NOMBREUX PROGENITEURS FIBROBLASTIQUES ONT ETE PROPOSES D'ORIGINES DIVERSES. ON RETROUVERAIT DES FIBROBLASTES ORIGINAIRES DE LA LIGNEE HEMATOPOÏETIQUE AYANT MIGRE DEPUIS LA MOELLE OSSEUSE ET AYANT SUBI UNE TRANSITION ENDO-MESENCHYMATEUSE ; DES FIBROBLASTES ORIGINAIRE DE PROGENITEURS PERIVASCULAIRES ET AYANT SUBI UNE TRANSITION EPI-MESENCHYMATEUSE (TRAVERS ET AL., 2016).	37
FIGURE 12 : PROCESSUS DE MODIFICATION DE L'ECM AU COURS DU REMODELAGE CARDIAQUE. A GAUCHE, DANS UN CONTEXTE NORMAL, LES FIBRES DE COLLAGENE SONT SYNTHETISEES PUIS EXCRETEES AVANT LEUR CLIVAGE, PERMETTANT UN ASSEMBLAGE CORRECT DES TRIPLES HELICES FIBREUSES. A DROITE, AU COURS DU REMODELAGE, LES FIBRES SONT DEGRADEES JUSQU'A CE QUE LES FIBRES SOIENT DEGRADEES EN LARGES COMPLEXES PROTEIQUES. CES SOUS-PRODUITS DE DEGRADATION VONT PERDRE LEUR CONFORMATION QUATERNAIRE ET DONNER DES DERIVES DE GELATINE QUI VONT PAR LA SUITE POUVOIR ETRE DEGRADEES (CHONG ET AL., 2011).	38

FIGURE 13 : PROTEASES DONT LES NIVEAUX ONT ETE RETROUVES MODIFIES AU COURS DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE (CHONG ET AL., 2011).	39
FIGURE 14 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES POSSIBILITES DE DIVISION DES CELLULES SOUCHES (ADAPTE DE SERVIER MEDICAL ART).	44
FIGURE 15 : SCHEMA REPRESENTANT LA HIERARCHIE DES CELLULES ET DE LEURS POTENTIELS SOUCHE AU COURS DE LA VIE (ADAPTE DE SERVIER MEDICAL ART).	45
FIGURE 16 : SCHEMA REPRESENTANT LES DIFFERENTES POPULATIONS DIFFERENCIEES QUE PEUVENT FORMER LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES (ADAPTE DE SERVIER MEDICAL ART).	48
FIGURE 17 : SCHEMA RESUMANT LES DIFFERENTES POPULATIONS DE CELLULES PROGENITRICES CARDIAQUES ET LEURS ORIGINES (ANVERSA, KAJSTURA, & LERI, 2012).....	49
FIGURE 18 : RESUME DES DIFFERENTES POPULATIONS DE CELLULES SOUCHES CARDIAQUES RESIDENTES RETROUVEES (SANTINI, FORTE, HARVEY, & KOVACIC, 2016).....	51
FIGURE 19 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA COPIE DU GENE PW1 INSERE DANS LE GENOME DE SOURIS AFIN D'OBTENIR LA LIGNEE TRANSGENIQUE PW1 ^{NLacZ}	54
FIGURE 20 : DES CELLULES PW1 DE PEAU, GREFFEES SUR DES SOURIS « NUDE » PERMET UN DEVELOPPEMENT DE FOLLICULES PILAIRES IMPORTANT ET ROBUSTES (A GAUCHE). L'EXPRESSION DE LA β -GAL RAPPORTEUSE EST ENCORE VISIBLE APRES GREFFE ET RESTE LIMITEE AUX CELLULES INDIFFERENCIEES(A DROITE) (D'APRES V. BESSON, PNAS, 2011 (BESSON ET AL., 2011)).	56
FIGURE 21 : SCHEMA RECAPITULATIF DES DIFFERENTES VOIES D'ACTION DE P53, EN PARTICULIER EN HAUT LA VOIE DE DEGRADATION LORSQUE P53 EST INACTIF, SUIVI, DANS LE SENS DES AIGUILLES D'UNE MONTRE, DES VOIES ACTIVEES PAR DIFFERENTS STRESS (BEYFUSS & HOOD, 2018).	59
FIGURE 22 : RELATIONS ENTRE P53, PW1 (PEG3) ET BAX DANS L'ACTIVATION DE L'APOPTOSE (JOHNSON ET AL., 2002).....	60
FIGURE 23 : SCHEMA RECAPITULATIF DE LA VOIE DU TNF- α MENANT A L'ACTIVATION DE NF-KB. A NOTER L'ACTIVATION DE BAX PAR LE COMPLEXE PW1/TRAF2 SANS ACTIVATION DE L'APOPTOSE (HAASE & HOHLFELD, 1999).	62
FIGURE 24 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA COPIE DU GENE PW1 INSERE DANS LE GENOME DE SOURIS AFIN D'OBTENIR LA LIGNEE TRANSGENIQUE PW1 ^{NLacZ}	65
FIGURE 25 : IMMUNOMARQUAGES SUR COUPES DE CŒUR SAIN DE SOURIS SAUVAGES MONTRANT PW1 (VERT) ET L'ACTINE SARCOMERIQUE ALPHA (ROUGE) (F & G) ET COLORATION X-GAL SUR COUPES DE CŒUR DE SOURIS RAPPORTEUSE PW1 ^{NLacZ} (H & I) REFLETANT L'ACTIVITE β -GALACTOSIDASE DU RAPPORTEUR DE L'EXPRESSION DE PW1. LES MARQUAGES INDIQUENT UNE LOCALISATION MAJORITAIREMENT PERICARDIQUE ET INTERSTITIELLE DE LA POPULATION PW1 ⁺ DANS LE CŒUR SAIN.	66
FIGURE 26 : ECHANTILLONS HUMAINS DE CŒUR INFARCI (A) COLORES A L'HEMATOXYLINE EOSINE, MONTRANT UNE ZONE REMODELEE ; (B & C) IMMUNOMARQUAGE DE L'ACTINE SARCOMERIQUE ALPHA (ROUGE) ET DE PW1 (VERT) EN ZONE INFARCI (B) ET EN ZONE NON REMODELEE (C) QUI MONTRENT LA REPARTITION DE PW1 DANS LE CŒUR INFARCI DE MANIERE PREFERENTIELLE EN ZONE REMODELEE. (D) ZONE AGRANDIE DE LA ZONE INFARCI MONTRANT LE MARQUAGE PUNCTIFORME DE PW1 DANS LE NOYAU DES CELLULES.	67
FIGURE 27 : LA REMISE EN CULTURE DES CELLULES FDG ⁺ A PERMIS D'OBTENIR DES COLONIES (EN HAUT) QUI ONT PU ENSUITE ETRE DIFFERENCIEES EN FIBROBLASTES (F) EN CELLULES MUSCULAIRES LISSES (G) MAIS PAS EN CARDIOMYOCYTES (H). DES CELLULES ISSUES DU TRI ET CULTIVEES (J) ONT EGALEMENT PU ETRE DIFFERENCIEES EN ADIPOCYTES (K) EN OSTEOBLASTES (L) ET EN CHONDROCYTES (M). CES DONNEES ATTESTENT DU CARACTERE SOUCHE DES CELLULES PW1 ⁺	68

FIGURE 28 : EXTRAIT DE L'ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE MONTRANT LA HIERARCHISATION DES DIFFERENTES POPULATIONS ETUDIEES (HAUT) ET LES PROCESSUS DANS LESQUELS LES GENES SUREXPRIMES PAR CETTE POPULATION SONT IMPLIQUES (BAS).....	69
FIGURE 29 : CYTOGRAMMES PERMETTANT LA VISUALISATION DE LA POPULATION EXPRIMANT PW1 GRACE A L'ACTIVITE β -GAL DU RAPPORTEUR ET DE L'AUGMENTATION DE LA PROPORTION DE CETTE POPULATION ENTRE LES CONDITIONS CONTROLES (PANNEAUX DU HAUT) ET LA CONDITION INFARCTEE (PANNEAUX DU BAS).....	70
FIGURE 30 : AUGMENTATION DU NOMBRE DE CELLULES PW1 ⁺ PROLIFERATIVES EN CONDITIONS ISCHEMIQUES.....	71
FIGURE 31 : LES CELLULES PW1 ⁺ RETROUVEES DANS LE CŒUR INFARCTE DE SOURIS SONT MAJORITAIREMENT LOCALISEES AU SEIN DE LA ZONE INFARCTEE (A) OU ELLES RESTENT DANS UN ETAT INDIFFERENT, TANDIS QUE CELLES PRESENTES DANS L'INTERSTITIUM DU MYOCARDE SAIN DU MEME CŒUR INFARCTE EXPRIMENT FSP1, UN MARQUEUR DE FIBROBLASTES (C & D).....	72
FIGURE 32 : EVALUATION DE LA SUREXPRESSION DE FSP1 DANS DES CŒURS INFARCTES PAR RAPPORT AUX CŒURS NORMAUX.	72
FIGURE 33 : EXTRAIT DE L'ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE PRESENTANT L'EXPRESSION DE MARQUEURS PROFIBROTIQUES. LA MAJORITE DE CES GENES SONT FORTEMENT EXPRIME PAR LES CELLULES PW1 ⁺ EN COMPARAISON AVEC LES AUTRES POPULATIONS SUGGERANT QUE LES CELLULES PW1 ⁺ SOIENT ENGAGEES DANS UN PROCESSUS FIBROTIQUE.	73
FIGURE 34 : SCHEMA RESUMANT NOS DECOUVERTES : LE CŒUR ABRITE UNE POPULATION DE CELLULES EXPRIMANT PW1 QUI PRESENTENT DES CARACTERISTIQUES DE CELLULES SOUCHES. NEANMOINS, CETTE POPULATION EXPRIME DE NOMBREUX MARQUEURS PROFIBROTIQUES ET PARTICIPERAIT ACTIVEMENT AU PROCESSUS DE REMODELAGE CARDIAQUE POST-INFARCTUS EN PARTICULIER EN DONNANT NAISSANCE A UNE POPULATION DE FIBROBLASTES. LE ROLE DE PW1 DANS LA REPARATION CARDIAQUE POST-INFARCTUS EST NEANMOINS INCONNU ET NECESSITE D'ETRE ETUDIE AFIN DE DETERMINER SI CES CELLULES PARTICIPENT AU REMODELAGE BENEFIQUE OU NEFASTE DE L'ORGANE.	75
FIGURE 35 : SCHEMA RESUMANT LA STRATEGIE UTILISEE PAR KORF-KLINGEBIEL ET AL. POUR IDENTIFIER DES PROTEINES SECRETEES DE MANIERE SPECIFIQUE PAR UNE POPULATION DE MSC. LES MSC ISOLEES PAR TRI MAGNETIQUE DE MOELLE OSSEUSE SONT ANALYSEES PAR MICROARRAY. PARMIS LES 47 000 SEQUENCES PRESENTES, SEULES 4000 REPRESENTANT DES SEQUENCES MAL CARACTERISEES SONT CONSIDEREES. L'ANALYSE BIO-INFORMATIQUE PERMET D'EN GARDER LES PROTEINES PREDITES COMME SECRETEES. LES 42 SEQUENCES OBTENUES SONT CLONEES POUR PRODUIRE DES PROTEINES RECOMBINANTES DONT LES EFFETS SONT ETUDIES SUR PLUSIEURS TYPES CELLULAIRES (KORF-KLINGEBIEL ET AL., 2015).	110
FIGURE 36 : SCHEMA DE LA STRATEGIE D'OBTENTION DU MEMBRANOME HYPOTHETIQUE DES CELLULES PW1 ⁺	117
FIGURE 37 : LES 378 PROTEINES ASSOCIEES A LA PRESENCE DE PW1 SONT ASSOCIEES A DE NOMBREUSES FONCTIONS MAIS LA MAJORITE EST ENCORE MAL CARACTERISEE.	118
FIGURE 38 : LE MEMBRANOME PREDIT POUR LES CELLULES PW1 ⁺ EN CONDITIONS NORMALES CONTIENT 2113 PROTEINES, LE MEMBRANOME PREDIT POUR LES CELLULES PW1 EN CONDITIONS PATHOLOGIQUES CONTIENT 2284 PROTEINES. 2040 PROTEINES ONT ETE RETROUVEES EN COMMUN DECRIVANT AINSI LE MEMBRANOME DES PW1 ⁺ INSENSIBLE A LA PATHOLOGIE.	119
FIGURE 39 : SCHEMA RECAPITULATIF DE LA STRATEGIE DE CRIBLAGE DES SEQUENCES.....	120
FIGURE 40 : STRUCTURE DU SULFO-NHS-SS-BIOTINE.....	122
FIGURE 41 : TESTS DE FAISABILITE D'ENRICHISSEMENT EN MEMBRANE PLASMIQUE. GELS SDS-PAGE COLORES AU NITRATE D'ARGENT. A GAUCHE, 1MILLION, 500 000 ET 100 000 CELLULES DE LA LIGNEE HEK293 ONT ETE LYSEES ET MECANIQUEMENT DISSOCIEES AU POTTER DE DOUNCE AVANT LA CENTRIFUGATION DES ECHANTILLONS AFIN DE N'EN RECUPERER QUE LA FRACTION ENRICHIE EN PROTEINES MEMBRANAIRES. A DROITE, MEME PROTOCOLE SUIVI D'UNE EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE AU TFE. UN SIGNAL N'EST VISIBLE QU'A PARTIR DE 1MILLION DE CELLULES.	124

FIGURE 42 : SCHEMA RESUMANT LA STRATEGIE UTILISEE POUR ANALYSER LES PROTEINES MEMBRANAIRES DES CELLULES PW1 ⁺ ...	126
FIGURE 43 : ONTOLOGIE DES 9 PROTEINES COMMUNES AUX ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES ET DE SPECTROMETRIE DE MASSE. (1) REPONSE AUX BLESSURES, (2) REPONSE INFLAMMATOIRE, (3) ADHESION CELLULE-ECM, (4) REGULATION DU TRANSPORT VESICULAIRE, (5) ACTIVATION CELLULAIRE, (6) PHAGOCYTOSE, (7) MOUVEMENT DES COMPARTIMENTS CELLULAIRES ET (8) AGREGATION PLAQUETTAIRE.....	128
FIGURE 44 : REACTION SCHEMATISEE DE L'ACTION DE L'ENZYME B-GALACTOSIDASE SUR LE C ₁₂ FDG, PERMETTANT LA LIBERATION D'UN COMPOSE FLUORESCENT QUI EST UTILISE POUR CRIBLER LES CELLULES EXPRIMANT PW1.....	136
FIGURE 45 : LES CELLULES FDG ⁺ SONT SELECTIONNEES POUR ETRE NEGATIVE AU MARQUEUR DE VIABILITE (PI) ET PRESENTANT UNE FORTE ACTIVITE β -GAL, REFLETANT UNE EXPRESSION DE PW1.....	137
FIGURE 46 : EVALUATION DE LA PROPORTION DE CELLULES FDG ⁺ EXPRIMANT LES MARQUEURS CD39, CD51, CD140A, CD163 ET CD172A. SEUL LE MARQUEUR CD51 DECRIT DE MANIERE STABLE L'ENSEMBLE DE LA POPULATION EXPRIMANT LA β -GAL REFLETANT L'EXPRESSION DE PW1.....	138
FIGURE 47 : CYTOGRAMMES REPRESENTATIFS DE L'ANALYSE DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS CD39, CD51, CD140A (PDGFRA), CD163 ET CD172A PAR DES CELLULES VIVANTES POSSEDANT UNE ACTIVITE β -GAL REFLETANT L'EXPRESSION DE PW1 DANS LA FRACTION NON MYOCYTAIRE DE CŒURS DE SOURIS SAINES. L'EXPRESSION DE CD51 EST EXPRIMEE PAR LA GRANDE MAJORITE DES CELLULES β -GAL ⁺ ET LES AUTRES MARQUEURS DECRIVENT DEUX POPULATIONS MAJORITAIRES EXPRIMANT SOIT CD45, CD39, CD172A ET CD163 OU CD140A.....	139
FIGURE 48 : EVALUATION DE L'EXPRESSION DE MARQUEURS DE CELLULES SOUCHES PAR LES CELLULES PW1 ⁺ . CES MARQUEURS PRECEDEMMENT DECRITS DANS LES CELLULES SOUCHES ET OBSERVEES EGALEMENT DANS CERTAINES POPULATIONS DE CELLULES DERIVEES DE CELLULES SOUCHES ADULTES CARDIAQUE NE PERMETTENT PAS DE DECRIRE LA POPULATION EXPRIMANT PW1.....	140
FIGURE 49 : CYTOGRAMMES REPRESENTATIFS DE L'ANALYSE DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS CD34, CD44 CD51 ET CD140A DANS DES POPULATIONS β -GAL POSITIVES EXPRIMANT CD45 (A DROITE) ET N'EXPRIMANT PAS CD45 (A GAUCHE). L'EXPRESSION DE CD45 EST ASSOCIEE A L'EXPRESSION DE CD CD44 TANDIS QUE L'EXPRESSION DE CD140A EST ASSOCIEE A L'EXPRESSION DE CD34.....	140
FIGURE 50 : CYTOGRAMMES REPRESENTATIFS DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS (C) CD45 ET TER 119 PAR LES CELLULES VIVANTES DE LA FRACTION NON MYOCYTAIRE DE CŒUR DE SOURIS SAIN. (D) DE LA POPULATION N'EXPRIMANT NI CD45 NI TER119, EXPRIMANT CD51 ET CD140A ET AYANT UNE ACTIVITE β -GAL, MAIS NEGATIVE POUR CD31. (E) POPULATION CD45 NEGATIVE ET TER119 POSITIVE, NEGATIVE POUR CD51 ET SANS ACTIVITE β -GAL. (F) POPULATION TER119 NEGATIVE, CD45 POSITIVE, EXPRIMANT MAJORITAIREMENT LA β -GALACTOSIDASE, POUR MOITIE CD51 ET CD31 SANS EXPRESSION DE CD140A.....	142
FIGURE 51 : CYTOGRAMMES REPRESENTATIFS DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS CD51 ET CD45 PARMI LES CELLULES VIVANTES DE LA FRACTION NON MYOCYTAIRE (GAUCHE). EVALUATION DE LA PROPORTION DES CELLULES EXPRIMANT LA β -GAL DANS LES POPULATIONS CD51 ⁺ CD45 ⁻ (CENTRE) ET CD51 ⁺ CD45 ⁺ (DROITE).....	143
FIGURE 52 : SCHEMA RESUMANT LES DIFFERENTES COMBINAISONS OBSERVEES JUSQU'A MAINTENANT. L'INTEGRINE AV EST L'INTEGRINE AYANT LE PLUS GRAND NOMBRE DE PARTENAIRES β , ALORS QUE LES AUTRES SOUS-UNITES ALPHA ONT UN SEUL PARTENAIRE BETA (COX, BRENNAN, & MORAN, 2010).	147
FIGURE 53 : DIFFERENTS MODES DE COOPERATION SONT POSSIBLES ENTRE LES INTEGRINES ET LES RECEPTEURS AUX FACTEURS DE CROISSANCE (GFR). A) EN INTERAGISSANT DIRECTEMENT ENSEMBLE, B) EN DIAPHONIES DE VOIES DE SIGNALISATION DANS LA	

MEME TEMPORALITE, ICI EST REPRESENTE LA COOPERATION AFIN DE PASSER EN PHASE S, VIA LES VOIES ERK ET AKT, C) DIAPHONIE SUR DES TEMPORALITES DIFFERENTES, EN EXEMPLE L'ACTIVATION DE RAC PERMETTANT LA PROLIFERATION A TRAVERS L'ACTIVATION DE PLUSIEURS EFFECTEURS (D'APRES (MORENO-LAYSECA & STREULI, 2014)).	150
FIGURE 54 : STRUCTURE DU CILENGITIDE. EN BLEU EST NOTE LE NOM DES ACIDES AMINES COMPOSANT LE MOTIF DE RECONNAISSANCE, EN ROUGE CEUX PERMETTANT LA CYCLISATION. LES TRAITES ROUGES SYMBOLISENT LES LIMITES ENTRE LES ACIDES AMINES. ...	153
FIGURE 55 : SCHEMA D'UN CŒUR DE SOURIS CLAMPE (A) ET PERFUSE, ET SCHEMATISATION DE LA CIRCULATION DES SOLUTIONS PERFUSEES VIA LE VENTRICULE GAUCHE.	154
FIGURE 56 : WESTERN BLOTS DIRIGES CONTRE LES DIFFERENTES INTEGRINES DANS DES HUVECS, DES CELLULES NON MYOCYTAIRES ET DES CM ISOLEES DE CŒURS DE SOURIS. A) CD51 EST RETROUVE DANS LES HUVECS ET LA FRACTION NON MYOCYTAIRE MAIS ABSENT DES CARDIOMYOCYTES. B) LES HUVECS N'EXPRIMENT QUE LES INTEGRINES $\beta 1$ ET $\beta 3$. LES INTEGRINES $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$ ET $\beta 8$ SONT RETROUVEES DANS LA FRACTION NON MYOCYTAIRES. LES CARDIOMYOCYTES EXPRIMENT LES INTEGRINES $\beta 1$ ET $\beta 3$.	160
FIGURE 57 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DE LA QUANTITE D'ARN CODANT POUR LES DIFFERENTES INTEGRINES DANS LES DIFFERENTES POPULATIONS CONSIDEREES LORS DE L'ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE. L'ECHELLE DE COULEUR DECRIT UNE ABONDANCE DU PLUS FAIBLE EN BLEU VERS L'ABONDANCE LA PLUS FORTE EN ROUGE. LES CELLULES PW1 ⁺ EXPRIMENT DE MANIERE PLUS FORTE CD51 (ITGAV) QUE LES AUTRES CELLULES (EN HAUT). LES INTEGRINES $\beta 3$, $\beta 5$ ET $\beta 8$ (ITGAB3, ITGAB5, ITGAB8) SONT EXPRIMEES DE MANIERE FAIBLE PAR L'ENSEMBLE DES POPULATIONS, ET L'INTEGRINE $\beta 1$ (ITGB1) EST EXPRIMEE DE MANIERE FORTE PAR LES CELLULES PW1 ⁺ .	161
FIGURE 58 : DETAILS DE WESTERN BLOTS. LES ECHANTILLONS HUVEC ET CŒUR DE SOURIS NEONATALE SONT DES CONTROLES POSITIFS DES DIFFERENTES INTEGRINES. L'EXPRESSION DE CD51 EST RETROUVEE DANS LES CELLULES EXPRIMANT PW1, AINSI QUE LES INTEGRINES $\beta 1$ ET $\beta 3$ TANDIS QUE LES INTEGRINES $\beta 5$ ET $\beta 8$ NE LE SONT PAS.	162
FIGURE 59 : REPRESENTATION STATISTIQUE DES DONNEES D'EXPRESSION DES GENES ACTA2, MMP2 ET TGFR- $\beta 1$ EN REPONSE AU TRAITEMENT AU CILENGITIDE. LE TRAITEMENT PERMET D'OBSERVER UNE TENDANCE A LA REPRESSION DE L'EXPRESSION DES GENES PROFIBROTIQUES, UNE DOSE SUFFISAMMENT FORTE PERMETTANT DE REDUIRE DE MANIERE SIGNIFICATIVE L'EXPRESSION DE LA METALLOPROTEASE 2 (MMP2).	165
FIGURE 60 : LES ANIMAUX ONT REÇU UNE DOSE DE CILENGITIDE (10MG/KG/JOUR DANS UN VOLUME DE 50 μ L) OU DE SOLVANT (50 μ L/JOUR) PENDANT 14 JOURS. AU BOUT DE 6 JOURS, TOUS LES ANIMAUX SUBISSENT UNE ECHOGRAPHIE CARDIAQUE, ET LE LENDEMAIN LES ANIMAUX DU GROUPE « IDM » SUBISSENT UNE LIGATURE DE L'ARTERE CORONAIRE ANTERIEURE DESCENDANTE. A 7 JOURS POST IDM (14 JOURS APRES LE DEBUT DU TRAITEMENT) UNE ECHOGRAPHIE CARDIAQUE EST REALISEE, PUIS LES ANIMAUX SONT EUTHANASIES ET LEURS CŒURS PRELEVES POUR ANALYSE.	166
FIGURE 61 : SCHEMA REPRESENTANT LA LOCALISATION DES COUPES DE CŒURS UTILISEES POUR CALCULER LA SURFACE OCCUPEE PAR LA FIBROSE.	167
FIGURE 62 : GRAPHE REPRESENTANT LA SURVIE DES ANIMAUX TRAITES AU CILENGITIDE (GRIS) ET DES ANIMAUX NON TRAITES (NOIR) AU COURS DE L'EXPERIENCE. UNE AMELIORATION SIGNIFICATIVE EST VISIBLE AVEC UN TRAITEMENT INHIBANT LES INTEGRINES. ...	169
FIGURE 63 : REPRESENTATION STATISTIQUE DES DONNEES DE FONCTIONS CARDIAQUES : LES ANIMAUX TRAITES (GRIS) ET NON TRAITES (NOIR) SANS IDM (GAUCHE) SONT COMPARABLES EN TERMES DE FONCTION CARDIAQUE (P < 0,0001). LES ANIMAUX AYANT SUBI UN IDM (DROITE) VOIENT LEUR FE BAISSER SIGNIFICATIVEMENT (P < 0,0001), CEPENDANT LES ANIMAUX TRAITES ONT DES FONCTIONS CARDIAQUES SIGNIFICATIVEMENT (P < 0.01) MOINS DIMINUEES QUE LES ANIMAUX NON TRAITES.	170

FIGURE 64 : MICROPHOTOGRAPHIES REPRESENTATIVES DE COUPES DE CŒUR COLOREES AU ROUGE SIRIUS PROVENANT DE SOURIS TRAITEE AU CILENGITIDE (A GAUCHE), OU NON TRAITEE (A DROITE). IL SEMBLE QUE LA ZONE INFARCTUE SOIT DE TAILLE REDUITE ET LE MUSCLE MOINS ATTEINT DANS LES CONDITIONS TRAITES PAR RAPPORT AUX CONDITIONS CONTROLES, NEANMOINS DES MESURES FIABLES DOIVENT ETRE REALISEES AFIN DE CONFIRMER CES OBSERVATIONS. 171

FIGURE 65 : REPRESENTATION STATISTIQUE DES MESURES DE FIBROSE CARDIAQUE POST INFARCTUS EN CONDITIONS TRAITES AU CILENGITIDE (A DROITE) COMPAREE AUX CONDITIONS IDM NON TRAITES (A GAUCHE). UNE REDUCTION SIGNIFICATIVE DE LA FIBROSE EST VISIBLE DANS LES CŒURS DE SOURIS TRAITES AU CILENGITIDE ($p < 0,01$) CE QUI REPRESENTE UNE BAISSSE DE 7 % DE FIBROSE ENTRE LES CONDITIONS TRAITES (21,34 % DE FIBROSE) ET LES CONDITIONS NON TRAITES (28 % DE FIBROSE). 171

FIGURE 66 : SCHEMA RECAPITULATIF DE LA STRATEGIE UTILISEE POUR ACCEDER AUX PROTEINES SECRETEES ET SUREXPRIMEES PAR LES PROGENITEURS SELON QU'ILS AIENT ETE OBTENUS DE CŒURS SAINS OU INFARCTES. ABOND : ABONDANCE ; GENE ID : IDENTIFIANT UNIQUE DE GENES..... 212

Table des tableaux

TABLEAU 1 : D'APRES IANCU ET AL. D'APRES (IANCU ET AL., 2015).	52
TABLEAU 2 : LISTE DES ORGANES DANS LESQUELS A ETE RETROUVE PW1.	55
TABLEAU 3 : LISTE DES TYPES CELLULAIRES UTILISES POUR LE RNASEQ ET LEUR ORIGINE.	115
TABLEAU 4 : LISTE DES PROTEINES RETROUVEES A LA FOIS PREDITES POUR ETRE ASSOCIEES A LA PRESENCE DE PW1 ET PAR SPECTROMETRIE DE MASSE.	127
TABLEAU 5 : LISTE DES ANTICORPS COUPLES UTILISES AU COURS DE CETTE ETUDE.	135
TABLEAU 6 : VOLUME DE SOLUTION CALCIQUE AJOUTEE POUR 10ML DE SUSPENSION CELLULAIRE ET CONCENTRATION EN CALCIUM LORS DE LA REMONTEE CALCIQUE.	156
TABLEAU 7 : LISTE DES ANTICORPS UTILISES POUR LA REVELATION DES WESTERN BLOTS ET CONDITIONS D'INCUBATION CORRESPONDANTES.	158
TABLEAU 8 : REPARTITIONS DES ANIMAUX DANS LES DIFFERENTS GROUPES.	166

Table des annexes

ANNEXE 1 : SCHEMA RECAPITULATIF DES DIFFERENTES ETAPES DE LA STRATEGIE UTILISEE POUR OBTENIR LES MEMBRANOMES DES DIFFERENTES POPULATIONS ANALYSEES PAR RNASEQ.	223
ANNEXE 2: CYTOGRAMMES REPRESENTATIFS DE L'ANALYSE DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS CD140A (PDGFRA) ET DE L'ACTIVITE B-GAL DE POPULATIONS DE CELLULES VIVANTES EXPRIMANT CD51 ET/OU CD45. LE PANNEAU DU HAUT REFLETE LA SEGREGATION SELON CD140A, LES PANNEAUX DU BAS, L'ACTIVITE B-GAL DANS LES POPULATIONS DEFINIES EN FONCTION DE L'EXPRESSION DE CD140A. DE MANIERE INTRIGANTE, LA POPULATION CD51 ⁺ CD45 ⁻ EST MAJORITAIREMENT POSITIVE POUR B-GAL DANS LE SOUS-GROUPE EXPRIMANT PDGFRA, ALORS QUE L'INVERSE EST VISIBLE DANS LA POPULATION CD51 ⁺ CD45 ⁺ , DANS LAQUELLE L'EXPRESSION DE PDGFRA EXCLUT TOTALEMENT L'EXPRESSION DE LA B-GAL.	224
ANNEXE 3 : PARAMETRES UTILISES EN REFERENCE A L'ANNEXE 1 POUR OBTENIR LE MEMBRANOME PREDIT (EN ROUGE SONT SIGNALES LES PARAMETRES MODIFIES POUR OBTENIR LE SECRETOME).....	225
ANNEXE 4 : LISTE DES 378 TRANSCRITS RETROUVES COMME SPECIFIQUES A LA MEMBRANE DES CELLULES PW1+.	227
ANNEXE 5 : CONTENU DU SCRIPT DE CALCUL DES MASSES THEORIQUES ATTENDUES.....	254
ANNEXE 6 : LISTE DES PROTEINES MEMBRANAIRES RETROUVEES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE DANS LES CELLULES PW1 ⁺ PUIS VERIFIEE VIA IPA.	258
ANNEXE 7 : PARAMETRES UTILISES DANS L'ANNEXE 1 POUR OBTENIR LE SECRETOME PREDIT (EN ROUGE SONT SIGNALES LES PARAMETRES MODIFIES POUR OBTENIR LE MEMBRANOME).	275
ANNEXE 8 : PARAMETRES UTILISES POUR OBTENIR LES CANDIDATS SECRETES DONT L'EXPRESSION A FORTEMENT VARIE ENTRE LES CONDITIONS NORMALES ET INFARCIES.	277

Partie 1 : Introduction

Données épidémiologiques

Les maladies cardio-vasculaires (CVD) représentent à l'heure actuelle la première cause de décès dans les pays occidentaux. Chaque année, 4 millions d'européens meurent à la suite d'une CVD, ce qui représente 45 % des décès en Europe. Bien que la mortalité associée aux CVD soit en baisse constante ces dernières années (figure 1), ceci s'accompagne d'une augmentation du nombre de patients présentant une altération de leur qualité de vie en lien avec le développement d'une atteinte cardiaque cicatricielle. L'expression la plus frappante de ce phénomène correspond à l'augmentation constante du nombre de patients présentant une insuffisance cardiaque en dépit de l'amélioration de la prise en charge de ces mêmes patients.

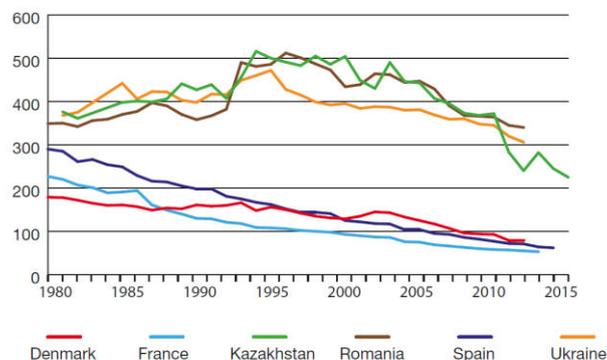


Figure 1 : Mortalité masculine par infarctus du myocarde (IDM) de 1980 à 2015 en Europe (Wilkins et al., 2017).

La lutte contre l'insuffisance cardiaque est un enjeu de santé publique majeur, notamment dans les pays développés. On estime que 1 à 2 pour cent de leur population générale en sont atteints, proportion qui monte à 10 % dans les populations âgées de plus de 70 ans, population en constante augmentation dans ces mêmes pays (McMurray et al., 2012). La prévalence augmente avec l'âge surtout après 50 ans, et le pronostic de survie est faible : il est ainsi

estimé que plus de la moitié des patients décèdent dans les 4 ans suivant le premier diagnostic d'insuffisance cardiaque. Les femmes sont moins fréquemment atteintes que les hommes, mais l'évolution des modes de vie et de consommation tend à réduire cette différence. Le risque de voir apparaître une insuffisance cardiaque après 40 ans est de 21 % chez l'homme et 20 % chez la femme d'après l'étude de Framingham aux Etats-Unis (Framingham et al., 2002). Une autre étude, souligne qu'après 55 ans le risque d'apparition d'une insuffisance cardiaque est de 33 % chez l'homme et 28,5 % chez la femme (Bleumink et al., 2004) (figure 2).

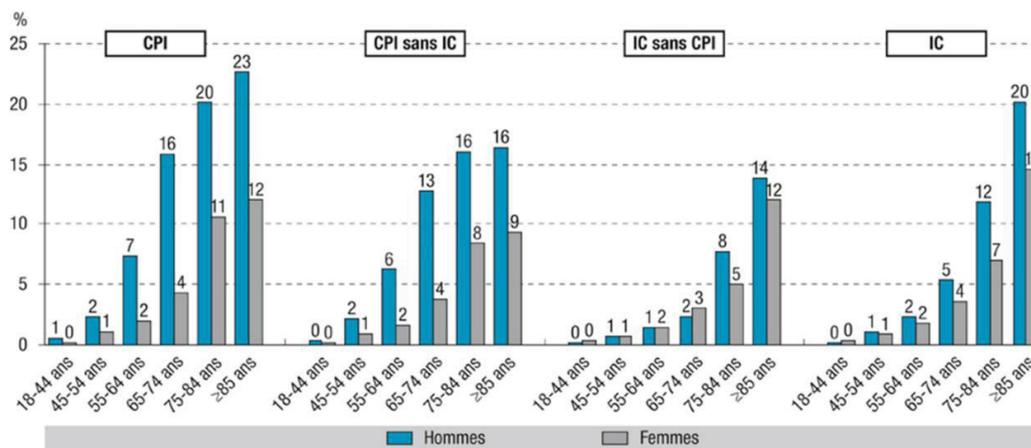


Figure 2 : Prévalence des cardiopathies ischémiques (CPI) et de l'insuffisance cardiaque selon l'âge et le sexe en France (Source : enquête handicap-santé ménages 2008).

Présentation des formes d'insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque est la conséquence et l'expression finale de nombreuses atteintes cardiovasculaires. On parle en effet d'insuffisance cardiaque lorsque le cœur n'est plus capable d'assurer sa fonction normale de pompe. Ainsi les causes sont diverses, et les ischémies consécutives à l'obstruction des artères coronaires sont les sources principales d'insuffisance cardiaque. Des facteurs aggravants sont également retrouvés chez ces patients ischémiques, en particulier le diabète et l'hypertension artérielle. La principale cause d'insuffisance cardiaque est la cardiopathie ischémique (environ la moitié des cas). Elle représente aussi la principale cause de décès (14 % des décès) et sa forme la plus sévère, l'infarctus du myocarde (IDM) qui est l'occlusion totale d'un vaisseau par un thrombus ou un

morceau de plaque d'athérome qui s'est détaché, représente à lui seul la moitié des décès dû aux cardiopathies ischémiques (Wilkins et al., 2017) (figure 3).

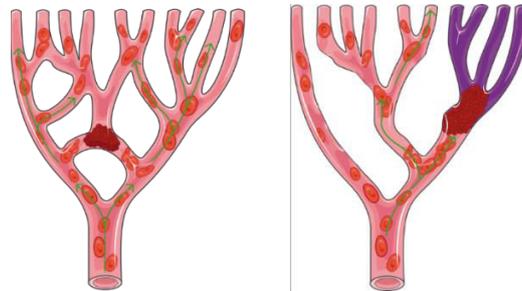


Figure 3 : Représentation de la survenue d'une occlusion dans un système vasculaire branché (à gauche) et un système vasculaire terminal (à droite). Dans le cas d'une circulation branchée, la circulation collatérale est importante et présente ainsi un risque d'anoxie moindre pour le tissu (adapté de Servier Medical ART).

L'insuffisance cardiaque peut aussi provenir de facteurs génétiques qui peuvent être à l'origine de pathologies du myocarde qui vont évoluer dans le temps en insuffisance cardiaque. Ces maladies sont appelées cardiomyopathies. Différentes formes ont été documentées. Selon les statistiques européennes (Wilkins et al., 2017), les cardiomyopathies représentent environ 12 % des causes d'insuffisance cardiaque. Certaines myopathies sont plus spécifiques du ventricule droit, d'autres du ventricule gauche. Enfin, certaines cardiomyopathies sont d'origine environnementale, consécutives à une exposition à des toxines naturelles ou un traitement médicamenteux lourd. Certaines chimiothérapies anti-cancéreuses, par anthracyclines par exemple, peuvent engendrer des insuffisances cardiaques de manière dose-cumulative.

L'insuffisance cardiaque n'est donc pas une maladie spécifique mais un syndrome clinique qui survient quand le cœur ne peut plus assurer sa fonction de pompe. L'insuffisance est ainsi caractérisée par des symptômes dits « typiques » et une fonction ventriculaire anormale. Les symptômes sont la conséquence de la perte de fonction contractile ou de relaxation du cœur, et les anomalies ventriculaires peuvent ainsi être classées en deux types : la dysfonction systolique et la dysfonction diastolique.

- Dysfonction systolique :

La dysfonction systolique est caractérisée par une anomalie de l'éjection ventriculaire, le ventricule se contractant de manière plus faible que la normale. On définit la fraction d'éjection (en pourcentage) en rapportant le volume d'éjection systolique au volume télédiastolique. Le volume téléstolique est le volume minimal du ventricule gauche après contraction, tandis que le volume télédiastolique est le volume maximal lorsque le cœur est relaxé. La différence entre le volume télédiastolique et le volume téléstolique définit le volume d'éjection systolique. Un individu sain possède une fraction d'éjection supérieure à 60 %. La fraction diminue avec les anomalies de contractilité (figure 4). Les autorités européennes de santé ont défini la fonction systolique comme modérément atteinte lorsque la fraction est comprise entre 40 et 50 %, réduite lorsque cette fraction est inférieure à 40 % et jusqu'à sévère lorsque le seuil des 35 % est dépassé.

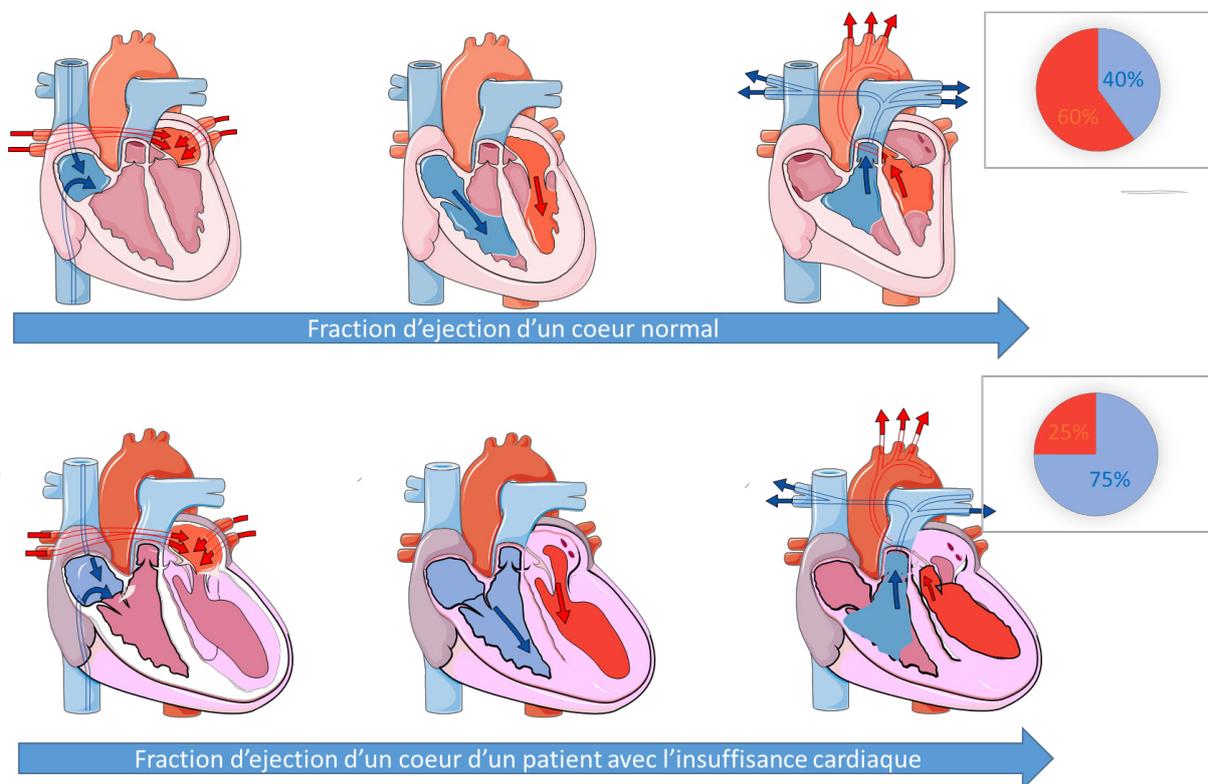


Figure 4 : Réduction de la fraction d'éjection (Servier Medical ART).

La dysfonction systolique retentit directement sur le débit cardiaque. Le débit est en effet défini par une relation proportionnelle entre la fréquence cardiaque et le volume d'éjection systolique. Le débit est donc lié aux fonctions contractiles du cœur mais est également affecté par des phénomènes de changements de pressions, en particulier au moment du remplissage (précharge) et de la vidange des ventricules (postcharge) :

- La précharge correspond au remplissage des ventricules. En cas d'insuffisance cardiaque, la pression de remplissage est élevée, et se traduit par des pressions en amont des ventricules. Particulièrement au niveau pulmonaire, ce qui entraîne une congestion pulmonaire et un essoufflement du patient.
- La postcharge correspond à la vidange des ventricules, en particulier la résistance éprouvée par le ventricule gauche à l'éjection du sang. Ce paramètre peut par exemple être mesuré lors de la prise de la tension artérielle. Une augmentation de la pression artérielle peut provoquer une insuffisance cardiaque. Le niveau de résistance des vaisseaux périphériques est aussi un déterminant essentiel de la postcharge.

- Dysfonction diastolique :

La dysfonction diastolique est caractérisée par une altération de la relaxation du muscle cardiaque. Le cœur ne se relâche plus correctement entraînant une diminution de la compliance cardiaque, capacité de modification du volume ventriculaire en réponse à une variation de pression. Cela veut dire que la diminution de la compliance va induire une demande d'effort supérieur pour éjecter le même volume, notamment en augmentant la fréquence cardiaque. Le muscle va perdre sa souplesse et s'épaissir (ou s'hypertrophier). On observe également une augmentation des pressions pulmonaires causée par la perte d'aspiration post-systolique du ventricule gauche due à la rigidification du myocarde.

Cardiopathie ischémique

Le cœur est l'organe qui permet au sang de circuler dans l'ensemble de l'organisme en agissant comme une pompe. Le cœur est composé de quatre chambres dont les parois

contractiles (myocarde) sont recouvertes sur la face interne par une mince couche de cellules endothéliales (endocarde) et sur la face externe par des cellules mésothéliales (péricarde). Le myocarde est composé de cellules musculaires (cardiomyocytes), de tissu conjonctif et d'un système nerveux permettant la contraction de l'organe de manière autonome. Le cœur est lui-même irrigué comme tous les autres organes pour permettre l'apport d'énergie, majoritairement sous forme d'acides gras de manière basale, et d'oxygène afin de répondre aux besoins nécessaires à la contraction des cardiomyocytes, et ainsi de propulser le sang dans le système vasculaire. Pour ce faire, le sang est apporté par les artères coronaires. Celles-ci prennent leur origine depuis l'aorte initiale et se subdivisent en longeant les fibres musculaires avant de revenir par la circulation veineuse. Le système vasculaire cardiaque est de type terminal, grossièrement les artères se subdivisent sans jamais subir d'anastomose. Ce système est plus performant en termes de vascularisation mais présente un risque anoxique plus élevé en cas de sténose ou d'occlusion (figure 3). Cependant, en cas d'ischémie cardiaque, de nouveaux vaisseaux peuvent être créés et une certaine circulation collatérale peut se mettre en place, palliant partiellement l'occlusion, mais n'irriguant, le plus souvent, que de manière insuffisante pour éviter la nécrose.

La cardiopathie ischémique, également appelée maladie coronarienne, est très majoritairement causée par la réduction du diamètre interne des vaisseaux, par le dépôt de plaques d'athérome (dépôts complexes et rigides de biomolécules circulantes). La cardiopathie ischémique ainsi que l'athérosclérose sont des maladies dont les facteurs de risques sont l'âge, le sexe masculin, le diabète sucré, le tabagisme, l'alcoolisme, l'hypertension, l'hypercholestérolémie ainsi que des facteurs héréditaires. D'autres causes plus rares ont été observées comme des phénomènes inflammatoires (maladie de Kawasaki, vascularite, péri-artérite, ...), des malformations (anévrismes ponctuels et congénitaux, anomalies d'implantation des coronaires), des embolies coronaires ou encore la dissection spontanée d'une coronaire. La zone en aval de cet IDM ou du rétrécissement est appelée zone ischémisée.

La réduction et l'arrêt de la circulation au niveau cardiaque est également appelé cardiopathie ischémique, menant à la souffrance des cellules et dans les cas les plus sévères à la nécrose du tissu suivie d'un remodelage cardiaque profond irréversible (Figure 5). L'occlusion coronaire ou infarctus, est due dans la plus grande majorité des cas à une occlusion

thrombotique et touche généralement le ventricule gauche. L'occlusion thrombotique est liée à la constitution d'un thrombus (initialement plaquettaire puis fibrineux) en réaction à la fissuration d'un morceau de plaque d'athérome. Ce phénomène conduit à la constitution de lésions athérothrombotiques. La lésion responsable de l'infarctus peut être identifiée et traitée, mais le plus souvent des lésions annexes sont présentes, en particulier l'infiltration de l'ensemble du système coronaire par des plaques d'athérome. De plus, la constitution d'un thrombus ne nécessite pas l'existence d'une plaque athéromateuse très développée et sténosante. C'est la fissuration et le contact entre la circulation sanguine et le contenu de cette plaque (matériel athéromateux, spumeux et inflammatoire) qui est à l'origine de l'activation de l'hémostase primaire et de la constitution du thrombus.

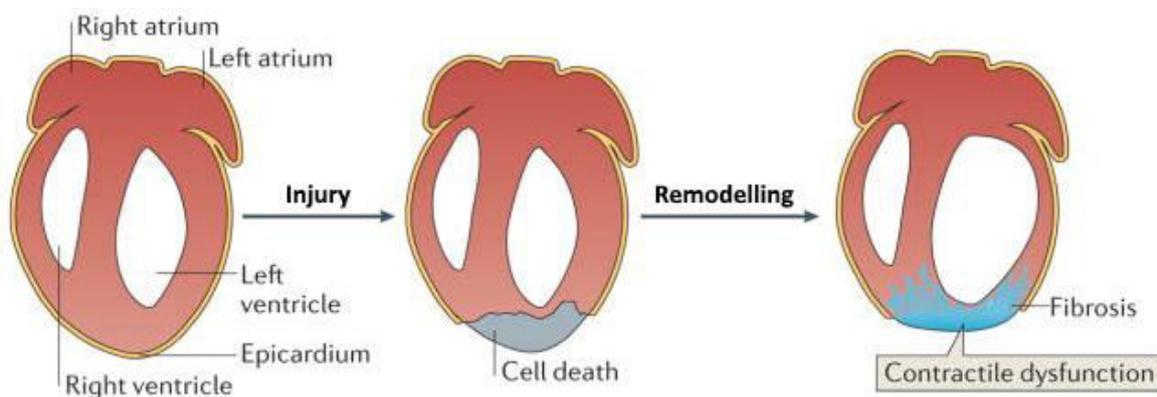


Figure 5 : Adapté de Xing et al nature reviews, 2013(Xing, 2013).

Un infarctus du myocarde (IDM) survient pour 40 % des cas d'IDM comme la première manifestation clinique d'insuffisance coronarienne. Les 60 % restants sont des IDM qui apparaissent chez des patients ayant déjà une maladie coronarienne établie. Les symptômes sont dominés par une violente douleur thoracique pouvant irradier les membres supérieurs et la mâchoire. La douleur est généralement très forte, persistant pendant plusieurs heures et résistante à la plupart des analgésiques autres que les dérivés morphiniques. Cette douleur n'est cependant pas ressentie par un quart des patients. La douleur peut être accompagnée de pâleur, malaises, sueurs, essoufflement, nausées ou encore une fatigue inexplicable. Ces symptômes durent généralement plus de 5 minutes et ne disparaissent pas au repos. L'électrocardiogramme permet d'obtenir le diagnostic certain d'IDM.

Au niveau de l'électrocardiogramme, dans la phase la plus précoce (dans les minutes suivant l'IDM) une modification du segment ST est visible, pouvant englober l'onde T. Cette élévation traduit la dépolarisation des régions ischémisées par rapport aux autres régions ce qui explique que la surélévation soit localisée. Celle-ci va perdurer puis s'atténuer au fur et à mesure que la nécrose s'installe. Vers la 20^{ème} heure post-IDM, l'onde Q de nécrose va apparaître (augmentation de l'amplitude de l'onde Q). Cette modification demeure définitive et traduit le remodelage définitif des zones infarctées (figure 6).

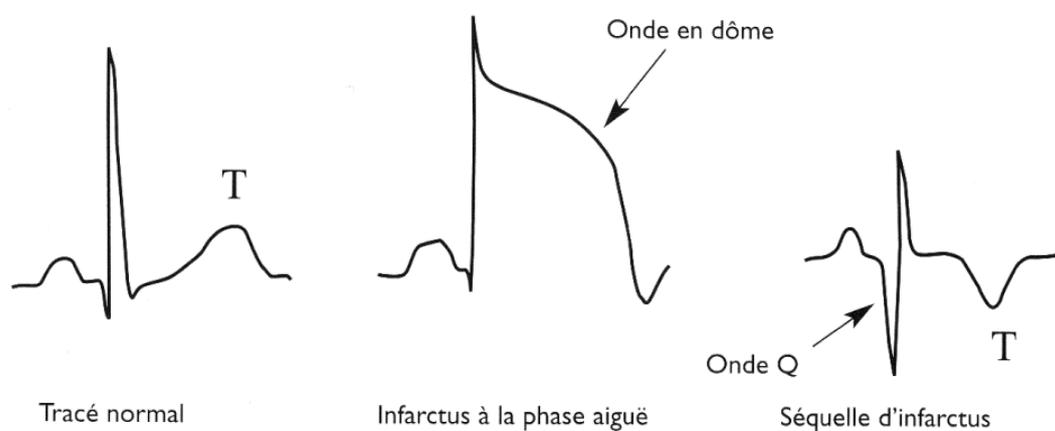


Figure 6 : Modification de l'électrocardiogramme à la phase aiguë et chronique post IDM (Carrère D'Encausse M. & Cymes M, 2007).

En l'absence de reperfusion, l'ischémie myocardique n'est pas levée et l'infarctus du myocarde s'étend (figure 7). Cette zone nécrotique va faire l'objet d'un processus immuno-inflammatoire intense puis d'un remodelage tissulaire.

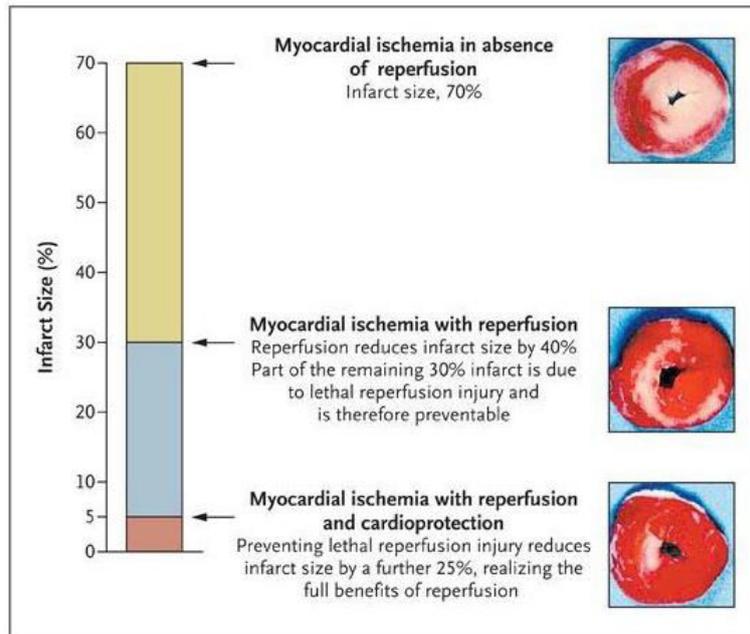


Figure 7 : Taille de l'infarctus en fonction du traitement mis en place : La reperfusion permet une réduction drastique de la taille de la zone remodelée. L'ajout d'un traitement cardioprotecteur agit en synergie avec la reperfusion et permet une réduction supplémentaire de la zone infarctée (Yellon & Hausenloy, 2007).

Modifications cellulaires et remodelage du myocarde après un infarctus

La nécrose est la mort de la plupart des cardiomyocytes de la zone infarctée. La mort cellulaire se traduit par la disparition des noyaux et une lyse des cellules qui vont se répandre. Ce dernier phénomène induit de manière relativement rapide (6 h) une réaction inflammatoire caractérisée par le recrutement de cellules immunitaires (leucocytes, macrophages, polynucléaires) qui sera suivie d'une phase de réparation plus tardive (figure 8). En parallèle, de manière à maintenir une fonction contractile et un débit cardiaque suffisant, les zones péri-infarctus vont également être profondément modifiées ce qui va résulter en une hypertrophie compensatrice. Ce mécanisme est activé par l'augmentation locale des taux d'angiotensine 2, d'endothéline et de norépinephrine. L'angiotensine et l'endothéline sont responsables d'une augmentation de la pression vasculaire via un effet vasoconstricteur. La norépinephrine est responsable d'une augmentation de la force de contraction du myocarde (l'endothéline également), d'une augmentation de la fréquence cardiaque et de l'augmentation de

l'excitabilité ventriculaire par liaison aux récepteurs bêta adrénergiques. L'action prolongée de ces trois molécules conduit à une transition précoce vers l'insuffisance cardiaque qui peut être ralentie par un traitement bêta bloquant (inhibiteur de la voie β -adrénergique), des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (qui permet l'activation de l'angiotensine 2).

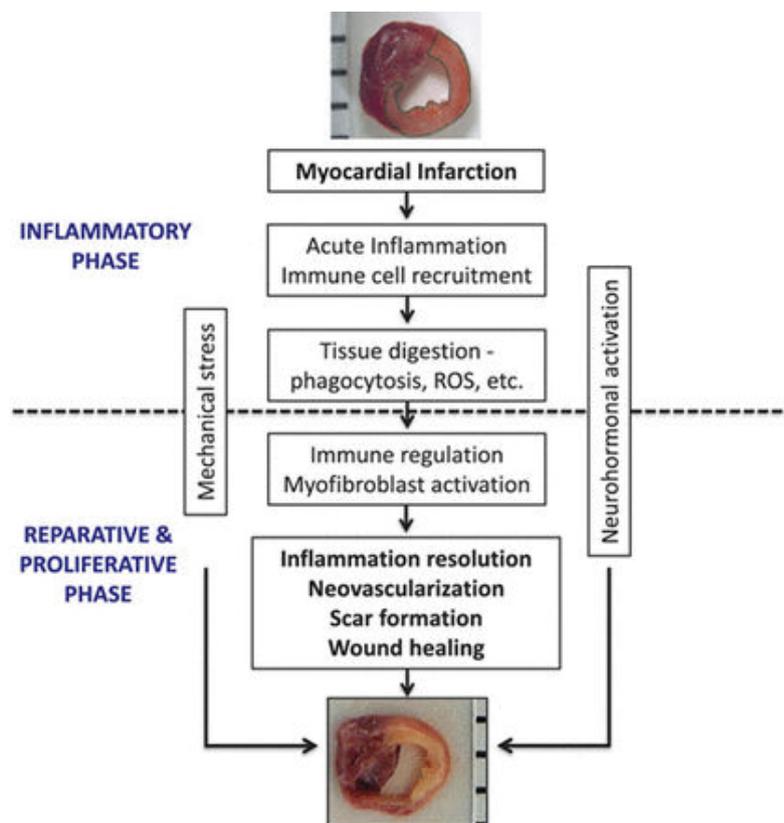


Figure 8 : Réaction biphasique de la réparation cardiaque post-infarctus. Rapidement après l'IDM, la nécrose du tissu induit une phase inflammatoire. Dans un second temps (4 jours post infarctus dans un modèle murin d'IDM) commence une phase de réparation caractérisée par la modulation de la réponse inflammatoire, une prolifération des myofibroblastes, la formation d'une cicatrice fibreuse et une néo-vascularisation (Prabhu & Frangogiannis, 2016).

L'inflammation en réponse à l'infarctus est se fait par l'intermédiaire de nombreuses cellules issues de la lignée myéloïde. Les premières cellules à infiltrer le myocarde lésé sont les neutrophiles. Ces cellules sont responsables de la sécrétion de nombreuses chimiokines et de protéases. Ces dernières vont permettre une première étape de nettoyage. Les neutrophiles vont recruter des monocytes et des macrophages qui vont à leur tour sécréter de nombreuses

molécules dont des médiateurs de l'inflammation, des espèces réactives de l'oxygène et des enzymes protéolytiques. L'ensemble de ces signaux va permettre de moduler l'inflammation et d'activer des processus favorisant la réparation du myocarde (phagocytose, protéolyse, angiogenèse). Cependant le rôle des macrophages est ambivalent certains ayant un comportement réparateur (M2) tandis que d'autres auraient un rôle néfaste (M1) favorisant les risques de rupture cardiaque. Ces macrophages M1 sembleraient régulés par des cellules dendritiques ; ces dernières permettraient également un remodelage bénéfique du cœur post infarctus par un mécanisme encore mal défini. Les cellules dendritiques sont néanmoins responsables de l'inhibition des lymphocytes T en réduisant leur prolifération, la sécrétion d'anticorps et leurs activités cytotoxiques. Enfin des mastocytes participeraient également au maintien des fonctions cardiaques en agissant directement sur la sensibilité des cardiomyocytes au calcium, permettant un fonctionnement correct des myofilaments (Zlatanova, Pinto, & Silvestre, 2016) (figure 9).

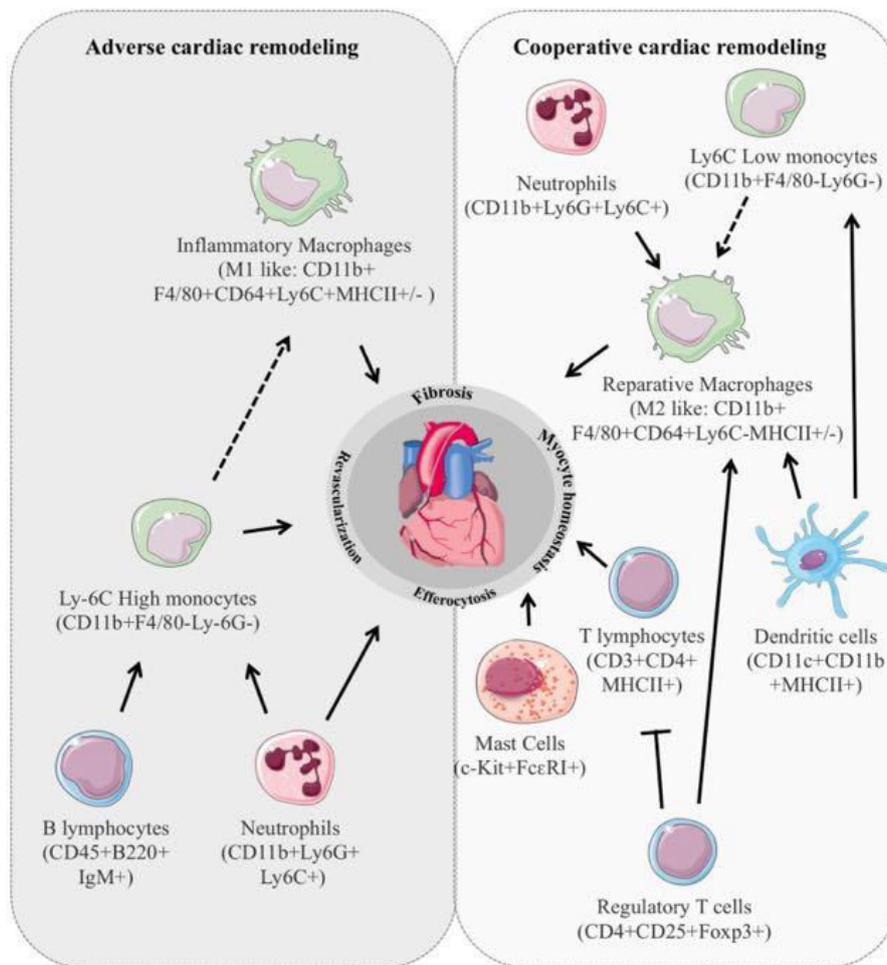


Figure 9 : Schéma résumant la participation des différentes populations du système immunitaire dans le processus inflammatoire de la phase précoce post-infarctus. A gauche, les acteurs d'un remodelage adverse et à droite, les acteurs du remodelage bénéfique après un IDM (Zlatanova et al., 2016).

Après la phase inflammatoire (figure 10) survient une phase de réparation du tissu. L'organisme, par ce mécanisme, va nettoyer la zone nécrosée des cellules mortes et ainsi laisser la place à un processus de remplacement qui est essentiellement de nature fibrotique. Les cellules contractiles mortes sont remplacées par de la matrice extracellulaire, synthétisée par des fibroblastes cardiaques activés, population hétérogène de cellules aux phénotypes différents. On retrouve en particulier les myofibroblastes qui sécrètent de grandes quantités de protéines constitutives de la matrice extracellulaire (Turner & Porter, 2013) et très impliquées dans la réponse à l'IDM (Yong et al., 2015). Cette fibrose de remplacement est nécessaire afin de garantir l'intégrité de la paroi du myocarde et éviter la rupture cardiaque. Cependant, en plus de cette fibrose de remplacement, une fibrose interstitielle apparaît et

s'étend dans l'interstitium à partir de la zone nécrosée. L'accumulation de ces composants de matrice extracellulaire va perturber grandement le fonctionnement du cœur au niveau mécanique et induire des dysfonctionnements dans la transduction des signaux électriques (Gourdie, Dimmeler, & Kohl, 2016; A. H. Li, Liu, Villarreal, & Garcia, 2014) ce qui a pour conséquence finale la disruption de la structure du cœur, accélérant également la survenue de l'insuffisance cardiaque (Gourdie et al., 2016; A. H. Li et al., 2014; Travers, Kamal, Robbins, Yutzey, & Blaxall, 2016).

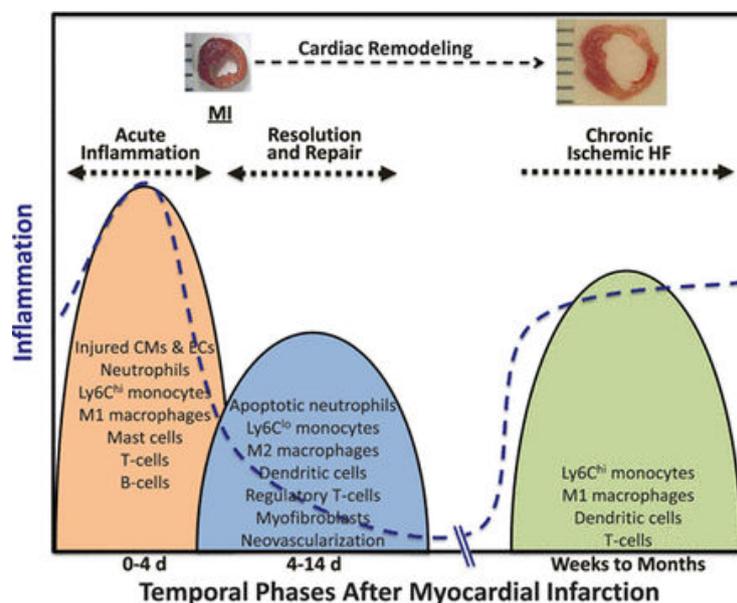


Figure 10 : Temporalité de la réparation du myocarde post-infarctus et de l'activation inflammatoire. La première phase est une phase inflammatoire aiguë survenant dans les heures qui suivent l'IDM où différents acteurs cellulaires se succèdent afin de préparer la phase de réparation qui a pour but de maintenir l'intégrité de l'organe. Une troisième phase apparaît plus tardivement après survenue d'un remodelage délétère causé par une fibrose interstitielle extensive conduisant à l'insuffisance cardiaque (Prabhu & Frangogiannis, 2016).

La destruction du myocarde se traduit également par la libération d'enzymes cardiaques qui passent dans la circulation. Ces enzymes peuvent être dosées parmi lesquelles sont étudiées :

- Les transaminases glutamo-oxaliques : apparaissent à H + 12 et persistent jusqu'au 5^{ème} jour,
- Les lactico-deshydrogénases : augmentent à partir de J + 1 et persistent jusqu'au 10^{ème} jour,

- Les créatinines phospho-kinases (CPK) : enzymes spécifiques du muscle, mais non spécifiques de l'IDM, s'élèvent à partir de H + 7 et persistent jusqu'au 3^{ème} jour,
- Les CPK-MB, spécifiques du myocarde, ont une cinétique semblable aux CPK totales.

On peut également doser d'autres protéines, comme la myoglobine et les troponines T et I, mais ces dosages interviennent généralement plus tardivement que les dosages enzymatiques.

Origine et composition de la fibrose

L'insuffisance cardiaque, qui est la manifestation clinique de nombreuses formes de maladies cardiaques dont les cardiopathies ischémiques, est caractérisée entre autres par une fibrose interstitielle. La fibrose est caractérisée par un dépôt et une accumulation de matrice extracellulaire anormale qui réduit les capacités du myocarde et accélère la survenue de l'insuffisance cardiaque. Ces dépôts de matrice sont causés par la sécrétion de protéines par des fibroblastes cardiaques activés dont l'origine est diverse (Ali et al., 2014; Mikawa & Gourdie, 1996; Moore-Morris et al., 2014). Ces origines diverses rendent difficile la définition de biomarqueurs spécifiques aux fibroblastes. Il n'y a pas non plus, à ce jour, de marqueurs permettant de distinguer de manière fiable les fibroblastes quiescents des fibroblastes activés (myofibroblastes) qui sont cependant généralement définis par l'expression de α -SMA (α - *smooth muscle actin*), un marqueur observé dans les cellules musculaires lisses. Il est possible que l'expression de différents marqueurs sur ces fibroblastes varie selon les conditions physiopathologiques et donc selon leur état d'activation, ce qui rend difficile l'identification d'un marqueur universel de fibroblastes.

D'un point de vue morphologique, le fibroblaste est une cellule de forme étoilée présentant un réticulum endoplasmique rugueux et des appareils de Golgi très développés, sous-tendant une activité de synthèse protéique très importante. Le myofibroblaste quant à lui est une cellule présentant à la fois les caractéristiques d'un fibroblaste (forme, réticulum endoplasmique rugueux proéminent) mais également d'une cellule musculaire lisse (filaments allongés, replis de la membrane nucléaire) (Sappino, Schürch, & Gabbiani, 1990). L'expérience acquise dans d'autres organes a permis de retrouver certains marqueurs tels FSP1 ou DDR2

mais l'étude de ces marqueurs de fibroblastes dans le cœur n'a pas permis de montrer une spécificité suffisante, DDR2 n'étant pas exprimé par tous les fibroblastes cardiaques et FSP1 pouvant être exprimé par des cellules n'étant pas des fibroblastes (Banerjee et al., 2007; Morales, Price, & Goldsmith, 2005; Strutz et al., 1995). CD90, marqueur de fibroblastes du thymus semble définir l'ensemble des fibroblastes cardiaques mais est également exprimé par des cellules immunes et des péricytes (Crisan et al., 2008; Jurisic, Iolyeva, Proulx, Halin, & Detmar, 2010; Raff, 1971). On retrouve également l' α -SMA dont l'expression est limitée à un sous-groupe de fibroblastes cardiaques activés dans les zones fibrotiques, mais également retrouvée dans l'épicerde, les cellules musculaires lisses, péricytes et cellules musculaires cardiaques (Moore-Morris et al., 2014; Porter & Turner, 2009; Skalli et al., 1986; Zeisberg et al., 2007). Les fibroblastes cardiaques expriment également PDGFR α , surtout dans la phase de réponse à l'IDM, des cellules épicerdiques l'expriment également (Acharya et al., 2012; Smith, Baek, Sung, & Tallquist, 2011). La vimentine est exprimée de manière stable par les fibroblastes cardiaques cependant, de nombreuses cellules endothéliales l'expriment aussi (Franke, Schmid, Osborn, & Weber, 1979; Lane, Hogan, Kurkinen, & Garrels, n.d.; Mørk, van Deurs, & Petersen, 1990). Des protéines secrétées peuvent également servir de marqueur comme le collagène 1A1 (Col1A1) ou la périostine. Le Col1A1 est synthétisé par la majorité des fibroblastes cardiaques mais il est également synthétisé dans l'épicerde, l'adventice des vaisseaux et les cellules interstitielles valvulaires (Acharya et al., 2012; Moore-Morris et al., 2014). La périostine est synthétisée lors du développement des fibroblastes et réexprimée en réponse à la pathologie, mais également produit dans l'épicerde par les cellules musculaires lisses vasculaires et les cellules interstitielles valvulaires (Kong, Christia, Saxena, Su, & Frangogiannis, 2013; Lajiness & Conway, 2014).

De la même manière que les marqueurs fibroblastiques ont été transposés après observation dans d'autres organes, il a été proposé que les fibroblastes cardiaques activés proviendraient de fibroblastes résidents (figure 11). Des études de traçage de lignée ont montré que ces fibroblastes cardiaques proviennent de l'épicerde embryonnaire, subissent une transition épithelo-mésenchymateuse (EMT) avant de s'établir dans le myocarde. L'EMT se produit sous l'impulsion de facteurs de croissance dont les FGF – *Fibroblast growth factor* et certains membres de la famille des TGF- β – *Transforming growth factor bêta* (Morabito, Dettman, Kattan, Collier, & Bristow, 2001). La transformation en fibroblastes à partir de ces cellules

ayant subi l'EMT serait une deuxième étape modulée par les facteurs TGF- β et PDGF – *Platelet derived growth factor* (Olivey, Mundell, Austin, & Barnett, 2006; Smith et al., 2011). Ces fibroblastes d'origine épiscopardique représenteraient la population fibroblastique majoritaire participant à la survenue de la fibrose (Ali et al., 2014; Moore-Morris et al., 2014). Cependant, il a également été montré que l'endocarpe participe à la population du septum interventriculaire en fibroblastes résidents à travers une transition endothélio-mésenchymateuse des cellules (EndMT) (Moore-Morris et al., 2014). Ces cellules peuvent participer à la fibrose en relation avec une surcharge de pression (Ali et al., 2014). Cette transition permet également la formation des valves cardiaques (Lincoln, Alfieri, & Yutzey, 2004). D'autres sources de fibroblastes ont également été mentionnées : les péricytes, cellules occupant l'espace périvasculaires, présentent un phénotype proche du fibroblaste avec la production de collagène. Des travaux récents ont montré la présence dans l'espace périvasculaire d'une population ressemblant aux cellules souches mésenchymateuses (MSC) et exprimant le marqueur Gli1. Ces cellules ont la capacité de proliférer et participent activement à la fibrose dans de nombreux organes en donnant naissance à des myofibroblastes (Kramann et al., 2015). Cette étude est l'une des premières à montrer la possibilité d'une origine cellulaire résidente de fibroblaste, de type progéniteur et via un mécanisme de re-différenciation en réponse à un processus pathologique.

Enfin la dernière source de fibroblastes décrite est une origine de cellules circulantes à partir de la moelle osseuse. Des expériences de traçage de lignée ont montré une apparition de cellules issues de la moelle osseuse dans les zones fibrotiques de lésions causées par des IDM ou une surcharge de pression (Kania et al., 2009; van Amerongen et al., 2008; Zeisberg et al., 2007). Cette contribution à la composition de la population fibroblastique cardiaque semble cependant transitoire et la contribution de ces cellules à la fibrose interstitielle semble peu probable d'après les auteurs (van Amerongen et al., 2008).

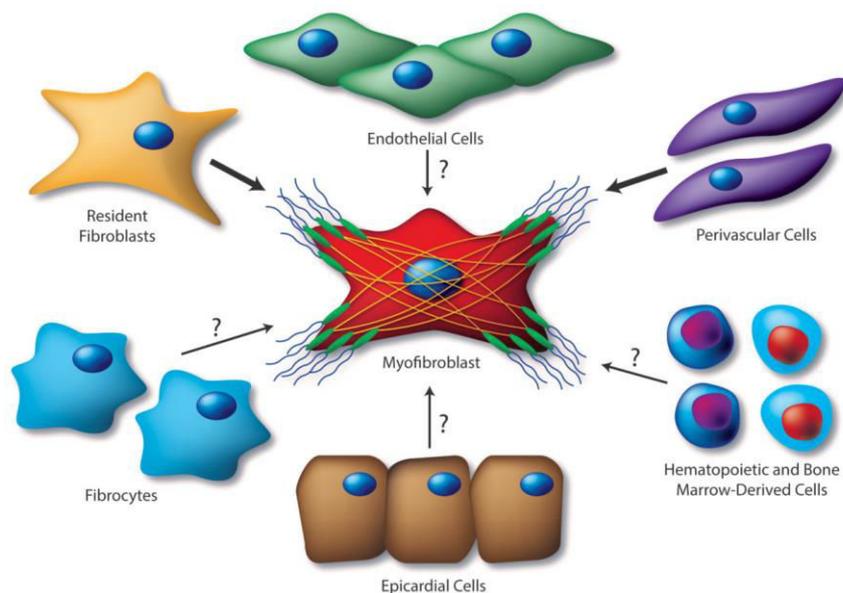


Figure 11 : Les fibroblastes cardiaques activés à l'origine de la fibrose sont supposés être dérivés des fibroblastes résidents. De nombreux progéniteurs fibroblastiques ont été proposés d'origines diverses. On retrouverait des fibroblastes originaires de la lignée hématopoïétique ayant migré depuis la moelle osseuse et ayant subi une transition endo-mésenchymateuse ; des fibroblastes originaire de progéniteurs périvasculaires et ayant subi une transition épi-mésenchymateuse (Travers et al., 2016).

La matrice extracellulaire (ECM) est de plus une structure nécessaire au maintien de l'intégrité de l'architecture de l'organe, elle est hautement régulée en conditions normales et possède de nombreuses fonctions : elle sert de point d'ancrage des cellules, elle définit également l'élasticité et la rigidité du tissu mais sert également de réservoir en nutriments, facteurs de croissance et de cytokines pour les cellules environnantes (d'où la notion de matrikines (Barallobre-Barreiro et al., 2012)). La composition de l'ECM joue également un rôle dans la régulation de la fonction des fibroblastes, au travers de l'association des fibroblastes et de l'ECM par les intégrines (Geiger, Bershadsky, Pankov, & Yamada, 2001; Paine & Ward, 1999). En effet, la synthèse de composants de l'ECM par les fibroblastes comme la prolifération de ces derniers est médiée par une différence de composition de l'ECM (Paine & Ward, 1999; Torry, Richards, Podor, & Gauldie, 1994) dans des conditions non pathologiques. De plus la composition de l'ECM a un impact indirect sur l'activité et la différenciation des fibroblastes par son rôle de réservoir de facteur de croissance solubles. On retrouve par exemple le $TGF\beta 1$ lié sur les fibres de collagène 4 et sur les chondroïtines sulfates, tandis que les héparanes

sulfates vont fixer le TGF β 1 et le FGF2 (Schlondorff, 1993). Le remodelage tissulaire observé dans un cœur lésé va donc modifier profondément la composition de l'ECM, libérant les facteurs de croissance emprisonnés mais libérant également des sous-produits de dégradation qui peuvent ensuite être reconnus et activer des voies cellulaires (Bassat et al., 2017; Buraschi et al., 2013) (figure 12). La modification de l'ECM va également avoir des conséquences sur les forces physiques appliquées sur les cellules ; la transition vers le myofibroblaste serait due à l'application de forces physiques combinées à la liaison du TGF β 1 sur les fibroblastes (Tomasek, Gabbiani, Hinz, Chaponnier, & Brown, 2002)

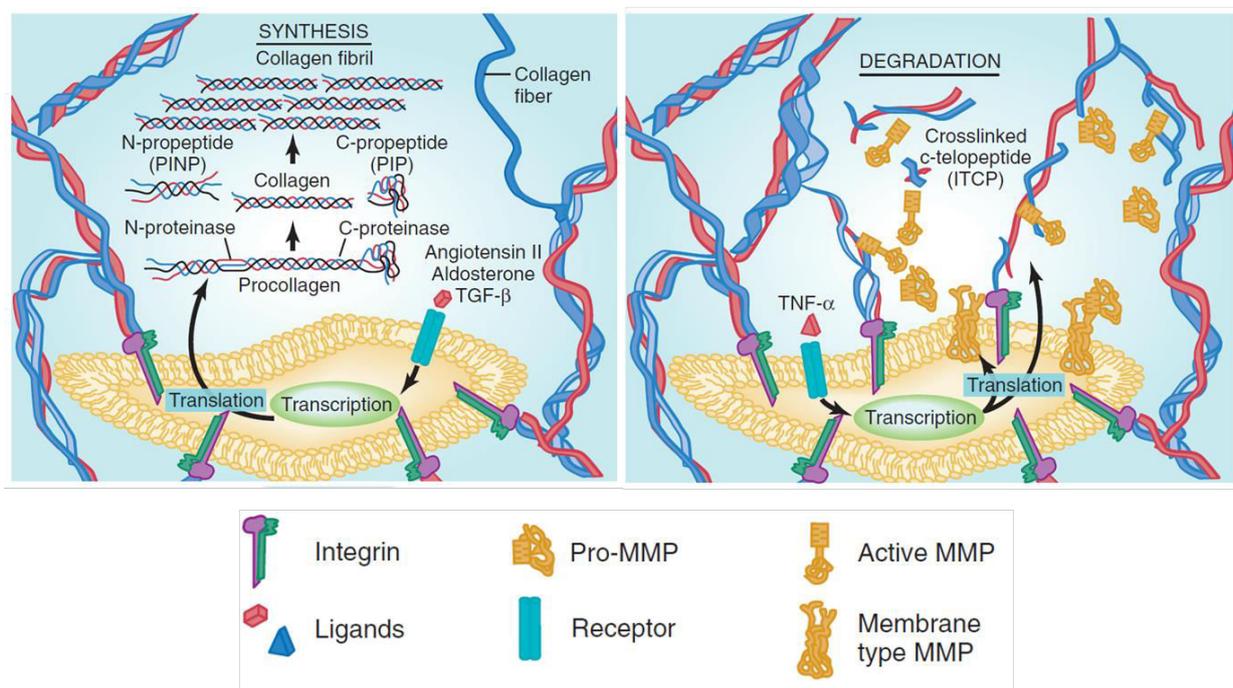


Figure 12 : Processus de modification de l'ECM au cours du remodelage cardiaque. A gauche, dans un contexte normal, les fibres de collagène sont synthétisées puis excrétées avant leur clivage, permettant un assemblage correct des triples hélices fibreuses. A droite, au cours du remodelage, les fibres sont dégradées jusqu'à ce que les fibres soient dégradées en larges complexes protéiques. Ces sous-produits de dégradation vont perdre leur conformation quaternaire et donner des dérivés de gélatine qui vont par la suite pouvoir être dégradés (Chong et al., 2011).

L'ECM du myocarde est constitué majoritairement de collagène fibrillaire des types 1 et 3 dans un ratio approximatif de 1,3 à 1,9 fibres de collagène 1 pour 1 fibre de collagène 3. Elles sont organisées de manière à garantir un alignement des myofibrilles grâce à l'interaction des

collagènes avec les intégrines des cardiomyocytes qui permettent l’ancrage du cytosquelette. Le remodelage cardiaque induit une modification de la composition de la matrice présente par une dégradation et une synthèse de nouvelles molécules différentes. L’interconnexion des fibres de collagènes est également modifiée, déterminant alors un maillage différent et la connexion avec les cardiomyocytes est également perdue (Chong et al., 2011). De nombreuses protéases rentrant en jeu dans l’homéostasie normale de l’ECM voient leur niveau d’expression modifié au cours de l’insuffisance cardiaque modifiant profondément la structure de l’ECM (figure 13).

NAME	NUMBER	SUBSTRATE/ FUNCTION	ABUNDANCE/ ACTIVITY IN HEART FAILURE
Collagenase			
Interstitial collagenases	MMP-1	Collagens I, II, III, VI; basement membrane components	Decreased
Collagenase 3	MMP-13	Collagens I, II, III	Increased
Neutrophil collagenase	MMP-8	Collagens I, II, III; basement membrane components	
Gelatinase			
Gelatinase A	MMP-2	Gelatins; collagens I, IV, V, VI; basement membrane components	Increased or unchanged
Gelatinase B	MMP-9	Gelatins; collagens IV, V, XIV; basement membrane components	Increased
Stromelysin			
Stromelysin 1	MMP-3	Fibronectin; laminin; collagens III, IV, IX; MMP activation	Increased
Membrane-type MMP			
MT1-MMP	MMP-14	Collagens I, II, III; fibronectin; laminin-1; activates pro-MMP-2 and pro-MMP-13	Increased

Modified from Deschamps AM, Spinale FG: Extracellular matrix. In Walsh RA (ed): Molecular Mechanisms of Cardiac Hypertrophy and Failure. Boca Raton, Fla, Taylor and Francis, 2005, pp 101-116.

Figure 13 : Protéases dont les niveaux ont été retrouvés modifiés au cours de l’insuffisance cardiaque (Chong et al., 2011).

La composition de l’ECM après un IDM a également été étudiée dans un modèle porcin d’ischémie-reperfusion ce qui a permis d’observer les variations de composition de l’ECM en termes de constituants ainsi qu’en termes de protéines associées comme les facteurs de croissance. De manière intéressante, certaines molécules ont vu leur expression baisser

(apolipoprotéine B-100, laminine $\alpha 2$, laminine $\beta 1$), mais la majorité des autres protéines ont vu leur expression fortement augmenter (apolipoprotéine A-IV, Asporine, Transforming growth factor- β -induced protein ig-h3 (BGH3), chondroadhérine, CILP1, Col1A1, Col3A1, Col5A2, Col12A1, Col14A1, Versican, dermatopontin, fibullin5, fibromoduline, Galectine1, Agreccan, Biglycan, prolargine, spondine-1, vitronectine) dont certaines n'avaient jamais été décrites dans le cœur. Il faut également noter que les taux de TGF- β latent ne sont pas modifiés par l'ischémie/reperfusion aux temps observés par les auteurs, bien que la majorité des protéines qui ont vu leur niveau modifié soit sous le contrôle de la voie TGF- β (Barallobre-Barreiro et al., 2016).

Processus de réparation du myocarde

Cette réorganisation du tissu après la phase ischémique est critique dans le processus de cicatrisation. Ainsi, à la différence d'autres organes, à la suite d'une agression le tissu musculaire myocardique se modifie et n'est pas régénéré. Cependant, plusieurs observations récentes ont amené à formuler l'hypothèse d'un potentiel de régénération du cœur (A P Beltrami et al., 2001; Bergmann et al., 2009). Cependant ce potentiel serait réprimé par un mécanisme jusqu'à présent inconnu. Dans les organes autres que le cœur, la régénération du tissu lésé est généralement assurée par des cellules conservant des caractéristiques de cellules souches et résidant dans l'organe. La découverte de cellules multipotentes dans le cœur il y a vingt ans a alors permis d'émettre l'hypothèse que ces cellules pourraient aider à régénérer le myocarde malade (Anversa & Kajstura, 1998; Hierlihy, Seale, Lobe, Rudnicki, & Megeney, 2002; Quaini et al., 2002; Urbanek et al., 2003).

Le cœur est composé de plusieurs types cellulaires aux fonctions différentes. Les premières études (Nag, 1980) font état de 30 à 35 % de myocytes dans les ventricules, les 65 à 70 % restants sont des cellules endothéliales, des fibroblastes (considérés comme majoritaires par les auteurs), des péricytes, des cellules musculaires lisses et des macrophages. Des études plus récentes estiment que la population de cellules endothéliales représente 60 % du total des cellules non myocytaires (Hsieh, Davis, Lisowski, & Lee, 2006) et est ainsi la fraction non myocytaire la plus importante. De manière très surprenante (et très contestée) les

fibroblastes (bien qu'il n'existe pas de définition consensuelle des fibroblastes) représenteraient moins de 20 % de la fraction non myocytaire et les cellules issues de la lignée hématopoïétique entre 5 et 10 % (Pinto et al., 2016). On constate qu'il est difficile de pouvoir statuer sur ce débat en l'absence de marqueurs fiables de ces populations. Depuis, de nombreuses études ont montré que plusieurs populations de cellules souches et progénitrices, caractérisées par différents marqueurs, sont aussi présentes au sein du myocarde (Antonio P Beltrami et al., 2003; Deb et al., 2003; Jackson et al., 2001; Quaini et al., 2002; Urbanek et al., 2003). Après isolement et remise en culture cellulaire, ces cellules ont la capacité de donner naissance à plusieurs types de cellules différenciées, attestant de leur multipotence. La capacité de trans-différenciation dans le tissu myocardique est cependant beaucoup plus débattue. Différentes études supportent l'existence d'une génération de nouveaux cardiomyocytes après IDM (Anversa & Kajstura, 1998; Urbanek et al., 2003) mais pas dans un cœur sain. A ce jour, deux hypothèses s'affrontent pour expliquer l'origine de ces nouveaux cardiomyocytes : soit ils sont issus d'une réentrée dans le cycle cellulaire de cardiomyocytes déjà présents (hypothèse de la remise en prolifération des cardiomyocytes), soit ils seraient issus de cellules souches adultes résidentes (hypothèse de la différenciation *in situ*).

Cependant, il est possible que ces deux hypothèses ne s'excluent pas mutuellement. Tout d'abord, différentes études ont démontré l'existence de ces deux phénomènes qui restent cependant très rares (Kikuchi & Poss, 2012). Ainsi, différentes observations chez les mammifères (y compris de notre équipe) montrent que les cellules souches adultes restent majoritairement indifférenciées dans le cœur ischémié. De même, la réentrée dans le cycle cellulaire des cardiomyocytes est possible mais reste extrêmement minoritaire par rapport aux nombreux cardiomyocytes en état post-mitotique (Laflamme & Murry, 2011). Enfin, l'hypothèse d'une action paracrine a été récemment émise : lorsque des cellules multipotentes ont été greffées dans un cœur malade, des améliorations des fonctions cardiaques ont été observées pendant plusieurs semaines (Gnecchi et al., 2006; Tang et al., 2010). Cependant les cellules greffées ne survivent que très peu de temps, qui est très inférieur à la durée visible de l'amélioration des fonctions cardiaques. En 2015, une étude sur des cellules mésenchymateuses utilisées dans des essais cliniques de thérapie cellulaire a

montré qu'elles sécrétaient un facteur (MYGDF) favorisant la néo angiogenèse et la survie des cardiomyocytes (Korf-Klingebiel et al., 2015).

Thérapeutiques actuelles de l'infarctus

L'IDM est une urgence cardiologique. La mise en place d'un traitement doit être réalisée au plus vite, dès le diagnostic établi devant les symptômes douloureux thoraciques trinitro-résistants et l'électrocardiogramme, sans attendre les résultats de dosages protéiques. Les objectifs du traitement sont triples : prévenir la mort subite du patient, limiter la taille de l'infarctus et enfin calmer la douleur. Le paramètre majeur dans le traitement de l'IDM est le temps de prise en charge et de mise en place d'un traitement adapté. Par exemple, le gain d'efficacité d'un traitement thrombolytique par rapport à une intervention chirurgicale se mesure en minutes.

Le traitement d'urgence commence par une hospitalisation en soins intensifs. L'objectif premier est de permettre une recanalisation rapide de l'artère occluse. Celle-ci est obtenue au mieux par une approche interventionnelle qui permet une réouverture mécanique de l'artère. L'autre option est d'utiliser des anti-thrombotiques de type fibrinolytiques (streptokinase, reteplase et tenecteplase) qui sont administrés en association à de l'héparine (anticoagulant) dans le but d'activer la protéolyse de la fibrine des caillots et d'empêcher la formation de nouveaux caillots. Enfin des antiagrégants plaquettaires (aspirine et thiéno-pyridines) sont également administrés pour bloquer l'hémostase primaire. Le choix entre une recanalisation mécanique ou pharmacologique est guidé par le temps prévisible avant la recanalisation de l'artère. Ainsi, l'angioplastie, si elle est réalisée dans les 90 minutes suivant la survenue d'un IDM, donne des résultats supérieurs aux traitements anti-thrombotiques.

Des traitements de plus longue durée sont ensuite utilisés, généralement sur des patients dont l'état a été stabilisé, afin de réduire les risques de récurrence et pour limiter la transition vers l'insuffisance cardiaque. Le traitement conseillé selon les recommandations 2017 de l'ESC comprennent de l'aspirine à faible dose, des antiagrégants plaquettaires et anti-thrombotiques en combinaison, des β -bloquants, des statines et des inhibiteurs de l'enzyme

de conversion de l'angiotensine. Les β -bloquants sont utilisés comme inhibiteurs du système adrénergique, afin de réduire le rythme cardiaque, l'excitabilité cardiaque et la contractilité myocardique, dans le but de limiter les risques d'arythmie et de mort subite. Les statines sont utilisées afin de baisser le taux de lipoprotéine basse densité convoyant le cholestérol (LDL-C). De nombreuses études ayant montré que la réduction de LDL-C est accompagnée d'une diminution proportionnelle des risques de décès liés aux atteintes cardiovasculaires et une réduction du nombre d'IDM. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (et inhibiteurs du récepteur à l'angiotensine 2) sont utilisés afin de réguler la pression artérielle via le système rénine-Angiotensine-Aldostérone, en baissant le tonus musculaire.

Le traitement obligatoire et le plus important pour les patients est le changement des habitudes de vie. Il consiste en un arrêt du tabagisme, une modification des habitudes alimentaires et un traitement des facteurs de risques (diabète, hypercholestérolémie, hypertriglycérinémie ...), associé à un réentraînement à l'effort.

Actuellement les traitements pour limiter les effets des cardiopathies ischémiques sont donc axés sur la prévention, puis, lors de la survenue de la maladie, ce sont les symptômes directs qui sont traités. Les traitements actuels permettent une diminution très nette de la mortalité mais le nombre de patients ayant une transition vers l'insuffisance cardiaque croît du fait de la progression de la maladie et du non remplacement du tissu lésé. Ainsi deux axes majeurs de recherche ont émergé. Le premier axe vise à régénérer le tissu lésé. Divers moyens sont aujourd'hui à l'étude, soit en greffant des cellules, soit en essayant de provoquer la régénération autonome du cœur (Garbern & Lee, 2013; Lin & Pu, 2014; Silvestre & Menasché, 2015). Le second axe vise à limiter la progression de la fibrose interstitielle, sans toucher à la fibrose de remplacement qui évite la rupture cardiaque. Les acteurs responsables de cette fibrose sont méconnus, leurs modalités d'activation et de fonctionnement sont inconnus et il n'existe pas de traitement anti-fibrotique efficace à l'heure actuelle (Gourdie et al., 2016; Travers et al., 2016). C'est vers ce deuxième axe que notre équipe s'est tournée en découvrant dans le cœur une population à caractère fibroblastique.

Les cellules souches adultes

Les cellules souches dans l'organisme

La notion de cellule souche est apparue il y a près de 60 ans avec l'établissement des deux critères essentiels de la cellule souche que sont l'auto-renouveaulement et la plasticité cellulaire (McCulloch & Till, 1960).

Les cellules souches sont donc des cellules qui ont la capacité de proliférer indéfiniment dans un état indifférencié, garantissant un réservoir de cellules suffisant pour maintenir l'intégrité du tissu. On distingue deux types de multiplication des cellules souches (figure 14) : par une division symétrique ou par une division asymétrique. La division symétrique est elle-même divisée en deux catégories. Ainsi on parle d'homoplasie lorsque les deux cellules filles sont identiques à la cellule mère et d'hétéroplasie lorsque les deux cellules filles sont plus avancées que la cellule mère dans la voie de différenciation. La division asymétrique, quant à elle, permet d'obtenir une cellule fille identique à la cellule mère (elle gardera son statut de cellule souche) ainsi qu'une cellule fille partant vers une voie de différenciation.

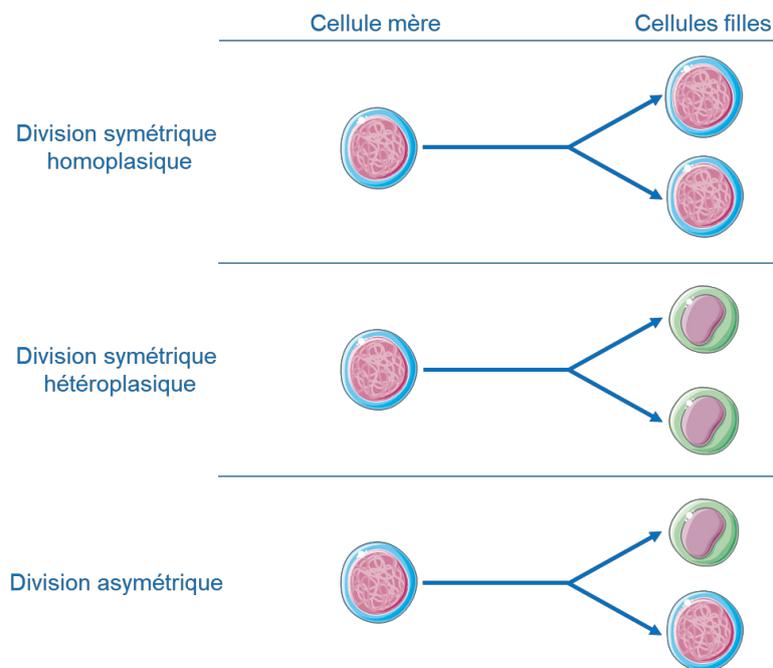


Figure 14 : Représentation schématique des différentes possibilités de division des cellules souches (adapté de Servier Medical ART).

Par ailleurs, il existe plusieurs types de cellules souches classifiées selon leurs capacités à donner une palette plus ou moins large de cellules différenciées : pluripotentes, multipotentes et unipotentes. Ainsi les cellules pluripotentes peuvent donner indifféremment l'un des trois feuillets embryonnaires ainsi que le trophoctoderme (couche cellulaire externe de l'embryon), alors que les cellules multipotentes sont déjà engagées dans un lignage cellulaire déterminé (hématopoïétiques, mésenchymateuses ...) et ne pourront donner qu'un nombre limité de types cellulaires. Enfin les cellules unipotentes sont les cellules souches les plus engagées dans la différenciation et qui donnent naissance à un type cellulaire plus spécialisé (figure 15).

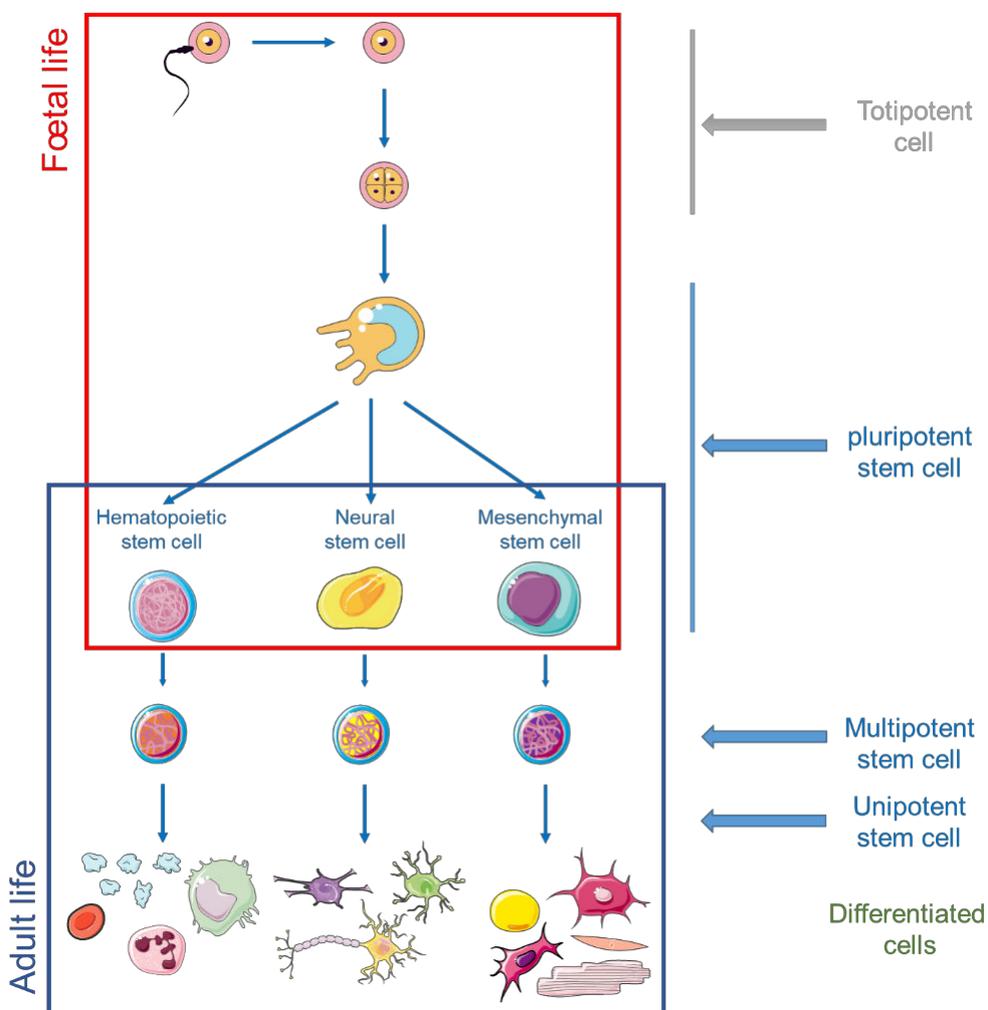


Figure 15 : Schéma représentant la hiérarchie des cellules et de leurs potentiels souche au cours de la vie (adapté de Servier Medical ART).

Les cellules totipotentes ne sont pas considérées comme des « vraies » cellules souches, car elles ne possèdent pas la capacité de s'autorenouveler, bien qu'elles soient à l'origine de tout être multicellulaire. On trouve également le qualificatif « progéniteurs » pour une partie des cellules souches les plus différenciées. Ce qualificatif convient pour des cellules ayant une capacité limitée et transitoire d'autorenouveaulement et le plus souvent unipotente. Ce terme est très débattu, certains progéniteurs auraient encore des capacités multipotentes (Seaberg & Van Der Kooy, 2003).

Il existe chez les vertébrés deux grands types de cellules souches : les cellules souches embryonnaires et les cellules souches adultes. Les cellules souches embryonnaires sont pluripotentes et disparaissent après le développement de l'embryon à la faveur de cellules ayant des capacités de différenciations plus restreintes, encore présentes dans les différents organes à l'âge adulte. Chaque organe conserve un réservoir de cellules souches multipotentes et unipotentes et régulées par leur microenvironnement tissulaire, elles sont appelées cellules souches adultes résidentes.

Les cellules souches hématopoïétiques

La moelle osseuse est l'organe qui abrite le plus de nombreuses cellules souches. C'est le premier organe à avoir été décrit abritant des cellules souches adultes, les cellules souches hématopoïétiques (Jacobson, Simmons, Marks, & Eldredge, 1951) dès le début des années 50. Ces premiers travaux ont permis de montrer que des cellules avaient la capacité de rétablir la production de cellules sanguines circulantes par injection de cellules de la moelle osseuse. De nombreux travaux sont parus par la suite expliquant l'isolement et la caractérisation des cellules responsables de la production des cellules du sang. Une population capable de s'autorenouveler et de se différencier venait d'être découverte. Les cellules souches hématopoïétiques peuvent donner naissance à deux lignées cellulaires, la lignée lymphoïde qui donnera naissance aux lymphocytes B, T et « *natural killer* » et la lignée myéloïde donnera naissance aux érythrocytes (globules rouges), plaquettes, granulocytes et monocytes. Les cellules souches hématopoïétiques n'ont cependant pas encore livré tous leurs secrets. Encore étudiées de nos jours, il a récemment été démontré que ces cellules ont la capacité de donner naissance à un grand nombre de cellules différenciées selon le type de stimulation appliqué

sur ces cellules : des adipocytes (Sera et al., 2009), des cardiomyocytes (Pozzobon et al., 2010), des hépatocytes (Mozaffarian et al., 2016), des cellules endothéliales, des ostéochondrocytes ou des fibroblastes et myofibroblastes. La moelle osseuse abrite également des cellules souches mésenchymateuses qui ont été découvertes plus tardivement (A. J. Friedenstein et al., 1974) mais ayant également des capacités répliquatives et de différenciation, en particulier en fibroblastes (Ebihara et al., 2006).

Les cellules souches adultes

Chez l'adulte, il existe plusieurs lignées de cellules souches résidentes dont la lignée mésenchymateuse. Cette lignée multipotente peut être isolée à partir de nombreux organes (Moelle osseuse, pulpe dentaire, ...) et a la capacité de se différencier dans des types cellulaires variés notamment en adipocytes, en chondrocytes mais également en myocytes (Beksaç, 2014).

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) ont été décrites tout d'abord comme ayant la capacité de former des colonies de fibroblastes (CFU-F) (Castro-Malaspina, Ebell, & Wang, 1984) et de se différencier en cellules ostéogéniques (A. J. Friedenstein, Chailakhjan, & Lalykina, 1970). Par la suite Caplan *et al.* (Caplan, 1991) ont montré que ces mêmes cellules pouvaient être obtenues à partir de différents tissus et que ces dernières ont la capacité de se différencier en ostéoblastes et en chondrocytes. Cet auteur a proposé l'appellation de cellules souches mésenchymateuses. Par la suite, il a été prouvé que ces cellules pouvaient également se différencier en cellules faisant partie du système musculaire, bien que cette dernière propriété n'ait été observée qu'*in vitro*. Finalement, il a été montré que ces cellules pouvaient se différencier en ostéoblastes (A. Y. Friedenstein & Lalykina, 1970), chondrocytes (Caplan, 1991), adipocytes (Spinella-Jaegle et al., 2001), fibroblastes (A. J. Friedenstein et al., 1974), cellules musculaires lisses (Alimperti, You, George, Agarwal, & Andreadis, 2014) et myocytes (Makino et al., 1999) (figure 16). Enfin plus récemment, la société internationale de thérapie cellulaire a proposé l'appellation de cellules multipotentes mésenchymateuses stromales, tout en proposant également des critères minimaux expérimentaux à respecter que sont la capacité d'adhérer aux surfaces plastiques, une expression (> 95 %) des marqueurs CD73, CD90 et CD105 accompagné d'une absence (< 2 %) des marqueurs CD34, CD45, CD11b,

intégrine α M ou CD14, CD79 ou CD19 et HLA-II (Dominici et al., 2006). Depuis des cellules souches mésenchymateuses ont été isolées de différents organes mais expriment de manière variable des marqueurs de surface (Maleki, Ghanbarvand, Behvarz, Ejtemaei, & Ghadirkhomi, 2014; Wysoczynski et al., 2017).

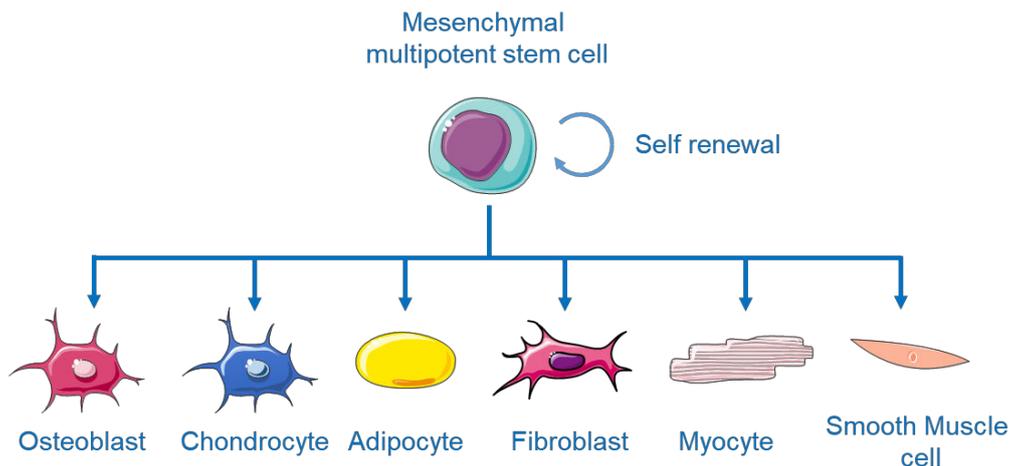


Figure 16 : Schéma représentant les différentes populations différenciées que peuvent former les cellules souches mésenchymateuses (adapté de Servier Medical ART).

Les cellules étudiées sont caractérisées par l'expression de protéines membranaires qui servent de « carte d'identité ». Ces protéines sont alors ciblées ce qui permet de sélectionner, trier et purifier les cellules d'intérêt. La plupart de ces molécules sont également porteuses d'une fonction et peuvent ainsi être ciblées afin de moduler la réponse cellulaire.

Les différents types cellulaires que l'on peut obtenir *in vitro* ne sont pas forcément des capacités naturellement retrouvées *in vivo*. Dans le cas des cellules souches mésenchymateuses, leur capacité à donner un grand nombre de types cellulaires différents semble dépendre de leur environnement. Ainsi, pour des cellules souches mésenchymateuses obtenue de chaque organe (et en supposant qu'il n'existe qu'un seul type de MSC par organe), leur environnement immédiat semble les avoir engagées dans un ou plusieurs types cellulaires différenciés préférentiels réduisant ainsi les possibilités de différenciation observable *in vitro*.

Les cellules souches cardiaques

Le cœur a longtemps été considéré comme un organe post-mitotique, incapable de se régénérer et il a donc été établi que le cœur ne devait pas posséder pas de cellules souches résidentes. Malgré diverses études récentes montrant l'existence de niches de cellules cardiaques ayant la capacité de former des cardiomyocytes, des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses, la notion d'existence de cellules souches cardiaques adultes reste très débattue. Il est donc difficile de changer la vision des choses. Depuis, plusieurs types cellulaires ont été observés aussi bien dans le cœur embryonnaire, foetal, nouveau-né et adulte, mais aucun marqueur commun n'a pour le moment été trouvé. Parmi les populations décrites (figure 17), les marqueurs C-kit, Isl1 et Sca1 ont permis d'identifier différentes populations dont certaines cellules expriment plusieurs de ces marqueurs à la fois.

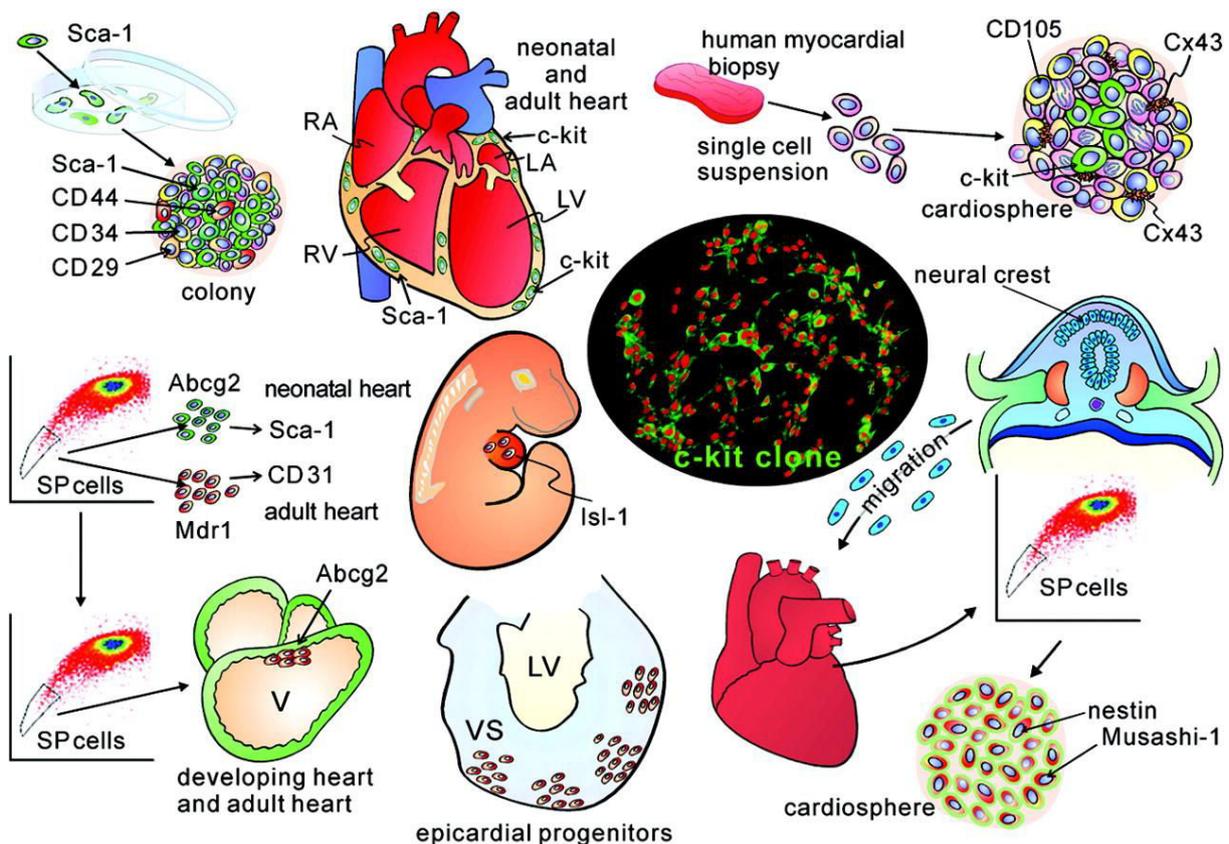


Figure 17 : Schéma résumant les différentes populations de cellules progénitrices cardiaques et leurs origines (Anversa, Kajstura, & Leri, 2012)

De plus, les différents types cellulaires décrits ont des capacités diverses en termes de re-différenciation cellulaire. Par exemple, les cellules exprimant ISL1 permettent de former des cellules endothéliales, des cellules épicrodiques, des cellules musculaires lisses, le système de conduction ainsi que les lignées myogéniques donnant naissance aux oreillettes et au ventricule droit au cours du développement du cœur embryonnaire. Cependant, dans le cœur adulte, peu sont retrouvées et cantonnées au ventricule droit. D'autres populations ont également été retrouvées soit par l'expression d'un marqueur (C-kit, Sca1) soit en transposant les connaissances accumulées de l'étude des cellules souches de la moelle osseuse dans le cœur. Ceci a permis notamment la découverte d'une population n'exprimant aucun des trois marqueurs précédemment cités : la « *side population* » grâce à sa capacité à expulser du noyau des composés chimiques utilisés pour colorer l'ADN (Hierlihy et al., 2002). La mise en culture de biopsies de cœur a également permis d'obtenir des cellules capables de donner des structures composées de nombreuses cellules aux profils divers, les cardiosphères. Bien que ces populations soient différentes, elles partagent des capacités uniques de différenciation en cellules composant le cœur suggérant une origine commune. La présence du marqueur C-kit également présent dans les cellules souches de la moelle osseuse a également poussé à chercher si l'origine de ces cellules n'était pas exogène et ainsi proviendraient de la moelle osseuse. La moelle osseuse contient plusieurs types de cellules souches (hématopoïétiques, mésenchymateuses ...) dont la plupart ont été utilisées afin de tenter de régénérer le myocarde dans divers modèles pathologiques, la plupart ayant eu des conséquences positives, soulevant néanmoins de nombreuses questions quant au mécanisme sur lequel repose ces observations et sur la population responsable de ces améliorations.

L'étude de populations cardiaques présentant des caractéristiques de MSC en utilisant les mêmes méthodes que celles utilisées dans l'étude des cellules souches de la moelle osseuse (A. J. Friedenstein et al., 1974) a permis de retrouver des cellules ayant des caractéristiques de cellules souches dans le cœur (Chong et al., 2011). Ces colonies exprimaient les marqueurs typiques des MSC : CD44, CD90, CD29 et CD105 tout en étant négatives pour les marqueurs CD31 (endothéliales) et CD45 (lignée hématopoïétique). L'analyse de ces colonies a permis de démontrer une expression de SCA1 et de PDGFR α et que cette population est d'origine cardiaque. L'étude du marqueur C-kit a montré une absence de lien entre C-kit et PDGFR α et,

qu'en réponse à un IDM, des cellules C-kit⁺ apparaissent dans le cœur mais que celles-ci expriment également CD45, attestant d'une origine de la moelle osseuse (figure 18).

Table 1. Summary of endogenous adult cardiac stem and progenitor cells

Cell population	Additional markers	Embryonic origin	Adult localization	Differentiation potential		Clinical trials	Additional comments
				<i>In vivo</i> lineage potential*	<i>In vitro</i> lineage potential		
KIT ⁺	SCA1, MDR1	Unknown, probably heterogeneous	Epicardium, endocardium, cardiac interstitium	Endothelial cells, smooth muscle cells, cardiomyocytes (rare), fibroblasts (rare)	Culture expanded cells: cardiomyocytes, fibroblasts, endothelial cells, smooth muscle cells	SCIPIO (USA, 2009) (Belli et al., 2011); CONCERT-HF, (study NCT02501811) (USA, 2015)	Controversy over the ability of endogenous adult cardiac KIT ⁺ cells to give rise to cardiomyocytes in meaningful numbers; lineage tracing suggests that KIT ⁺ cells have an endothelial phenotype
cCFU-F	SCA1, PDGFR α	Proepicardial mesoderm	Epicardium, endocardium, cardiac interstitium, coronary vascular adventitia	Unknown, probably give rise to stromal, perivascular and adipogenic cells in homeostasis and myofibroblasts after injury; endogenous cells unlikely to give rise to cardiomyocytes	Culture expanded cells: cardiomyocytes, endothelial cells, smooth muscle cells, adipocytes, chondrocytes, osteocytes	None	Exist within the broader PDGFR α ⁺ cardiac stromal cell fraction
ISL1 ⁺	NKX2-5	Unknown (pharyngeal mesoderm proposed)	Rare: sinoatrial node, cardiac ganglia, few cells in the outflow tract	Rare ISL1 ⁺ cells in the adult do not appear to give rise to meaningful numbers of cellular progeny	ESC-derived cells: cardiomyocytes, endothelial cells, smooth muscle cells	Embryonic Stem Cell-derived Progenitors in Severe Heart Failure (ESCORT; study NCT02057900) (France, 2013)	This clinical study using human ESC-derived CD15 ⁺ ISL1 ⁺ cells is ongoing
Epicardial cells	TCF21, TBX18, WT1	Proepicardial mesoderm	Epicardium	Fibroblasts, smooth muscle cells	Explant cultures: endothelial cells, smooth muscle cells	None	TCF21, TBX18 and WT1 are epicardial developmental markers that are reactivated upon injury; the adult epicardium also provides pro-angiogenic and other paracrine signals after injury
SCA1 ⁺	PDGFR α , KIT	Unknown, probably heterogeneous	Epicardium, endocardium, cardiac interstitium coronary vascular adventitia	Smooth muscle cells, endothelial cells, cardiomyocytes (rare)	Explant cells: cardiomyocytes, endothelial cells, smooth muscle cells	None	SCA1 marks a heterogeneous population of cells in the adult, including subpopulations of endothelial, stromal and coronary vascular adventitial cells
Cardiospheres	KIT, SCA1, CD34, markers of MSCs and three main cardiac lineages	Unknown but probably cardiac origin, probably heterogeneous	Unknown, cardiospheres perse do not exist in the adult	n/a	Culture expanded cells: cardiomyocytes, endothelial cells, smooth muscle cells	CADUCEUS (USA, 2009) (Makkar et al., 2012)	Cardiospheres are culture aggregates derived from cardiac tissue outgrowths
Side population	SCA1, GATA4, NKX2-5, MDR1	Unknown, probably heterogeneous	Unknown	n/a	Explant cells: cardiomyocytes, endothelial cells, smooth muscle cells	None	These cells can only be identified after removal from the heart so <i>in vivo</i> identification is not possible

endo, endocardium; epi, epicardium; ESC, embryonic stem cell; interstitium, cardiac interstitium; n/a, not applicable.

*Excludes adoptive transfer studies.

Figure 18 : Résumé des différentes populations de cellules souches cardiaques résidentes retrouvées (Santini, Forte, Harvey, & Kovacic, 2016)

De ces constatations, est née l'hypothèse de trouver parmi les cellules souches adultes mésenchymateuses (cardiaques ou stromales) une population qui aurait la capacité de se différencier en cardiomyocytes. Ainsi il a été montré que des cellules souches exprimant des marqueurs particuliers ont la capacité de former des cardiomyocytes : C-kit (Bearzi et al.,

2007; Antonio P Beltrami et al., 2003), ISL1 (Laugwitz et al., 2005) et SCA1 (Matsuura et al., 2004; Oh et al., 2003) (tableau 1). Il faut noter que Sca1 est spécifique à la souris et n'a pas d'homologue connu chez l'humain. Par ailleurs, Isl1 est un facteur de transcription et ne peut donc être directement ciblé pour obtenir les cellules l'exprimant. Au niveau embryonnaire, d'autres marqueurs ont été découverts dont MESP1 (Bondue et al., 2011) qui est le marqueur myogénique le plus en amont. D'autres facteurs de transcription spécifiques de la lignée cardiomyocytaire ont également été trouvés à la fois chez l'embryon comme chez l'adulte : GATA4, NKX2.5, et sont directement sous le contrôle de MESP1. Certains auteurs ont conceptualisé une hiérarchie de ces marqueurs dans une temporalité particulière et ces marqueurs décrivent des stades particuliers de différenciation de la même lignée de cellules souches cardiaques (Iancu et al., 2015).

Tableau 1 : D'après Iancu et al. (Iancu et al., 2015).

c-kit^{pos} cardiac stem cells	<ul style="list-style-type: none"> ▪ positive for: c-kit, MDR1, Sca-1 (±), Gata4, TBX5, NKX2-5; ▪ negative for: CD45, CD34, CD31, KDR.
Sca-1^{pos}	<ul style="list-style-type: none"> ▪ positive for: c-kit (±), MDR1, CD31 (PECAM1), Pdfra, Tcf21, Gata4, Gata6, Tbx5, Tbx20, Hand2; ▪ negative for: CD45, CD34, Kdr, Isl1, Nkx2-5, Hand1.
Isl1^{pos} cardiac progenitors	<ul style="list-style-type: none"> ▪ positive for: Isl1, c-kit (±), Nkx2.5, Flk1, TBX1; ▪ negative for: CD45, CD31, Sca-1.
Side- population cells	<ul style="list-style-type: none"> ▪ positive for: Nkx2.5, αSA, MDR1, Abcg2, Vegf, Vcam1, Icam1, Vwf, CD29, CD44, capsulin (Tcf21), Meox2, Mef2A, Mef2C; ▪ negative for: c-kit, CD31, Sca-1, CD45, Oct3/4, SSEA-3, SSEA-4, Esg1, Rex3, SOX2, Utf1, Nkx2.5, Gata4 (±), Hand 1 and 2, myocardin.

De nombreuses études ont été menées sur l'ensemble de ces marqueurs, et particulièrement sur le marqueur C-kit. En effet cette protéine (également appelé : *V-Kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog, proto-oncogene c-Kit*, CD117 ou encore *stem cell factor receptor*) est membranaire (et donc facilement accessible), présente chez l'humain ainsi que dans les modèles de laboratoire, et est connue pour être exprimée par de nombreuses cellules souches (Keith & Bolli, 2015).

Dans le cœur, C-kit est exprimé aussi bien par des cellules considérées comme endogènes (CD45⁻, CD31⁻, CD34⁻ & Lin⁻ [CD3, LY-6C/G, CD11b, CD45, Ter119]) que par des cellules issues de l'hématopoïèse (CD45⁺) (Bearzi et al., 2007; Dey et al., 2013). Cette hétérogénéité a cependant posé problème aux différents auteurs quant à l'origine exacte de ces cellules : endogène ou hématopoïétique avec une perte des marqueurs de ce lignage. Enfin ces mêmes cellules C-kit⁺/Lin⁻ ont été injectées dans des cœurs infarctés de modèles porcins ou lors d'une étude clinique en phase 1 (R. Bolli et al., 2013; Roberto Bolli et al., 2011). Les résultats ont été très positifs quant à l'amélioration des paramètres hémodynamiques des modèles et patients. Cependant, les résultats ont montré une incohérence entre l'absence de greffon mais une amélioration significative des paramètres cardiaques, même longtemps après disparition des cellules injectées (Roberto Bolli et al., 2011; Deutsch, Sturzu, & Wu, 2013). Ces dernières observations ont amené à établir une hypothèse sur un mécanisme paracrine de réduction des effets de l'infarctus à partir des cellules C-kit⁺ dont les cibles cellulaires sont pour le moment inconnues et dont les molécules impliquées le sont également.

Ainsi, notre équipe forte d'un passé d'études biochimiques et pharmacologiques s'est penchée sur ce mécanisme paracrine ainsi que sur le cas d'un facteur de transcription exprimé par des cellules souches adultes dans de nombreux tissus, mais jusqu'à présent jamais décrit dans le cœur : PW1/PEG3.

Pw1/Peg3: Protein Widely 1 / paternally expressed gene 3

Généralités

La protéine PW1 et le gène Peg3 codant pour celle-ci ont été découverts en 1995 (Kaneko-Ishino et al., 1995) lors de l'étude de gènes ayant une empreinte parentale et de manière indépendante (Frédéric Relaix et al., 1996). L'empreinte parentale est l'expression différentielle des allèles issus des parents et, dans le cas de PW1 cela se traduit par l'expression de l'allèle paternel accompagnée de la répression de l'allèle maternel ; ce qui a donné le nom du gène Peg3 : « *Paternally expressed gene* ». Le gène Peg3 est présent sur le chromosome 7 chez la souris (Kuroiwa et al., 1996) et le chromosome 19 chez l'humain (J. Kim, Ashworth, Branscomb, & Stubbs, 1997). Pw1 fait partie du réseau de gènes à empreinte

parentale (IGN : *Imprinted gene network*), qui regroupe les gènes à empreinte parentale qui sont impliqués dans le contrôle de la croissance embryonnaire. Ces gènes sont réprimés à la naissance mais leur expression persiste à l'âge adulte (Berg et al., 2011) sous-tendant une importance cruciale dans la régulation des cellules souches somatiques. Originellement décrit dans l'embryon, PW1 est retrouvé exprimé dans de nombreux organes en développement issus du feuillet embryonnaire mésodermique (système nerveux central, cœur, muscles, os et placenta). Son expression diminue ensuite dans ces différents tissus au cours du développement mais est également retrouvée chez l'adulte (système nerveux central, muscles) (Kaneko-Ishino et al., 1995; Frédéric Relaix et al., 1996). Les premières études visant à comprendre les mécanismes de la régénération musculaire ont permis d'identifier deux populations de cellules d'origines différentes : les cellules satellites exprimant PW1 et les marqueurs myogéniques Pax7 et Pax3 (SAT) ainsi que les cellules interstitielles exprimant PW1 mais pas les marqueurs myogéniques (PICs). Spontanément, les PICs sont capables de donner *in vitro* des cellules musculaires lisses mais également des cellules musculaires striées en acquérant les marqueurs myogéniques (K. J. Mitchell et al., 2010).

Dans le but d'étudier les rôles de PW1 dans les PICs et SATs au cours de la régénération musculaire, l'équipe de David SASSOON a généré une lignée rapporteuse de l'expression de PW1 (Besson et al., 2011). Le gène codant pour PW1 a été copié et l'exon 9 a été modifié par l'insertion d'une cassette IRES (*Internal Ribosome Entry Site* – zone permettant le démarrage de la traduction chez les eucaryotes) suivie par la séquence nLacZ issue de l'opéron lactose, codant pour une enzyme, la β -Galactosidase (β -Gal) modifiée pour être localisée dans le noyau des cellules l'exprimant (Figure 19).



Figure 19 : Représentation schématique de la copie du gène *Pw1* inséré dans le génome de souris afin d'obtenir la lignée transgénique *PW1^{nLacZ}*.

Ce modèle a permis de montrer que les SATs et les PICs expriment bien PW1 et peuvent être retrouvées à l'aide du rapporteur β -Gal mais également que ce dernier est exprimé par des cellules souches adultes dans de nombreux organes (tableau 2).

Tableau 2 : Liste des organes dans lesquels a été retrouvé PW1.

Organe	référence
Système nerveux central	(Besson et al., 2011; Johnson, Wu, Aithmitti, & Morrison, 2002; Yamaguchi et al., 2002)
Coeur	(Yaniz-Galende et al., 2017)
Poumon	(Dierick et al., 2016)
Pancreas	(Sojoodi et al., 2016)
Cellules satellites musculaires	(Pannerec, Formicola, Besson, Marazzi, & Sassoon, 2013)
Mésoangioblastes (précurseurs myogéniques)	(Bonfanti et al., 2015)
Intestins	(Besson et al., 2011)
testicules,	(Besson et al., 2011)
peau, bulbe pileux	(Besson et al., 2011, 2017)
Os (progéniteurs d'ostéoblastes et de chondrocytes)	(Besson et al., 2011)
Placenta	(Denizot et al., 2016)

Dans l'ensemble des tissus observés par les auteurs de l'étude, la présence de PW1 est associée de manière très forte avec l'expression de marqueurs connus de cellules souches résidentes, suggérant que PW1 est un marqueur universel de cellules souches et / ou progénitrices. Pour confirmer cette hypothèse, les auteurs ont récolté des cellules de peau de souris β -Gal positives par FACS. Ces cellules sont clonogéniques et, une fois greffées sur des souris «nude », les cellules exprimant PW1 permettent de peupler efficacement en follicules pileux et ce de manière robuste. L'expression du rapporteur est toujours visible mais reste cantonnée aux cellules indifférenciées. (figure 20).

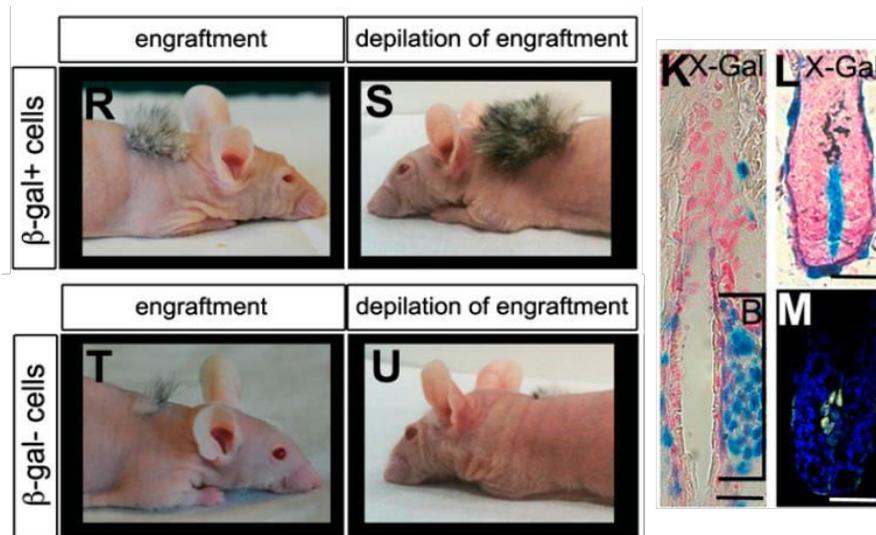


Figure 20 : Des cellules PW1 de peau, greffées sur des souris « nude » permet un développement de follicules pileux importants et robustes (à gauche). L'expression de la β -Gal rapporteuse est encore visible après greffe et reste limitée aux cellules indifférenciées (à droite) (d'après V. Besson, PNAS, 2011 (Besson et al., 2011)).

Environnement génomique particulier

La région génomique dans laquelle se trouve le gène Peg3 contient également 6 autres gènes à empreinte parentale. Peg3, Usp29, APeg3 (Antisens Peg3) et ZFP264 sont à empreinte paternelle tandis que ZIM1, ZIM2 et ZIM3 sont à empreinte maternelle (Choo, Kim, & Kim, 2008; Joomyeong Kim, Noskov, et al., 2000; Joomyeong Kim, Bergmann, Lucas, Stone, & Stubbs, 2004; Joomyeong Kim, Lu, & Stubbs, 1999; Joomyeong Kim, Bergmann, Wehri, Lu, & Stubbs, 2001). Tous ces gènes (sauf Zim1) sont très conservés dans l'ensemble des mammifères bien que les zones génomiques bordant le groupe de gènes à empreinte parentale n'ait pas été conservées au cours de l'évolution des mammifères (Joomyeong Kim, Gordon, et al., 2001). Parmi ces sept gènes à empreinte parentale, Peg3 est le plus conservé au cours de l'évolution. Cela suggère que Peg3 serait un gène critique pour la survie des mammifères. L'empreinte parentale de Peg3 semble liée à la méthylation différentielle d'éléments régulateurs (Thiaville, Kim, Frey, & Kim, 2013) qui aurait lieu lors de la gamétogenèse et dans le cas précis de peg3 par la méthylation des éléments régulateurs au cours de l'oogenèse (Lucifero, Mann, Bartolomei, & Trasler, 2004).

Structure

L'étude de l'ARNm codant pour PW1 a permis de déterminer une protéine théorique de 1572 acides aminés contenant 12 motifs à doigt de zinc C2H2. La structure primaire et les différents domaines observés sont néanmoins très caractéristiques et diffèrent grandement des protéines à doigt de zinc décrites jusqu'alors. De plus, les séquences humaines et murines sont très similaires (mais avec une homologie d'environ 58 %), ce qui pourrait indiquer un rôle très important au vue de sa conservation au cours de l'évolution (Kuroiwa et al., 1996; Frédéric Relaix et al., 1996). Les auteurs suggèrent que l'organisation des motifs C2H2 en trois domaines permet raisonnablement d'émettre l'hypothèse que PW1 aurait trois sites différents de liaison à l'ADN (Frédéric Relaix et al., 1996). Depuis, une séquence consensus a été déterminée (Thiaville, Huang, et al., 2013) et 21 cibles génomiques ont été décrites (Lee, Ye, & Kim, 2015). La protéine PW1 possède également d'autres domaines particuliers : un site riche en arginine et deux sites riches en prolines (Kuroiwa et al., 1996). L'éloignement des trois domaines C2H2 et la présence des domaines annexes permettraient les liaisons protéine-protéine. En effet, le site riche en proline est supposé pouvoir former une structure en hélice alpha qui expliquerait la visualisation de dimères de PW1. Les deux sites riches en proline forment des motifs précédemment retrouvés dans la séquence de deux facteurs de transcription impliqués dans l'inhibition de gènes spécifiques de la différenciation neuronale standard ; les auteurs supposent un rôle similaire de PW1 dans les cellules souches embryonnaires (Frédéric Relaix et al., 1996). Cette même étude décrit le transcrit de PW1 dépourvu d'intron mais par la suite la composition a été revue et finalement l'ARNm de PW1 est composé de 9 exons chez la souris (Besson et al., 2011; Joomyeong Kim, Bergmann, & Stubbs, 2000). De manière intéressante, Pw1 partage chez l'humain un promoteur et 5 exons en 5' avec le gène ZIM2. Ces deux séquences sont obtenues par épissage alternatif. La plupart des autres mammifères – dont la souris – ne possèdent pas un homologue de ZIM2 ayant les mêmes propriétés (Joomyeong Kim, Bergmann, et al., 2000).

Implications de PW1 dans le métabolisme, la croissance et le comportement

Du fait de l'implication de nombreux gènes à empreinte parentale dans la croissance et le comportement, une équipe s'est penchée sur la possibilité qu'il en soit de même pour PW1. Pour ce faire, l'équipe a inséré une cassette de sélection β -galactosidase (β -Gal) dans la séquence des exons en 5' du gène Peg3. Les embryons hétérozygotes portant l'allèle paternel muté présentent une croissance retardée sans anomalie histologique. Il est observé les mêmes caractéristiques pour les souriceaux, de taille proportionnellement plus petite que les souris ayant l'allèle paternel sauvage tout en étant en bonne santé et ayant un comportement identique. Les organes sont également plus petits mais structurellement identiques aux « sauvages ». Toutefois, le croisement de deux animaux mutés engendre une progéniture dont peu d'individus survivent jusqu'au sevrage (8 %) en comparaison avec les animaux portant l'allèle naturel (83 %) (L. Li et al., 1999).

La différence de survie jusqu'au sevrage s'expliquerait par une différence des soins maternels, une limitation des capacités d'allaitement et un défaut de la part des nouveau-nés de savoir s'alimenter correctement ainsi qu'un défaut dans la thermorégulation (Champagne, Curley, Swaney, Hasen, & Keverne, 2009; L. Li et al., 1999; Swaney, Curley, Champagne, & Keverne, 2008). Il faut également noter des capacités de reproduction plus limitées de la part des mâles qui seraient dues à une reconnaissance olfactive dégradée (Swaney et al., 2008). Cependant, l'implication de PW1 dans le contrôle du comportement est controversée (Denizot et al., 2016) mais les modifications génétiques utilisées par les différents auteurs sont différentes. En conséquence l'observation d'un contrôle comportemental dû à la séquence 5' du gène ne sont pas totalement à exclure par un effet direct ou indirect encore indéterminé. Ces observations suggèrent néanmoins que PW1 gouverne des fonctions éminemment importantes, dont l'ensemble des mécanismes moléculaires n'a pas encore été élucidé, et que l'évolution a sélectionné des processus qui favorisent la transmission des allèles donnant un avantage certain dans la survie.

Implications de PW1 au niveau cellulaire.

Les observations au niveau de la croissance et du comportement peuvent être mises en relation avec les implications de PW1 dans différentes voies de signalisation.

Voie de P53

P53 est une protéine impliquée dans la régulation d'un grand nombre de voies de signalisation, en particulier dans la réponse au stress oxydatif. Continuellement synthétisée, P53 est régulée négativement de manière post-traductionnelle par Mdm2, induisant une dégradation de P53 par le protéasome (Ogawara et al., 2002). L'induction d'un stress permet une relocalisation intracellulaire de P53. L'activité physique permet dans les cellules musculaires une relocalisation dans la mitochondrie ainsi que dans le noyau. Dans le noyau P53 va réguler le métabolisme énergétique, la production d'antioxydants, la sénescence cellulaire et les voies de l'apoptose. Une hypoxie forte et prolongée va également permettre la relocalisation au noyau de P53, réprimant ainsi la différenciation myogénique et activant l'arrêt du cycle cellulaire et activant les voies apoptotiques (Figure 21).

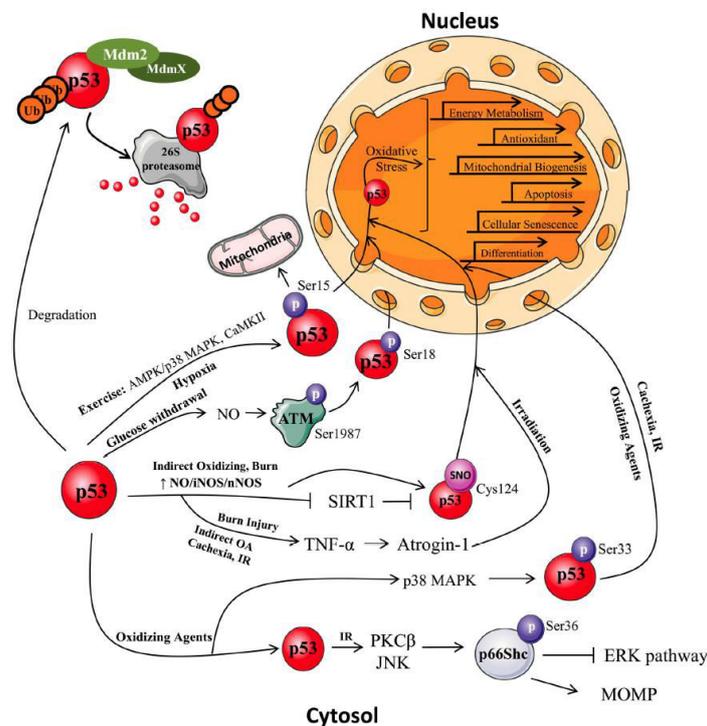


Figure 21 : Schéma récapitulatif des différentes voies d'action de P53, en particulier en haut la voie de dégradation lorsque P53 est inactif, suivi, dans le sens des aiguilles d'une montre, des voies activées par différents stress (Beyfuss & Hood, 2018).

Dans le noyau, P53 va cibler le gène Pw1 et activer la transcription de celui-ci. Cependant il a été observé dans des fibroblastes murins que l'activation du gène codant pour PW1 par P53 nécessite l'activation de la voie de C-myc ou d'E2F-1 ; l'activation unitaire de l'un des trois effecteurs ne permet pas l'activation de Pw1. Pourtant, la voie C-myc induit l'activation de BAX (K. O. Mitchell et al., 2000) qui nécessite la présence de PW1 pour être transloqué dans le noyau pour l'activation de l'apoptose (Johnson et al., 2002). Il a par ailleurs été montré que PW1 peut interagir avec Siah1a (également contrôlé par P53) et que cette interaction de PW1 et de Siah1a mène à l'apoptose, tandis que Siah1a seul ne mène qu'à l'arrêt du cycle cellulaire (F. Relaix et al., 2000). L'étude de l'implication de PW1 dans la réponse à l'hypoxie/ischémie dans les neurones conforte les observations précédentes de l'implication de concert de BAX, Siah1a et de PW1 dans l'activation de l'apoptose (Johnson et al., 2002; F. Relaix et al., 2000; Yamaguchi et al., 2002). (Figure 22)

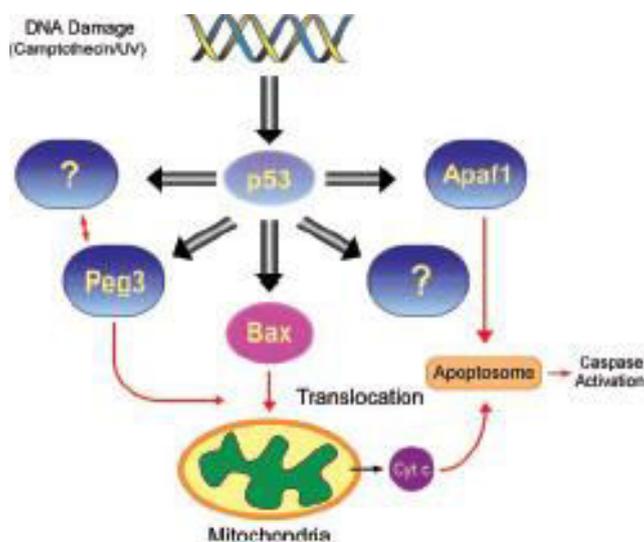


Figure 22 : Relations entre P53, PW1 (Peg3) et BAX dans l'activation de l'apoptose (Johnson et al., 2002).

Voie du VEGFR2

La voie du VEGFR2 activée par la décorine soluble peut activer l'expression de PW1. PW1 active alors l'expression de BECLIN1, protéine participant aux phases précoces de formation de l'autophagosome. PW1 est par la suite retrouvée associée à l'autophagosome aux

protéines BECLIN1 et LC3. L'ensemble de cette voie entraîne l'inhibition de l'angiogénèse (Buraschi et al., 2013) potentiellement en coopérant avec la voie P53. Il est cependant plus certain que la voie P53 et la voie du VEGFR2 activées par la décorine contribuent conjointement à l'inhibition de la voie Wnt. En effet, La décorine agit de concert avec WISP1 dans la rétro-inhibition de la β -caténine, inhibant alors la voie Wnt (Neill, Schaefer, & Iozzo, 2012) mais la décorine agit également par l'activation de PW1 par le VEGFR2. PW1 s'associant à Siah1a (voies P53 et VEGFR2) va induire la dégradation de la β -Caténine et également inhiber la voie Wnt (Buraschi et al., 2013).

Voie du TNF- α /NF- κ B

La voie du TNF- α requiert également PW1 dans certains mécanismes. Un des partenaires cytosolique du récepteur au TNF, TNFR1 peut activer TRAF2 qui interagit avec PW1 (Frederic Relaix, Wei, Wu, & Sassoon, 1998). Cette interaction induit la translocation de BAX dans la mitochondrie ce qui a pour effet final l'inhibition de la différenciation musculaire par une voie différente de la voie P53 (Haase & Hohlfeld, 1999). Cependant il a également été montré que le complexe TRAF2/PW1 peut également activer NF- κ B (Frederic Relaix et al., 1998). NF- κ B est une famille de dimères protéiques formés par P50, P52, P65, RelB et C-Rel. Les différentes combinaisons n'ont pas la même issue (Oeckinghaus & Ghosh, 2009). Néanmoins, la voie TNF- α /NF- κ B est également capable d'activer des voies de régénération musculaire. Des cellules satellites musculaires, ayant un potentiel myogénique, sont activées par le TNF- α , bien que ces cellules expriment PW1 (Pannerec et al., 2013) (figure 23).

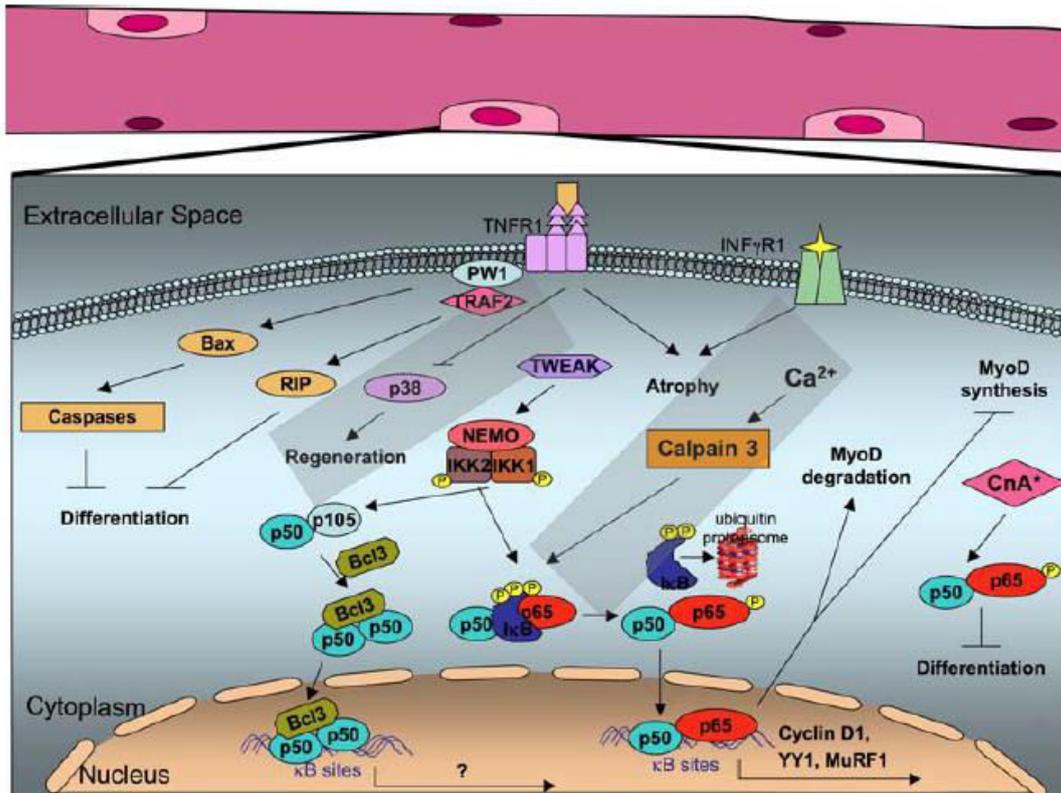


Figure 23 : Schéma récapitulatif de la voie du TNF- α menant à l'activation de NF- κ B. A noter l'activation de BAX par le complexe PW1/TRAF2 sans activation de l'apoptose (Haase & Hohlfeld, 1999).

Il faut également noter que TRAF2 et Siah1a possèdent le même domaine d'interaction protéine-protéine (RING). Il est suggéré par certains auteurs que PW1 interagirait via ce domaine (Yamaguchi et al., 2002). Ce qui est conforté par les résultats montrant une perte des interactions PW1/TRAF2 et PW1/Siah1a en présence d'une construction de PW1 dont les 592 premiers acides aminés ont été délétés (F. Relaix et al., 2000; Frederic Relaix et al., 1998), la zone d'interaction est le domaine riche en prolines compris entre les acides aminés 372 à 502 (Frederic Relaix et al., 1998). L'opposition des comportements pro- et anti-apoptotiques des voies P53 et TNF au travers des partenaires TRAF2 et Siah1a pourrait s'expliquer comme une balance, PW1 agissant comme une sécurité à l'activation des voies pro- et anti-apoptotiques. En effet, TRAF2 est impliqué dans la survie et la prolifération cellulaire et, dans un modèle de souris KO pour TRAF2, les souriceaux naissent avec une masse musculaire plus faible indiquant alors une possible implication de cette voie dans la croissance (MacLachlan & Giordano, 1998).

Partie 2 : Etude des cellules exprimant PW1 dans le cœur

Résumé de l'article

Notre équipe s'intéresse depuis longtemps aux cardiopathies ischémiques et aux mécanismes conduisant vers le développement de l'insuffisance cardiaque. La découverte de cellules PW1⁺ dans le cœur (cf. infra) et la participation importante de ces cellules en réponse à des lésions tissulaires dans plusieurs autres organes nous ont conduits à déterminer si le cœur abritait des cellules exprimant PW1 et, si tel était le cas, à les caractériser. Ce travail a fait l'objet d'une première publication (Yaniz-Galende et al., 2017) que je vais résumer ici.

Dans le but d'étudier les rôles des cellules exprimant PW1, un modèle de souris transgénique a été développé comme présenté ci-dessous. Le transgène est constitué d'une copie conforme du gène de *Pw1* dont l'exon 9 a été modifié par insertion d'une cassette *IRESnLacZ* (Internal Ribosome Entry Site nuclear β -Galactosidase) (figure 24). Ce transgène est ainsi régulé de la même manière que le gène *Pw1* endogène, et permet la synthèse d'une β -Galactosidase (β -Gal) localisée dans les noyaux des cellules exprimant PW1. De plus, ce rapporteur de l'expression de PW1 possède également une durée de vie plus longue que PW1.



Figure 24 : Représentation schématique de la copie du gène *Pw1* inséré dans le génome de souris afin d'obtenir la lignée transgénique PW1^{nLacZ}.

La première observation, à l'origine de ce programme de travail a été la constatation d'un marquage β -galactosidase au niveau du myocarde, plus précisément au niveau de l'épicaire ainsi que dans l'interstitium cardiaque superficiel. Ces premiers résultats ont suggéré la présence de cellules PW1⁺ au niveau cardiaque, ce qui a été confirmé par des marquages en immunofluorescence utilisant un anticorps monoclonal spécifique anti-PW1 (développé au laboratoire). Comme montré dans la figure 25, on identifie un marquage nucléaire au niveau de petites cellules situées au niveau de l'épicaire ou bien dans l'interstitium entre les cardiomyocytes. A l'inverse, aucun cardiomyocyte n'exprime PW1.

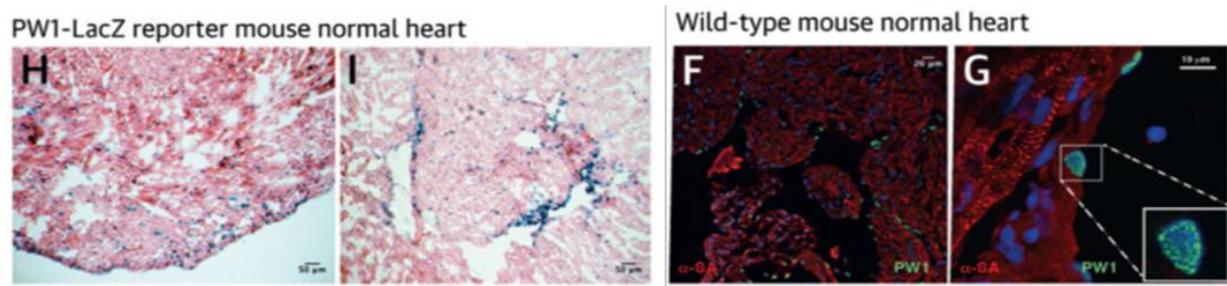


Figure 25 : Immunomarquages sur coupes de cœur sain de souris sauvages montrant PW1 (Vert) et l'actine sarcomérique alpha (Rouge) (F & G) et coloration X-Gal sur coupes de cœur de souris rapporteuse PW1^{nLacZ} (H & I) reflétant l'activité β -galactosidase du rapporteur de l'expression de PW1. Les marquages indiquent une localisation majoritairement péricardique et interstitielle de la population PW1⁺ dans le cœur sain.

Des immunomarquages ont aussi permis de montrer qu'on retrouve PW1 exprimé au niveau des zones infarctées dans le cœur de patients en post-infarctus. Les prélèvements sont effectués sur des patients présentant une fonction réduite du ventricule gauche en conséquence d'un IDM et nécessitant l'implantation d'une assistance circulatoire (figure 26).

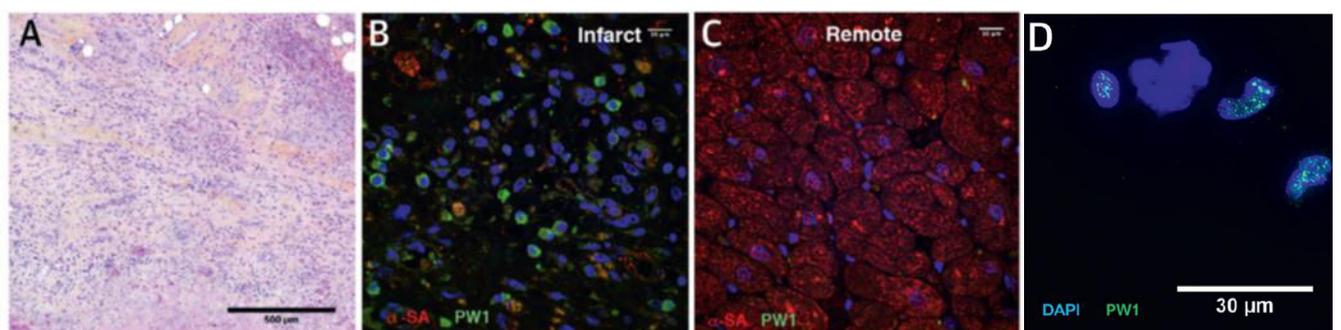


Figure 26 : Echantillons humains de cœur infarcté (A) colorés à l'hématoxyline éosine, montrant une zone remodelée ; (B & C) immunomarquage de l'actine sarcomérique alpha (rouge) et de PW1 (vert) en zone infarctée (B) et en zone non remodelée (C) qui montrent la répartition de PW1 dans le cœur infarcté de manière préférentielle en zone remodelée. (D) zone agrandie de la zone infarctée montrant le marquage punctiforme de PW1 dans le noyau des cellules.

Par la suite, les souris transgéniques PW1^{nLacZ} nous ont permis d'isoler les cellules PW1⁺ et de mieux les caractériser.

L'isolement de ces cellules par FACS et leur remise en culture a permis de montrer leurs capacités clonogéniques (formation de CFU – *colony-forming units*). *In vitro*, il a également été possible d'induire la différenciation vers le lignage mésenchymateux en obtenant des adipocytes, des ostéoblastes et des chondrocytes. De manière similaire, il a été possible d'obtenir des fibroblastes et des cellules musculaires lisses mais pas de cardiomyocytes. Toutes ces données attestent au minimum du caractère multipotent des cellules PW1⁺ (Figure 27).

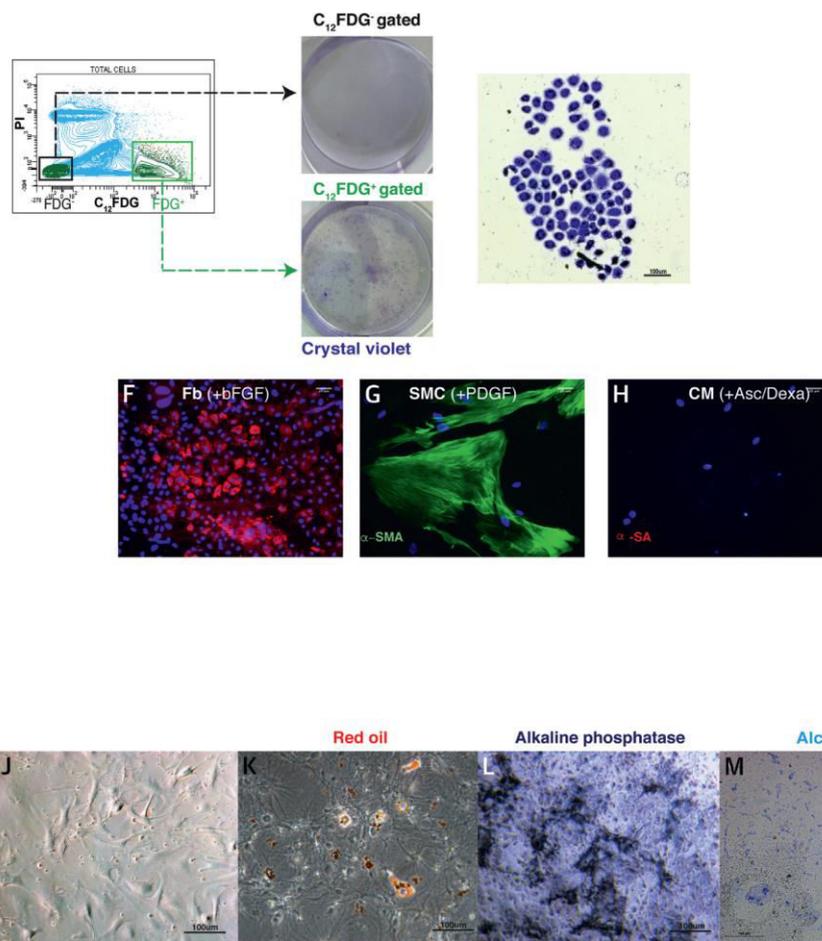


Figure 27 : La remise en culture des cellules FDG^+ a permis d'obtenir des colonies (en haut) qui ont pu ensuite être différenciées en fibroblastes (F) en cellules musculaires lisses (G) mais pas en cardiomyocytes (H). Des cellules issues du tri et cultivées (J) ont également pu être différenciées en adipocytes (K) en ostéoblastes (L) et en chondrocytes (M). Ces données attestent du caractère souche des cellules $PW1^+$.

Enfin, un profilage transcriptomique a été réalisé sur les cellules cardiaques $PW1^+$ et montre un profil particulier (par comparaison à d'autres types cellulaires souches comme des cellules souches murines embryonnaires ou des cellules mésenchymateuses de moelle osseuse, ou bien des cardiomyocytes fraîchement isolés). Les cellules cardiaques $PW1^+$ présentent une surexpression significative d'un groupe de gènes impliqué dans le développement tissulaire et dans le développement musculaire squelettique (Figure 28).

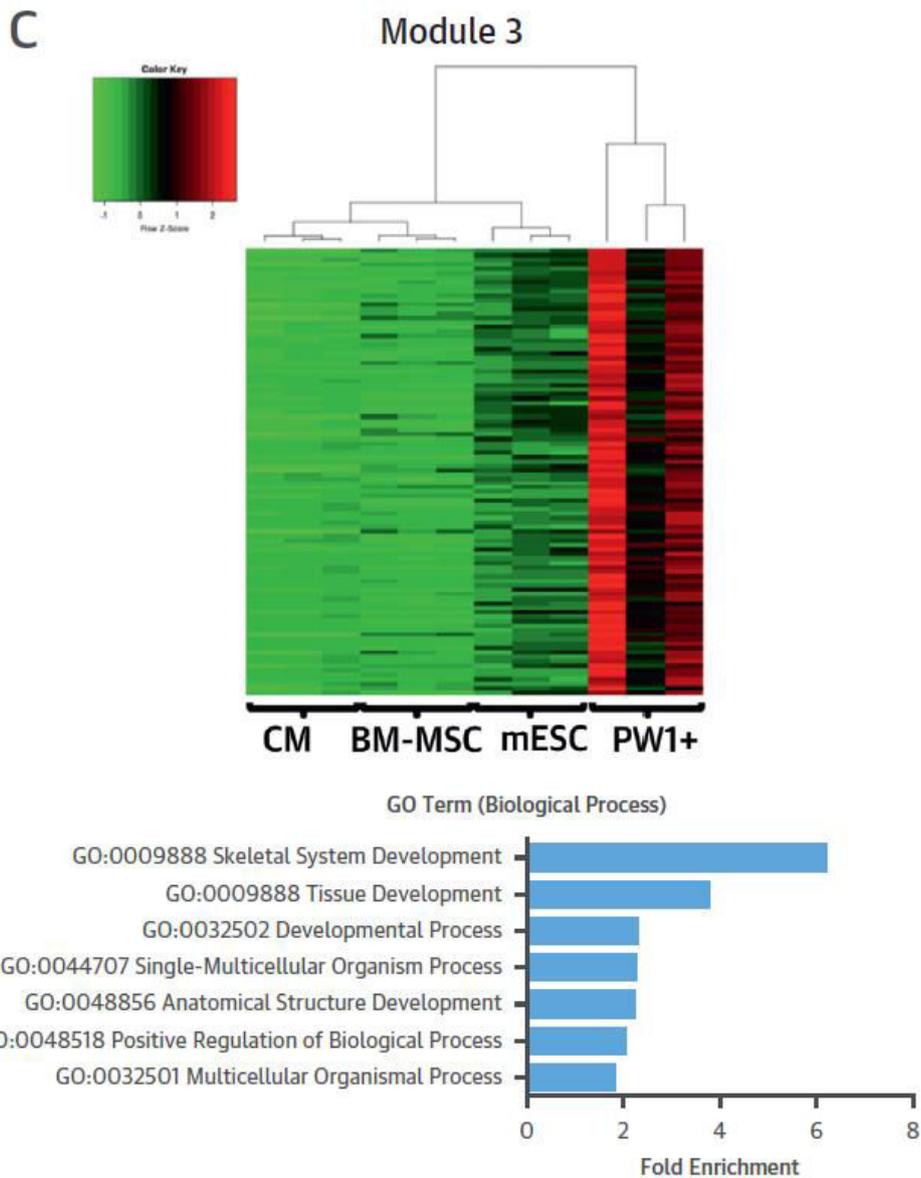


Figure 28 : Extrait de l'analyse transcriptomique montrant la hiérarchisation des différentes populations étudiées (haut) et les processus dans lesquels les gènes surexprimés par cette population sont impliqués (bas).

Ceci indique donc que la population des cellules souches cardiaques PW1⁺ présente des caractéristiques de cellules souches adultes

Par la suite, nous avons utilisé notre modèle murin rapporteur du gène PW1 pour étudier le devenir de ces cellules dans un modèle d'infarctus du myocarde. Brièvement, des souris mâles âgées de 8 semaines subissent une ligature de l'artère coronaire descendante gauche (LAD)

afin de mimer un infarctus du myocarde sans reperfusion (ce qui est le modèle murin le plus proche des données humaines présentées précédemment). En amont et en aval de l'opération sont également réalisées des échographies de contrôle afin de s'assurer de la présence d'un infarctus. Ces opérations sont réalisées au sein du CEF par du personnel dûment qualifié. 7 jours après ligature, les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale afin que leurs cœurs puissent être étudiés.

Dans les cœurs ischémiés, le nombre de cellules PW1⁺ croit fortement, suggérant une participation de ces cellules dans le processus de réparation ou tout du moins dans la réponse à la pathologie (Figure 29).

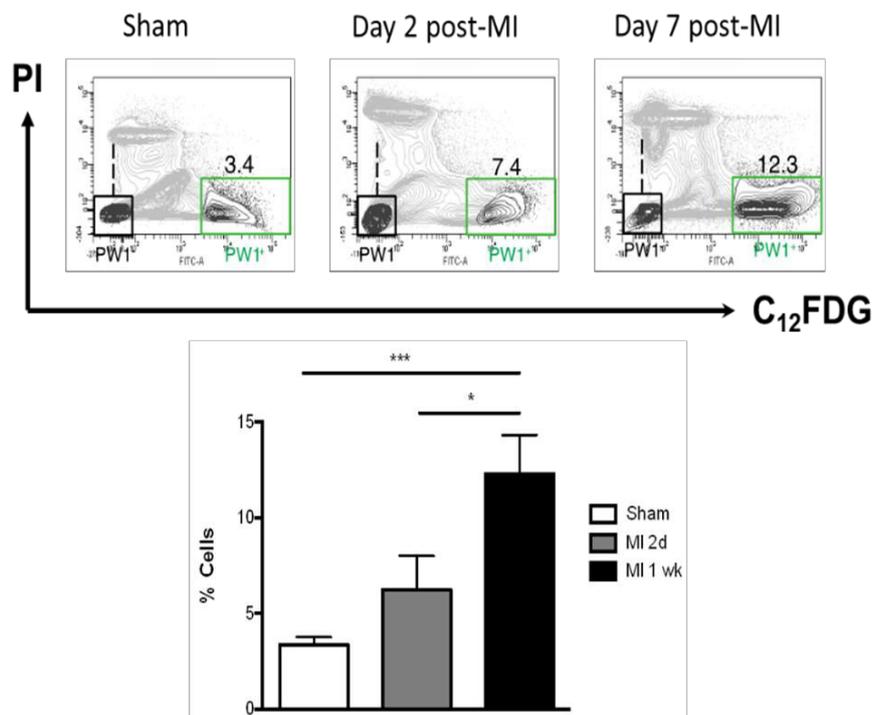


Figure 29 : Cytogrammes permettant la visualisation de la population exprimant PW1 grâce à l'activité β-Gal du rapporteur et de l'augmentation de la proportion de cette population entre les conditions contrôles (panneaux du haut) et la condition infarctée (panneaux du bas).

Les cellules PW1⁺ montrent une augmentation de leur prolifération en réponse à l'ischémie (figure 30).

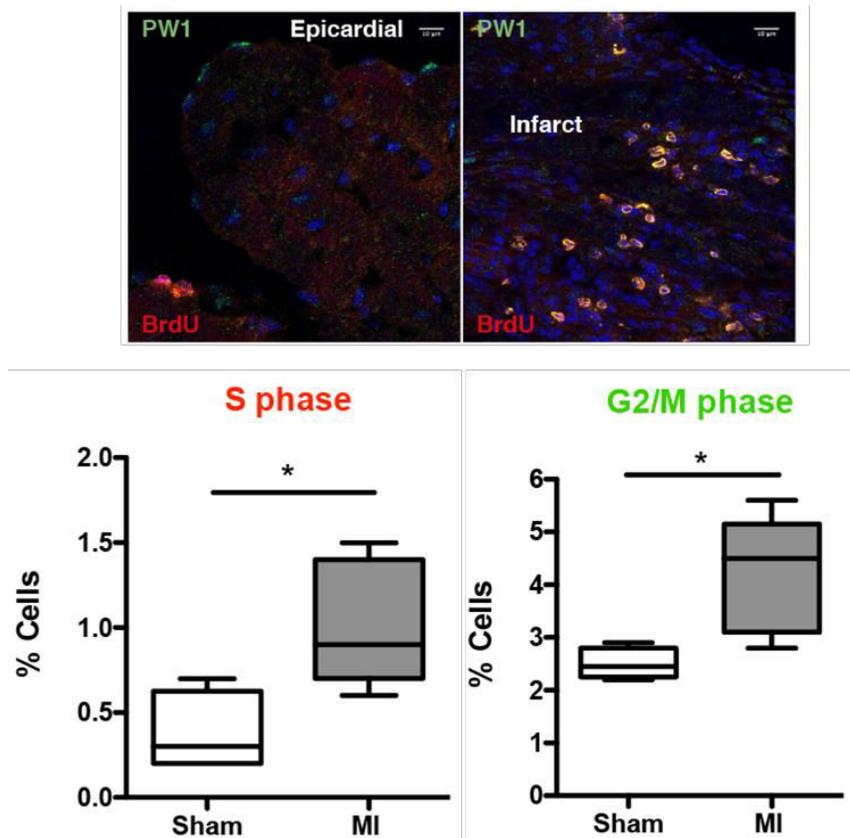
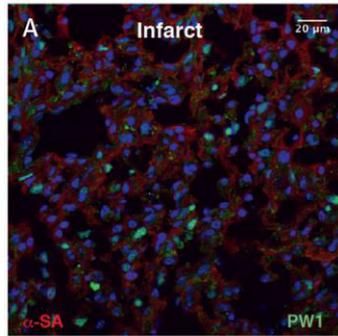


Figure 30 : Augmentation du nombre de cellules PW1⁺ prolifératives en conditions ischémiques.

Du fait de l'expression forte et de la demi vie relativement longue de la β -Gal, nous avons utilisé ce système pour suivre la destinée cellulaire (à court terme, environ 7 jours) des cellules PW1⁺. En effet, les cellules différenciées vont perdre l'expression de PW1 mais maintenir l'expression de β -Gal. Il est ainsi possible d'étudier l'expression de marqueurs cellulaires typiques sur les cellules β -Gal⁺.

Nous avons ainsi été en mesure de montrer que 22 % des fibroblastes (identifiés par l'expression de FSP1) étaient dérivés de cellules exprimant PW1 dans le modèle pathologique. Par ailleurs, la majorité des cellules PW1⁺ restent à l'état indifférencié et sont retrouvées préférentiellement dans la zone cicatricielle, entourées de cellules en prolifération, indiquant un possible dialogue intercellulaire (figure 31). De plus, nous avons confirmé que les cellules PW1⁺ dans les cœurs ischémiés présentent une surexpression nette de FSP1 (figure 32).

Mouse MI model (day 7)



PW1-LacZ reporter mouse heart (day 7 after MI)

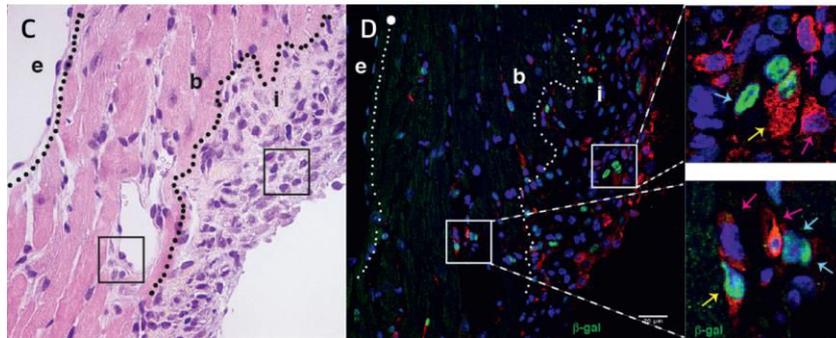


Figure 31 : Les cellules PW1⁺ retrouvées dans le cœur infarcté de souris sont majoritairement localisées au sein de la zone infarctée (A) où elles restent dans un état indifférencié, tandis que celles présentes dans l'interstitium du myocarde sain du même cœur infarcté expriment FSP1, un marqueur de fibroblastes (C & D).

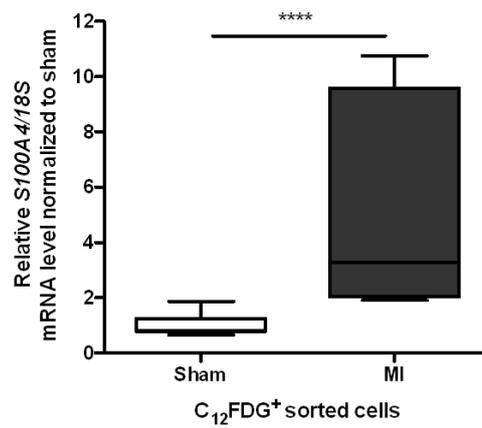


Figure 32 : Evaluation de la surexpression de FSP1 dans des cœurs infarctés par rapport aux cœurs normaux.

Enfin, en reprenant les données transcriptomiques initiales, nous avons étudié l'abondance d'expression de marqueurs typiques de fibroblastes ou de fibrose. Ceci incluait : MMP14, FSP1 (S100A4), Col6A1, Col1A1, Tgfb1, Tslp, Lox, Col3A1, Fn1, Vim, Postn, Tnc, Col1A2, MMP2, Inha, Loxl2, Acta2, Tgfb2, Fam180a et Serpinh1.

Nous avons observé que comparativement aux autres types cellulaires étudiés, les cellules cardiaques PW1⁺ présentent un niveau d'expression plus élevé de ces gènes de type fibroblastique, suggérant donc qu'elles présentent une expression accrue d'un programme génique de type fibrogénique (figure 33).

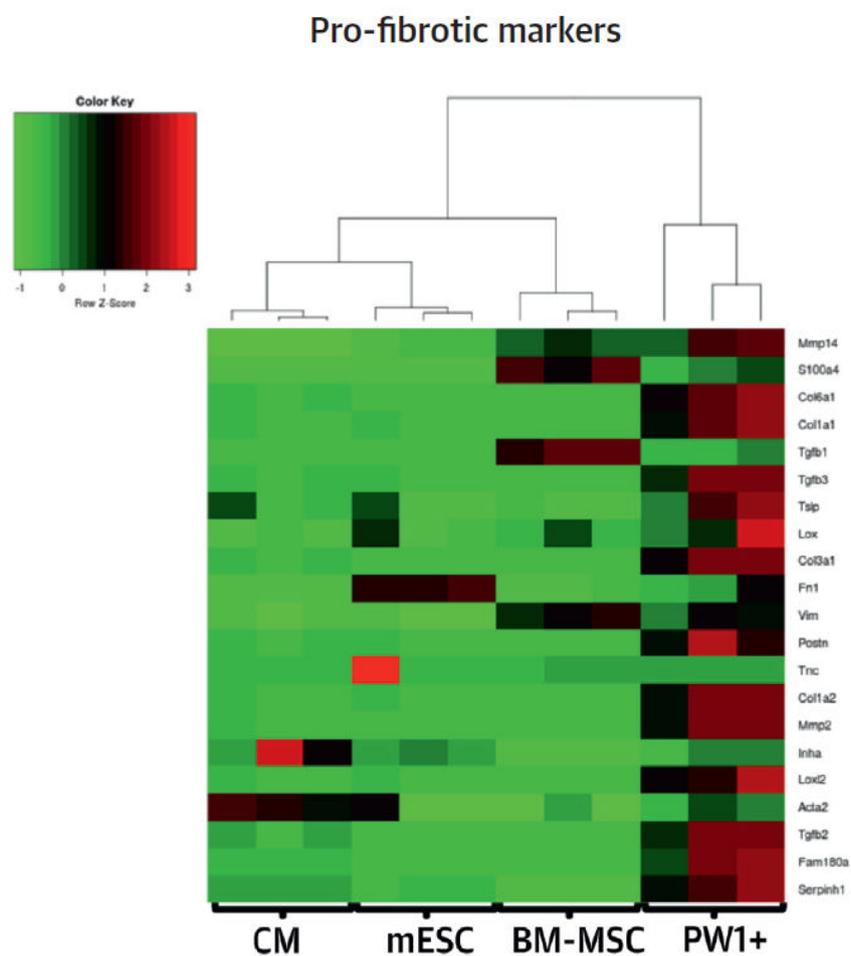


Figure 33 : Extrait de l'analyse transcriptomique présentant l'expression de marqueurs profibrotiques. La majorité de ces gènes sont fortement exprimé par les cellules PW1⁺ en comparaison avec les autres populations suggérant que les cellules PW1⁺ soient engagées dans un processus fibrotique.

Conclusions

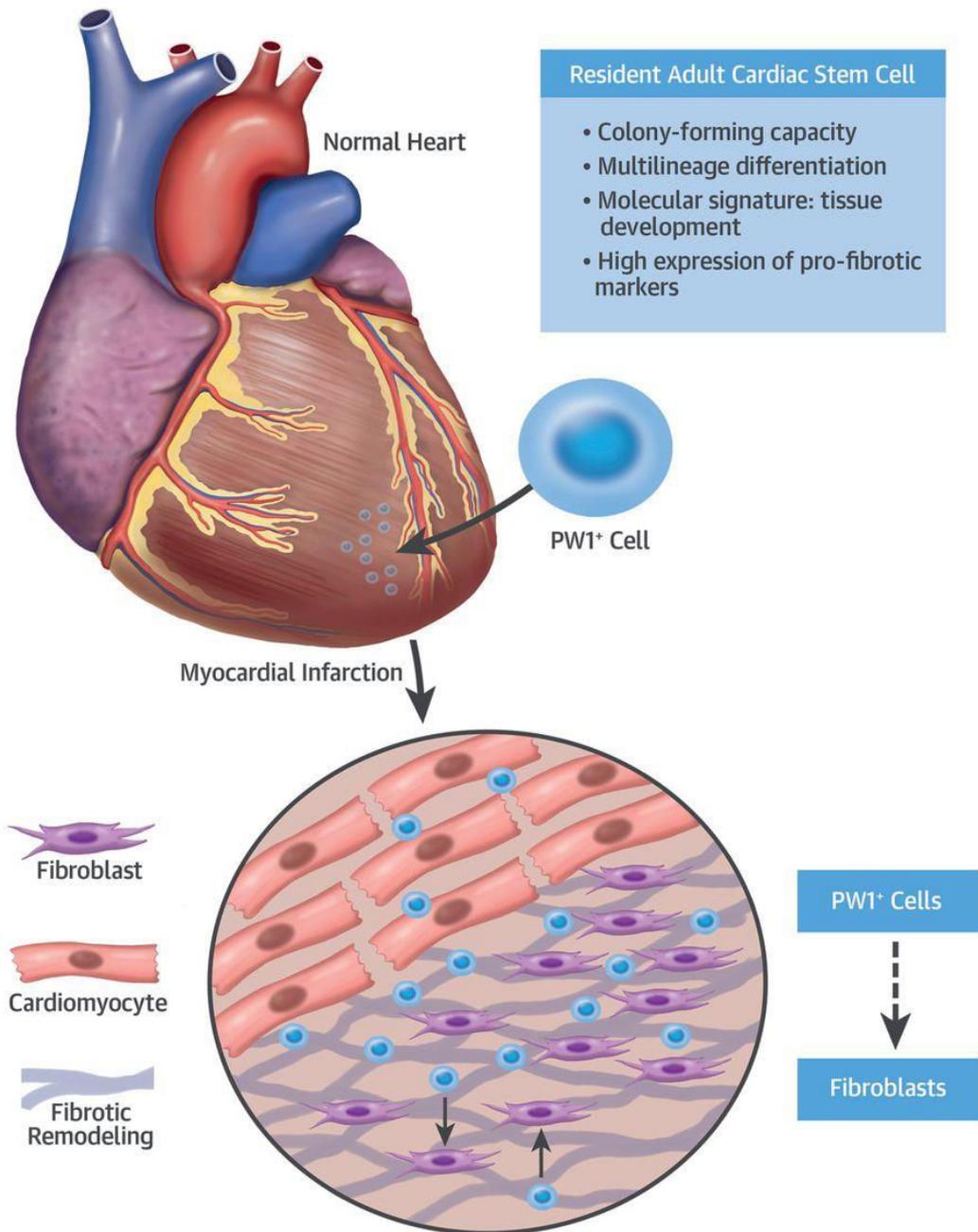
Les résultats que nous avons obtenus nous ont amené à considérer les cellules exprimant PW1 dans le cœur comme contributeurs de la fibrose cardiaque, principalement à cause de leur potentiel à donner naissance à de nombreux fibroblastes, mais également comme maîtres d'œuvre d'une communication cellulaire favorisant l'activation de fibroblastes résidents.

Des études récentes ont montré l'implication de cellules souches mésenchymateuse dans la fibrose de nombreux organes (Darby & Hewitson, 2007; Kramann et al., 2015). Les nombreuses preuves de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses en fibroblastes et myofibroblastes indiquent un rôle prépondérant de ces cellules dans le processus fibrotique délétère (figure 34).

Ces différentes informations montrent qu'il est nécessaire d'identifier et de comprendre le rôle de ces cellules PW1⁺ dans le cœur. Pour ce faire, il est nécessaire de continuer à les caractériser, de comprendre le rôle de ces cellules souches dans la progression de la fibrose, mais également de trouver un moyen de les contrôler afin d'empêcher la progression de la fibrose interstitielle.

L'identification de la population de cellules souches cardiaques par le marqueur de cellules souches PW1 est une limitation. En effet, l'étude des cellules l'exprimant ne peut être réalisée à l'heure actuelle que dans le modèle murin transgénique, bien que PW1 ait été retrouvé chez d'autres mammifères dont l'humain. Il devient urgent d'avoir une signature membranaire corrélée à la présence de PW1 qui soit insensible aux pathologies en particulier aux cardiopathies ischémiques. Il est également impératif d'explorer la possibilité de cibler ces cellules afin de les inhiber de manière à réduire – voire stopper – la progression de la fibrose interstitielle.

CENTRAL ILLUSTRATION: Cardiac PW1⁺ Adult Stem Cells



Yaniz-Galende, E. et al. J Am Coll Cardiol. 2017;70(6):728-41.

Figure 34 : Schéma résumant nos découvertes : Le cœur abrite une population de cellules exprimant PW1 qui présentent des caractéristiques de cellules souches. Néanmoins, cette population exprime de nombreux marqueurs profibrotiques et participerait activement au processus de remodelage cardiaque post-infarctus en particulier en donnant naissance à une population de fibroblastes. Le rôle de PW1 dans la réparation cardiaque post-infarctus est néanmoins inconnu et nécessite d'être étudié afin de déterminer si ces cellules participent au remodelage bénéfique ou néfaste de l'organe.

EDITORIAL COMMENT

In Vitro Adherence Defines Therapeutic Cardiac Mesenchymal Cell Subpopulation*

Kenneth Michael Fish, PhD,^a Jean-Sébastien Hulot, MD, PhD^b

Heart failure (HF) remains one of the greatest growing human health threats with global penetrance, affecting an estimated 5.7 million adults 20 years and older in the United States alone, a figure that could increase 46% and top 8 million by 2030 (1). Contributing to the HF prevalence rate is the continuing high incidence of myocardial infarction (MI). Annually, more than 1.1 million patients are discharged from American hospitals with a diagnosis of acute coronary syndrome (1).

Ischemic cardiomyopathy is a major contributor to HF, with massive numbers of cardiomyocytes lost as a result of MI. Ongoing apoptosis post infarction is a significant contributor to HF progression, exacerbating the loss of viable myocardium. With the discovery that cardiac regeneration can occur, cell therapy emerged as a novel and safe approach to cardiac repair and regeneration; however, for regeneration to have meaningful benefit, complex post-delivery molecular- and cellular-driven events must take place. These events include chemotaxis, proliferation, differentiation, and integration at the cellular level, as well as reverse remodeling and restoration of function throughout the myocardium.

Historically, cardiac regeneration research has focused on delivering stem cells of mesenchymal and hematopoietic origin to the heart with the goal of

regenerating cardiomyocytes lost during either MI or progression to HF. Myocardial residence times of delivered cells have been shown to be discouragingly short. Therefore, their direct homing, adhesion, proliferation, and differentiation to functioning myocardium is of extremely limited benefit, which means improved outcomes must be from alternative mechanisms. Lineage-tracing studies have documented minimal cardiac stem cell (CSC) cardiomyogenesis, shedding doubt that they mature into functioning cardiomyocytes in the adult mammalian heart, although controversies continue (2). Optimism remains high for several reasons:

1. Stem cells express beneficial paracrine factors that influence endogenous stem cells;
2. Endogenous resident stem cells in the adult heart have cardiomyogenic potential (3);
3. cKit⁺ resident CSCs have multiple lineage potential;
4. Mesenchymal stem cell or CSC delivery to the failing heart results in improved cardiac function, angiogenesis, and detection of populations of cells expressing both CSC and cardiomyocyte markers (4);
5. Although extremely rare, cardiomyocyte proliferation has been demonstrated by cKit cell fusion with cardiomyocytes in the failing heart (5), as well as in hypoxic healthy or failing hearts (6). These findings supported the hypothesis that paracrine factors are the main effectors of endogenous CSC responses in the failing heart, leading to cardiac repair with inconsequential levels of cardiomyogenesis. Furthermore, regardless of mechanism, the relative therapeutic potential of the various stem cells is unclear. Thus, more complete comparative studies focusing on stem cell therapeutic efficacy, cell signaling in the heart, and the effects on cardiac cell survival, remodeling, and function in the setting of HF remain unmet needs.

*Editorials published in the *Journal of the American College of Cardiology* reflect the views of the authors and do not necessarily represent the views of JACC or the American College of Cardiology.

From the ^aIcahn School of Medicine at Mount Sinai, Cardiovascular Research Center, New York, New York; and the ^bSorbonne Universités, UPMC University Paris 06, AP-HP, Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France. This work is supported by National Heart, Lung, and Blood Institute R01, HL112324, National Heart, Lung, and Blood Institute R01 HL119046, and Foundation Leducq 13CVD01. Both authors have reported that they have no relationships relevant to the contents of this paper to disclose.

Recently, Wysoczynski et al. identified a cKit⁺ stable subset of progenitors isolated from the murine heart that can be functionally separated from other stem cells based on the kinetics of adherence to culture plates and bottles (7). Now, in this issue of the *Journal*, they show that subsets of cardiac mesenchymal cells (CMCs) have contrasting molecular phenotypes that include signaling factors and contrasting efficacies in the setting of ischemic cardiomyopathy (8).

SEE PAGE 1824

Under the experimental protocols used, CMCs that adhered to plastic plates within 4 h were less therapeutically active than CMCs that adhered over at least a 24-h period. Therefore, a functional phenotype of slowly adhering (SA) CMCs was defined, and this property could be used to enrich more beneficial subpopulations. In comparative studies in the setting of ischemic cardiomyopathy, cKit-sorted SA CMCs stimulated angiogenesis in the infarcted heart, whereas rapidly adhering CMCs uniquely elevated collagen deposition and hypertrophy endpoints. It is notable that although acute and subacute fibrosis is beneficial for stabilizing the ventricular wall, there remains the potential for this progenitor cell population to stimulate pathophysiological chronic scar expansion. The distinctive pattern of cytokine gene expression by SA CMCs included increased expression of proliferative and prosurvival factors and reduced expression of proinflammatory and profibrotic factors relative to CMCs. These contrasts in expression profiles were consistent with improved structural and functional outcomes driven from SA CMC delivery to mice with ischemic cardiomyopathy. These results highlighted the fact that stem cells, regardless of source, are heterogeneous collections of cells with heterogeneous therapeutic potential and are highly responsive to their environments. Therefore, detailed molecular and functional characterizations of mesenchymal stem cells, CSCs, and CMCs and their subtypes are needed to define their relative therapeutic potential and improve translation of cell therapy for HF to the clinic.

Some of the most promising therapeutic stem cells have been isolated from the myocardium itself, driving repair via paracrine mechanisms. Wysoczynski et al. (8) describe a subpopulation of CMCs that are relatively easy to purify. The expression of surface markers (and thus phenotype) on SA CMCs appears to

be more stable than that of previously reported cKit⁺ progenitors. SA CMCs are highly suitable for clinical use because the phenotype is more stable and they likely secrete a more consistent suite of paracrine factors. Because these cells impart much of their beneficial effects via a complex suite of soluble and exosomal factors, future complementary approaches include direct delivery of secreted cell products, potentially forgoing the need to deliver the cells themselves. However, the complex compositions of cell secretomes responsible for the multifactorial effects, including modulating immune responses, scar expansion, and apoptosis, as well as improving cardiac function, remain poorly characterized.

The contrasting effects of SA CMCs versus rapidly adhering CMCs highlight the potential for expression of both therapeutic and pathophysiological paracrine factors, which also are poorly understood. Because stem cells are highly sensitive to their environments, it is likely that their secretome compositions change in response to being delivered to the failing heart. Although in the preclinical exploratory phase (9,10), clinical translation of secretome delivery to the failing heart will require more complete characterization of stem cell phenotypes and in vitro compositional control of their secretomes. Until these unmet needs are met, cell delivery remains as one of the most promising approaches to myocardial preservation and repair in the setting of ischemic and nonischemic cardiomyopathy.

Although cell therapy is safe, its full therapeutic potential has yet to be realized. Currently, regeneration of cardiomyocytes in the setting of HF has been especially rare and inconsequential. Despite this current limitation, preservation of viable myocardium and its function, although limiting inflammation and fibrosis, is commonly reported. Wysoczynski et al. are currently identifying and characterizing a subset of cardiac mesenchymal cells that can be readily isolated from murine hearts based on their adherence properties and are therapeutic in the setting of ischemic cardiomyopathy.

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE: Dr. Kenneth Michael Fish, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, Department of Cardiology, 1 Gustave Levy Place, New York, New York 10029. E-mail: kenneth.fish@mssm.edu.

REFERENCES

- Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics: 2016 update: a report from the American Heart Association [published correction appears in *Circulation* 2016;133:e599]. *Circulation* 2016; 133:e38-360.
- Keith MC, Bolli R. "String theory" of c-kit^{pos} cardiac cells: a new paradigm regarding the nature of these cells that may reconcile apparently

discrepant results [published correction appears in *Circ Res* 2015;116:e133]. *Circ Res* 2015;116:1216-30.

3. Laflamme MA, Murry CE. Heart regeneration. *Nature* 2011;473:326-35.

4. Bolli R, Tang XL, Sanganalath SK, et al. Intracoronary delivery of autologous cardiac stem cells improves cardiac function in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2013;128:122-31.

5. van Berlo JH, Kanisicak O, Maillet M, et al. c-Kit⁺ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. *Nature* 2014;509:337-41.

6. Nakada Y, Canseco DC, Thet S, et al. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice. *Nature* 2017;541:222-7.

7. Wysoczynski M, Dassanayaka S, Zafir A, et al. A new method to stabilize c-Kit expression in reparative cardiac mesenchymal cells. *Front Cell Dev Biol* 2016;4:78.

8. Wysoczynski M, Guo Y, Moore JB IV, et al. Myocardial reparative properties of cardiac mesenchymal cells isolated on the basis of adherence. *J Am Coll Cardiol* 2017;69:1824-38.

9. Emanuelli C, Shearn AI, Angelini GD, Sahoo S. Exosomes and exosomal miRNAs in cardiovascular protection and repair. *Vascul Pharmacol* 2015;71:24-30.

10. Sahoo S, Losordo DW. Exosomes and cardiac repair after myocardial infarction. *Circ Res* 2014;114:333-44.

KEY WORDS cardiomyopathy, exosome, fibrosis, paracrine factors, stem cell



Fibrogenic Potential of PW1/Peg3 Expressing Cardiac Stem Cells

Elisa Yaniz-Galende, PhD,^a Maguelonne Roux, MSc,^a Sophie Nadaud, PhD,^a Nathalie Mougénot, PhD,^b Marion Bouvet, PhD,^a Olivier Claude, PhD,^a Guillaume Lebreton, MD,^a Catherine Blanc, PhD,^a Florence Pinet, PhD,^c Fabrice Atassi, BSc,^a Claire Perret, MSc,^a France Dierick, PhD,^a Sébastien Dussaud, PhD,^a Pascal Leprince, MD, PhD,^a David-Alexandre Trégouët, PhD,^a Giovanna Marazzi, MD,^a David Sassoon, PhD,^a Jean-Sébastien Hulot, MD, PhD^a

ABSTRACT

BACKGROUND *Pw1* gene expression is a marker of adult stem cells in a wide range of tissues. PW1-expressing cells are detected in the heart but are not well characterized.

OBJECTIVES The authors characterized cardiac PW1-expressing cells and their cell fate potentials in normal hearts and during cardiac remodeling following myocardial infarction (MI).

METHODS A human cardiac sample was obtained from a patient presenting with reduced left ventricular (LV) function following a recent MI. The authors used the PW1^{nLacZ+/-} reporter mouse to identify, track, isolate, and characterize PW1-expressing cells in the LV myocardium in normal and ischemic conditions 7 days after complete ligation of the left anterior descending coronary artery.

RESULTS In both human and mouse ischemic hearts, PW1 expression was found in cells that were mainly located in the infarct and border zones. Isolated cardiac resident PW1⁺ cells form colonies and have the potential to differentiate into multiple cardiac and mesenchymal lineages, with preferential differentiation into fibroblast-like cells but not into cardiomyocytes. Lineage-tracing experiments revealed that PW1⁺ cells differentiated into fibroblasts post-MI. Although the expression of c-Kit and PW1 showed little overlap in normal hearts, a marked increase in cells coexpressing both markers was observed in ischemic hearts (0.1 ± 0.0% in control vs. 5.7 ± 1.2% in MI; p < 0.001). In contrast to the small proportion of c-Kit⁺/PW1⁻ cells that showed cardiogenic potential, c-Kit⁺/PW1⁺ cells were fibrogenic.

CONCLUSIONS This study demonstrated the existence of a novel population of resident adult cardiac stem cells expressing PW1⁺ and their involvement in fibrotic remodeling after MI. (J Am Coll Cardiol 2017;70:728-41)
© 2017 by the American College of Cardiology Foundation.

Ischemic heart failure (HF) remains a leading cause of mortality and morbidity worldwide (1-3). Following myocardial infarction (MI), the heart progressively replaces lost cardiomyocytes (CMs) with fibrous noncontractile scar tissue. In contrast to other organs, the heart displays minimal regeneration following injury that severely

compromises its function and further contributes to HF. In many tissues (e.g., skin, intestine, skeletal muscle), tissue repair relies upon resident adult stem cells, defined as endogenous stem cells that can self-renew and replace lost damaged cells. The existence of adult cardiac muscle stem cells (CSCs) and their role in response to ischemic injury has



Listen to this manuscript's audio summary by JACC Editor-in-Chief Dr. Valentin Fuster.



From the ^aSorbonne-Universités, Université Pierre-et-Marie-Curie (UPMC), INSERM UMRS 1166, Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Paris, France; ^bSorbonne-Universités, UPMC, Plate forme d'Expérimentation Coeur Muscles Vaisseaux, Paris, France; and the ^cINSERM U1167, Université de Lille, Institut Pasteur de Lille, Fédération Hospitalo-Universitaire Remodeling in Valvulopathy and Heart Failure, Lille, France. This work was supported by grants from the Fondation Leducq (13CVD01, CardioStemNet project), the Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ANR-10-IAHU-05), the ANR REVIVE (Laboratoire d'Excellence) (Dr. Sassoon), the Fondation pour la Recherche Médicale and GENMED Laboratory of Excellence on Medical Genomics (ANR-10-LABX-0013) (Dr. Roux), and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-15-CE14-0020-01) (Dr. Nadaud). The authors have reported that they have no relationships relevant to the contents of this paper to disclose.

Manuscript received January 18, 2017; revised manuscript received May 30, 2017, accepted June 2, 2017.

been controversial (4-6). Several putative CSCs have been identified in the adult heart based upon stem cell capacity, morphology, and expression of different surface and transcription markers (4-6). Among the subsets of CSCs, the c-Kit⁺ CSCs display a capacity to self-renew, differentiate into CMs, and contribute to cardiac regeneration in the ischemic heart, although this contribution appears to be minimal (7-10). Other resident CSC in embryonic, neonatal, and adult mammalian hearts have been identified by different surface markers (including stem cell antigen [Sca]-1 or platelet-derived growth factor [PDGF] receptor alpha [PDGFR α]) (11,12).

SEE PAGE 742

Pw1 (also known as paternally expressed gene *Peg3*) has been shown to be expressed in stem cells in all adult tissues thus far examined (13,14); however, the existence and cell fate of PW1⁺ cells in the normal and post-MI adult heart had not been examined previously. We demonstrate here the existence of a cardiac population of cells expressing PW1 in both human and mouse hearts. We used the PW1 reporter transgenic mouse, PW1^{nLacZ}, which expresses the nuclear beta-galactosidase (β -gal) in the context of the PW1 gene (14), to isolate and characterize the PW1⁺ cells in normal and ischemic hearts.

METHODS

MI BY LEFT ANTERIOR DESCENDING CORONARY ARTERY LIGATION. MI was performed in male 8-week-old C57BL/6 or PW1-reporter (PW1^{nLacZ}) mice by left anterior descending coronary artery permanent ligation. Mice were analyzed 7 days after left anterior descending coronary artery permanent ligation.

FLOW CYTOMETRY. Small cell suspensions were prepared from total heart upon atria removal from 8-week-old PW1^{nLacZ} mice. Ventricular tissue was enzymatically digested with collagenase II and dissociated. To detect β -gal-reported activity, cells were incubated at 37°C for 1 h using the fluorescent substrate 5-dodecanoylamino fluorescein di- β -D-galactopyranoside (C₁₂FDG). The different populations were gated, analyzed, and sorted in a fluorescence-activated cell sorting (FACS) cytometer.

RNA SEQUENCING. We used 300 ng of total RNA extracted from freshly isolated cells to perform library preparation with the SureSelect Strand-Specific RNA kit (Agilent Technologies, Santa Clara, California) per the manufacturer's instructions.

We used the Cutadapt program (15) to trim sequenced bases with low quality (<28) and restricted downstream analyses to reads with length >90 bp.

Selected reads were mapped to a murine reference transcriptome that was generated by the RSEM package (16) from the full mouse reference genome and the gtf transcript annotations file from Ensembl (17). Analyses were conducted under the R environment (version 3.2.2).

STATISTICAL ANALYSIS. Data were expressed as mean \pm SEM. When comparing more than 2 groups, quantitative data were analyzed using 1-way analysis of variance and pair-wise comparisons with Tukey's test for multiple comparisons. The Mann-Whitney *U* test was used for comparing continuous variables between 2 groups. All *p* values <0.05 were considered significant.

A detailed description of all experimental procedures is provided in the [Online Appendix](#).

RESULTS

Because PW1⁺ cells undergo a pronounced increase in number following injury in multiple tissues (18,19), we first investigated PW1 expression in human hearts following MI. We performed immunofluorescence analyses on a cardiac explant from a patient presenting with reduced left ventricular (LV) function following a recent MI (Figures 1A to 1D). We observed PW1 staining in cells located in the infarct zones (Figure 1B), whereas PW1⁺ cells were barely detectable in the myocardium distal to the infarct site (Figure 1C). PW1 was not expressed in CMs. A nuclear and punctiform PW1 staining was identified in PW1-expressing cells (Figure 1D). PW1 protein expression was also confirmed by western blot in human normal and ischemic hearts (Figure 1E).

To further characterize these newly identified PW1⁺ cardiac cells, we assessed *Pw1* expression in normal mouse LV myocardium using immunofluorescence. We found that *Pw1* was expressed in the adult myocardium by cells located in the epicardium and interstitial space (Figures 1F and 1G). Using a PW1^{nLacZ} reporter mouse (14), we observed a similar pattern of expression (Figures 1H and 1I). In these mice, we confirmed that β -gal and PW1 staining colocalized as reported previously in other tissues (14) (Online Figure 1). Previous studies have demonstrated that PW1⁺ cells can be successfully isolated by FACS from PW1^{nLacZ}-reporter mice using C₁₂FDG, a fluorescent substrate for β -gal activity (14,20). Therefore, to further characterize the PW1 expressing population, we isolated C₁₂FDG⁺ cells (referred as PW1⁺ cells) from

ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

SMA = smooth muscle actin

β -gal = beta-galactosidase

BM = bone marrow

C₁₂FDG = 5-dodecanoylamino fluorescein di- β -D-galactopyranoside

CM = cardiomyocytes

CPC = cardiac progenitor cell

CSC = cardiac muscle stem cells

FACS = fluorescence-activated cell sorting

FSP1 = fibroblast specific protein 1

HF = heart failure

LV = left ventricular

mESC = mouse embryonic stem cell

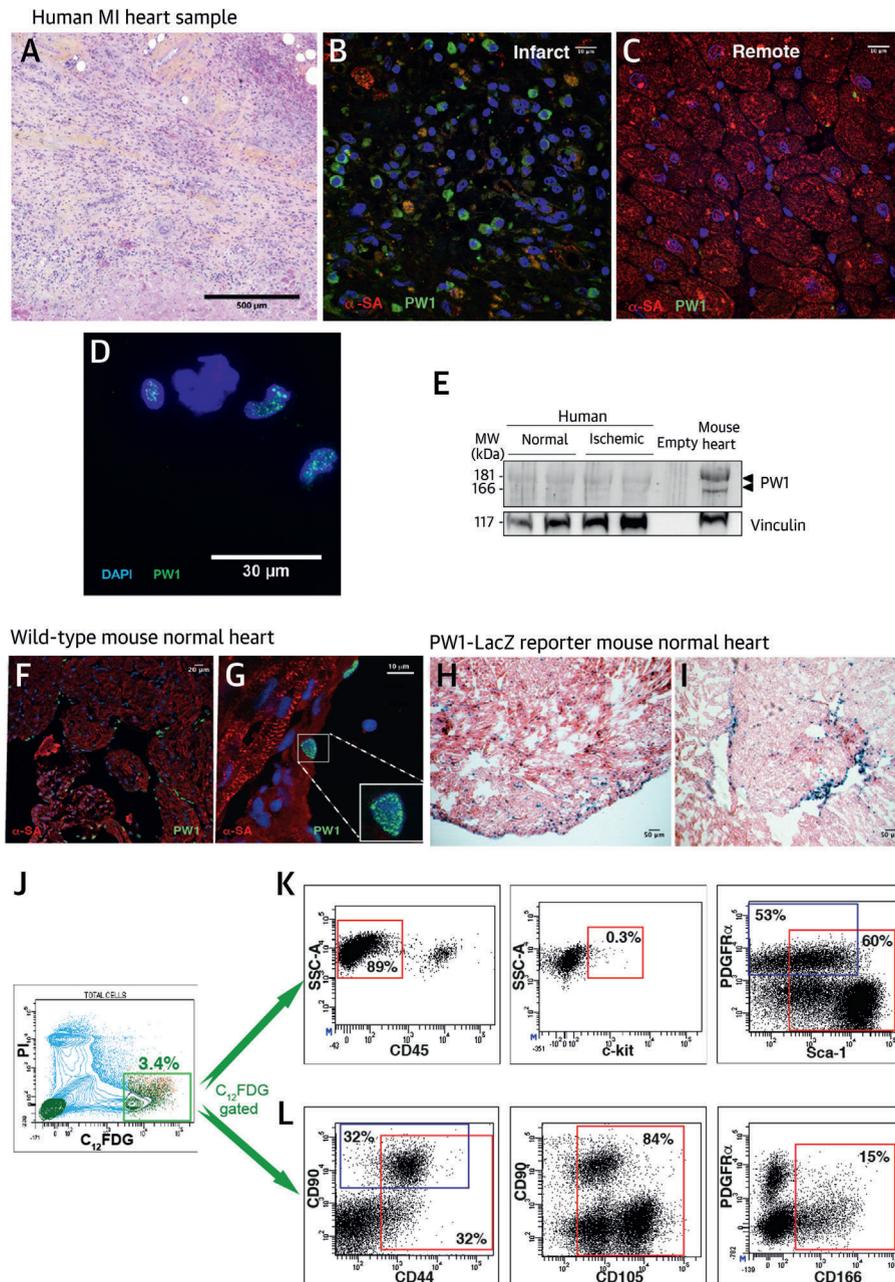
MI = myocardial infarction

MSC = mesenchymal stem cells

PDGF = platelet-derived growth factor

Sca = stem cell antigen

SMC = smooth muscle cell

FIGURE 1 Identification of Cardiac Cells Expressing PW1

(A) Representative hematoxylin and eosin (H&E) staining shows a section of a human heart presenting with a myocardial infarction (MI) at 2 weeks. **(B to D)** Immunofluorescent staining identifies PW1 (green), alpha-sarcomeric actinin (α -SA) (red), and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blue) in human ischemic sections; PW1 staining is observed in the nucleus of cells within the infarct **(B,D)** zone but not in remote myocardium **(C)**. **(E)** Representative western blot of PW1 in the heart of patients without heart failure and patients with ischemic cardiac disease. Two bands of 181 and 166 kDa are detected corresponding to the anticipated molecular weights of 2 main PW1 isoforms. Vinculin protein was also detected on the same blot as a protein loading control. We used 40 μ g of mouse heart proteins as a positive control. **(F,G)** Immunofluorescent staining on control mouse hearts for PW1 (green) and α -SA (red) revealed PW1⁺ cells in the epicardium **(F)** and cardiac interstitial space **(G)**; high magnification shows nuclear staining in PW1⁺ cells. **(H,I)** Eosin and X-Gal staining (blue) on heart sections from PW1^{nLacZ} reporter mice confirmed PW1 expression patterns. **(J)** Fluorescence-activated cell sorting of single-cell suspensions from PW1^{nLacZ} reporter mice heart extracts; sorting was based on β -galactosidase (β -gal) activity, and PW1⁺ cells were identified as 5-dodecanoylamino fluorescein di- β -D-galactopyranoside (C₁₂FDG⁺) cells. In cell-surface marker expression profiles in PW1⁺ cells, representative plots depict CD45, c-Kit, stem cell antigen (Sca)-1, and platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFR α) as typical cardiac progenitor cell (CPC) markers **(K)** and CD90, CD44, CD105, and CD166 as typical mesenchymal stem cells (MSC) markers **(L)**. PI = propidium iodide; SSC-A = side scatter.

the heart of PW1^{nLacZ}-reporter mice (14). Small cells were separated from CMs by differential centrifugation and PW1⁺ cells were then sorted based upon their β -gal activity. After isolation by FACS, β -gal reporter expression corresponded to endogenous PW1 expression in freshly isolated and cultured cells (Online Figures 2A to 2C). Representative FACS plots illustrated the gating strategy used to define PW1⁺ cells that were estimated to represent $3.4 \pm 0.4\%$ of the non-CM subset in normal left ventricles (Figure 1J).

We next analyzed the expression of classical markers of mesenchymal stem cells (MSCs) and cardiac progenitor cells (CPCs) in PW1⁺ cells (Figures 1K and 1L). A large proportion ($88.3 \pm 2.9\%$) of PW1⁺ cells did not express CD45, whereas most ($83.8 \pm 4.3\%$) were positive for CD105 (Figure 1L). PW1⁺ cells showed Sca-1 and PDGFR α expression in $58.3 \pm 7.6\%$ and $53.4 \pm 7.3\%$ of the cells, respectively. Similarly, $32.6 \pm 5.3\%$ and $31.7 \pm 5.8\%$ of PW1⁺ cells expressed CD90 and CD44 markers, respectively, whereas only 0.3% of PW1⁺ cells expressed c-Kit (Figures 1K and 1L).

CARDIAC PW1⁺ CELLS FORM COLONIES. To determine whether cardiac PW1⁺ cells are clonogenic and to determine their cell fate potentials, freshly isolated C₁₂FDG⁻ and C₁₂FDG⁺ cells from PW1^{nLacZ}-reporter mouse hearts were sorted and subsequently cultured for 14 days to test their capacity to form colony-forming units (Figures 2A and 2B). In contrast to C₁₂FDG⁻ cells, PW1⁺ cells were able to form colonies consisting of cells with a flat morphology and a high nucleus/cytoplasm ratio (Figures 2C to 2E). Primary colony-forming unit fibroblast colonies were manually picked up, reseeded, and the resultant secondary colonies still maintained the same morphology. Freshly isolated colonies were placed onto adherent conditions and induced to differentiate under multiple conditions that favor specific cell fate outcomes (i.e., PDGF, basic fibroblast growth factor, and ascorbic acid/dexamethasone for smooth muscle cells [SMCs], fibroblast, and CMs, respectively). We found that PW1⁺ colonies gave rise to cells expressing alpha smooth muscle actin (SMA) and fibroblast-specific protein 1 (FSP1) proteins depending on stimulation conditions after 2 weeks in culture (Figures 2A and 2F to 2H). However, we were unable to derive CM from the isolated colony-forming unit fibroblast colonies as assessed by the lack of any alpha-sarcomeric actinin expressing cells after 2 weeks in differentiation media.

The expression of CD44 and CD90 suggested that the PW1⁺ population partially shares a surface marker profile with MSCs. We therefore tested MSC cell fate potential in the cardiac PW1⁺ population, compared directly the outcomes with bone marrow (BM)-derived

MSCs (21) (Online Figure 3). Following exposure to conditions that stimulate specific MSC lineages (Figure 2I), we found that PW1⁺ cells can differentiate into Oil Red O⁺ adipocytes, alkaline phosphatase⁺ osteoblasts, and Alcian blue⁺ chondrocytes after 2-3 weeks in culture (Figures 2J to 2M). Taken together, these data suggested that cardiac PW1⁺ cells constitute an adult cardiac stem cell population with colony-forming potential, able to give rise to multiple cardiovascular and mesenchymal lineages.

TRANSCRIPTOMIC PROFILING OF PW1⁺ CELLS. To better characterize the cardiac PW1⁺ cells, we performed an RNA sequencing-based profile of cardiac PW1⁺ cells isolated from normal left ventricle, comparing these results with mouse embryonic stem cells (mESCs), BM-MSCs, and CMs. Principal component analysis coupled with hierarchical clustering revealed that cardiac PW1⁺ cells are distinct from BM-MSCs, mESCs, and CMs (Figures 3A and 3B). Functional enrichment analysis of 100 genes (Figure 3C, Online Table 1) that contributed the most to discriminate PW1⁺ cells from other cell types (third principal component shown on axis 3 in Figure 3A) identified a significant enrichment of genes involved in developmental processes including 21 in tissue development ($p = 0.0007$) and 10 in skeletal muscle development ($p = 0.04$) (Figure 3C) compared with the other cell types tested (axis 3; Figure 3A). These latter 10 genes were *Fgfr1*, *Has2*, *Col27a1*, *Ext1*, *P3h1*, *Tiparp*, *Twist1*, *Csrnp1*, *Thbs3*, and *Sfrp2*, encoding for proteins with molecular functions such as receptor, catalytic, and signal transducer activities.

Because cardiac PW1⁺ cells showed a marked capacity to differentiate into fibroblasts in vitro, we used our transcriptomic datasets to assess a set of 21 genes encoding for collagen, extracellular matrix proteins, and growth factors typically expressed in cardiac fibroblasts. These pro-fibrotic genes were expressed at higher levels in PW1⁺ cells versus other studied cell types (Figure 3D). Overall, the expression of PW1 identified a population of resident cardiac cells bearing a molecular signature of cells that guide tissue development and remodeling.

PW1⁺ CELLS IN ISCHEMIC MYOCARDIUM. Using immunofluorescence staining on ischemic hearts from wild-type mice (1 week post-MI), we observed PW1⁺ cells in the infarcted area (Figure 4A), as seen in humans. We globally found a higher number of cells expressing PW1 in ischemic mice hearts, with a 3-fold increase in the total number of PW1⁺ cells in ischemic hearts compared with controls (Figure 4B). After inducing MIs on PW1^{nLacZ}-reporter mice and isolating C₁₂FDG⁺ cardiac cells by FACS 2 and 7 days post-MI,

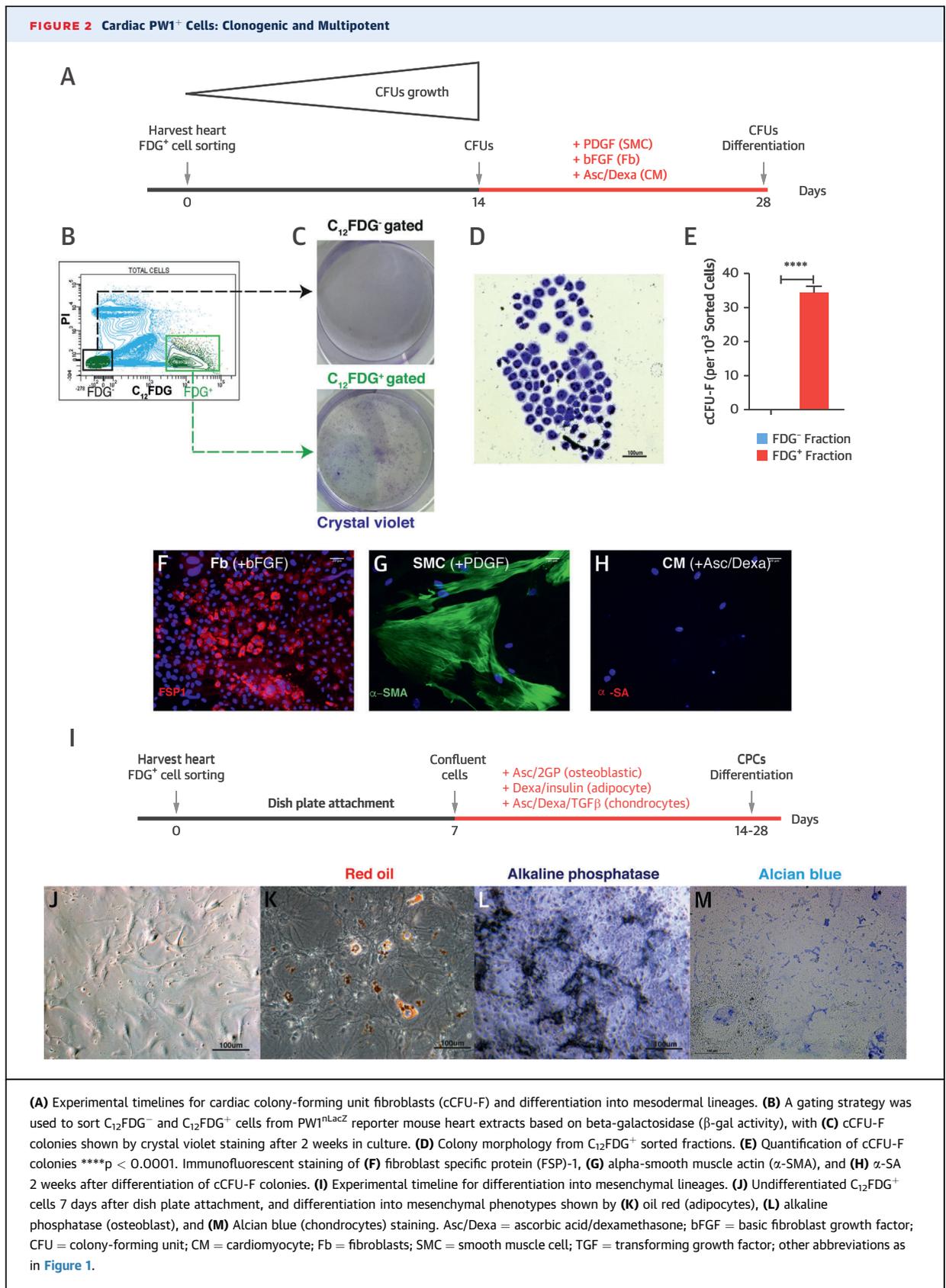
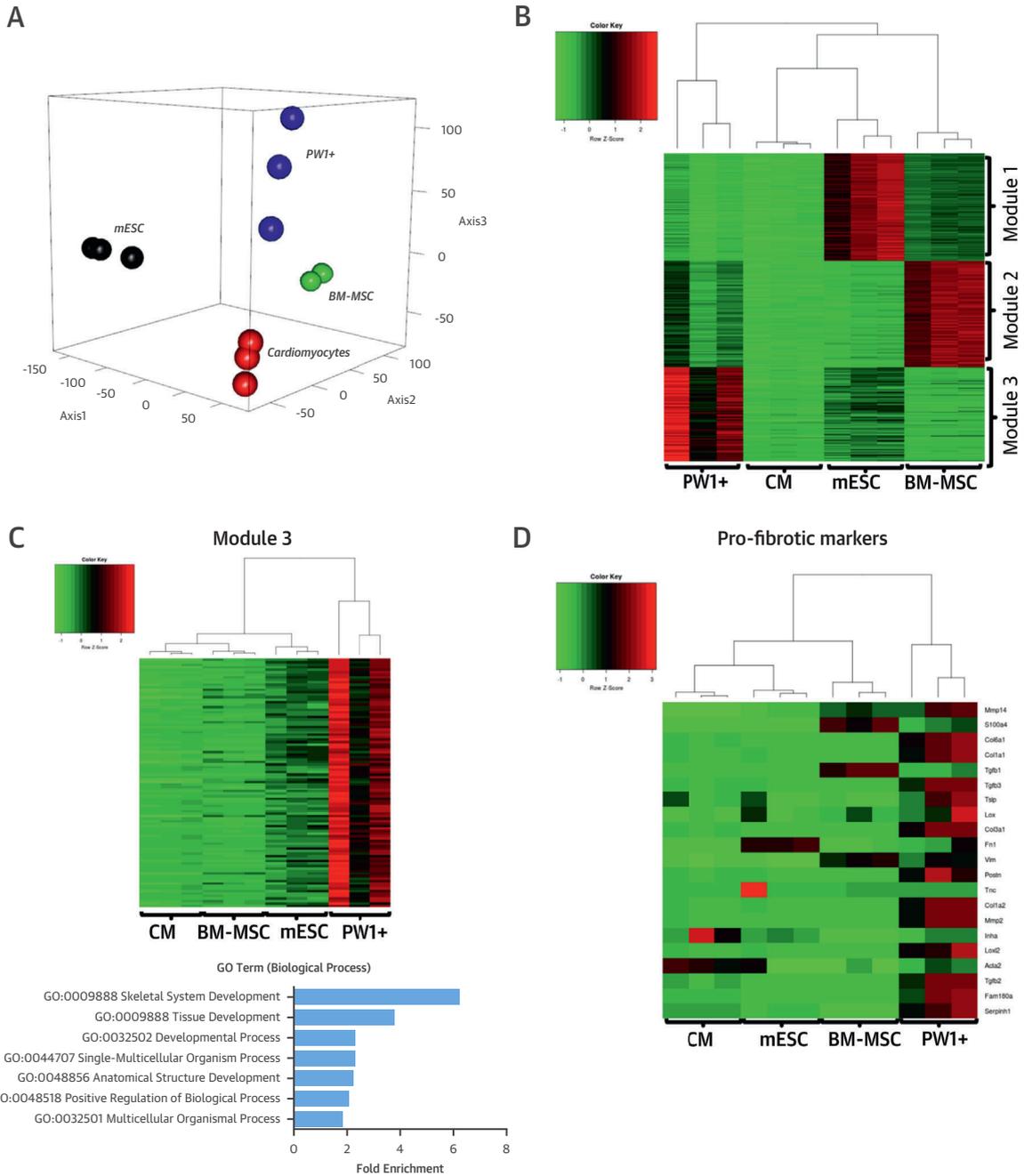


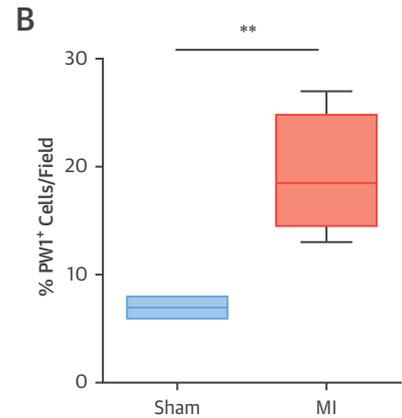
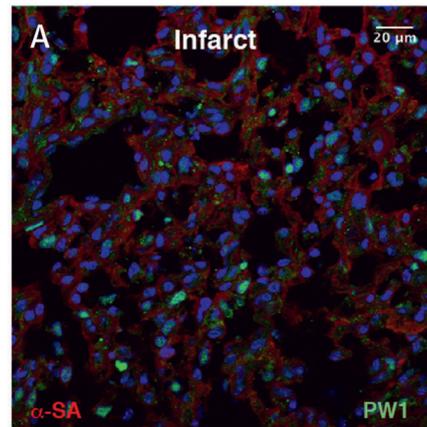
FIGURE 3 Transcriptomic Profiling of Cardiac PW1⁺ Cells



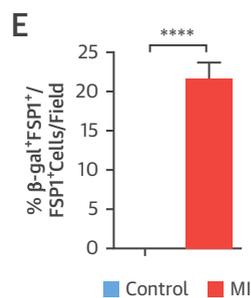
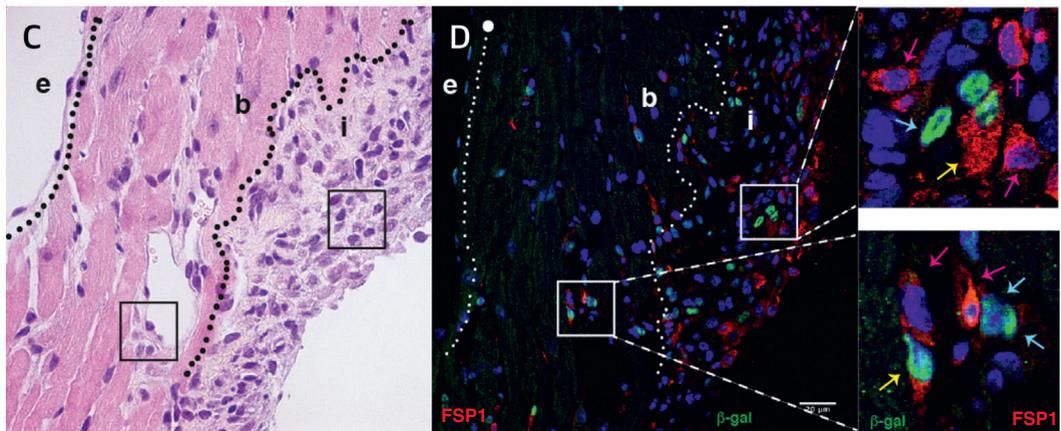
(A) Principal component (PC) analysis of gene expression profiling between cardiac PW1⁺ cells (blue), mouse embryonic stem cells (mESC) (black), bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSC) (green), and mouse isolated cardiomyocytes (red) (n = 3 per group). Data samples are visualized according to their coordinates onto the first 3 PCs (denominated as axis 1 to 3). **(B)** Hierarchical clustering showing specific profile of PW1⁺ cells using 300 genes corresponding to the 100 most prevalent genes from each PC. **(C)** Hierarchical clustering (upper panel) and gene ontology enrichment analysis (lower panel) on biological process for the 100 genes mostly expressed in module 3 (from axis 3). This axis best discriminated PW1⁺ cells and other cell types. **(D)** Hierarchical clustering for the expression of 21 pro-fibrotic candidate markers (Mmp14, S100A4, Col6a1, Col1a1, Tgfb1, Tgfb3, Tslp, Lox, Col3a1, Fn1, Vim, Postn, Tnc, Col1a2, Mmp2, Inha, Loxl2, Acta2, Tgfb2, Fam180a, Serpin1). Abbreviations as in Figure 2.

FIGURE 4 PW1⁺ Cells in the Ischemic Heart

Mouse MI model (day 7)



PW1-LacZ reporter mouse heart (day 7 after MI)



(A) Immunofluorescent staining of PW1 (green), α -SA (red), and DAPI (blue) on an infarct zone from wild-type mouse hearts 7 days post-MI. (B) Quantification of PW1-stained cells per field in sham versus post-MI mouse hearts. ** $p < 0.01$. Bright field image of an H&E section (C) and immunofluorescent staining (D) of β -gal (green) and FSP1 (red) (with high magnification) on an adjacent section from a PW1^{nLacZ} reporter mouse heart 7 days after MI. e = epicardium; b = border zone; i = infarct zone; light blue arrows = β -gal⁺/FSP1⁻ cells; red arrows = FSP1⁺ but β -gal⁻ cells; yellow arrows = cells that coexpress β -gal and FSP1. (E) Quantification of β -gal⁺ cells within the FSP1⁺ cells in sham and post-MI heart sections. **** $p < 0.0001$. Abbreviations as in Figures 1 and 2.

we found a progressive increase in the number of PW1⁺ cells that was significant and maximal 7 days after MI where these cells represented more than 10% of non-CMs (Online Figure 4). These estimates were concordant with those obtained using immunofluorescence staining, albeit slightly different as the PW1⁺ cells detection sensitivity might differ between the 2 approaches.

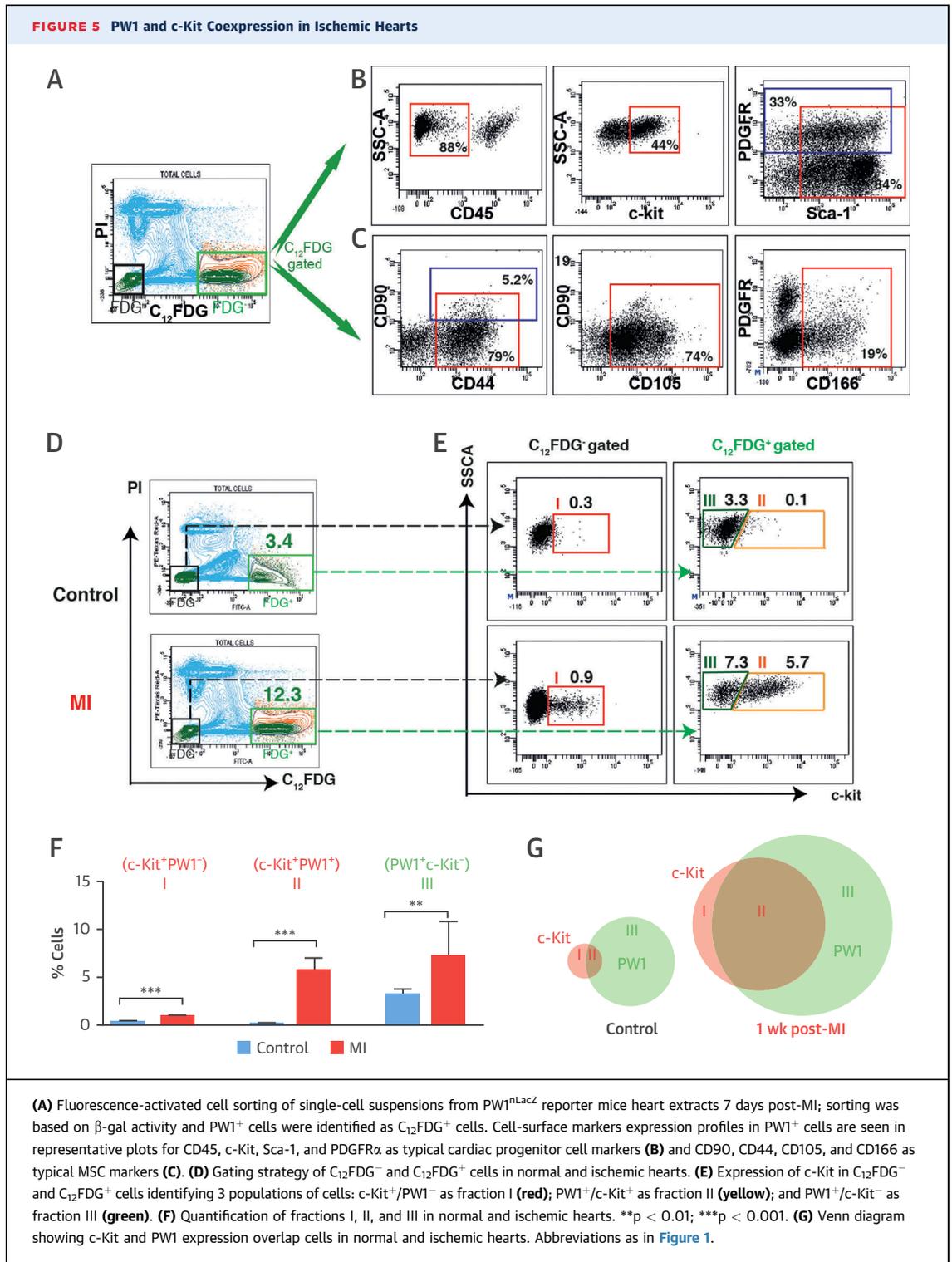
We next performed cell-cycle analysis and found that PW1⁺ cells showed a higher proliferative state after MI (Online Figures 5A to 5C). Whereas in non-ischemic myocardium FACS cell-cycle analysis showed that most PW1⁺ cells were quiescent, a higher proportion of PW1⁺ cells entered the cell cycle after MI ($0.3 \pm 0.1\%$ in sham vs. $1.0 \pm 0.2\%$ in MI in S phase [$p < 0.05$] and $2.5 \pm 0.1\%$ in sham vs. $4.2 \pm 0.5\%$ in MI in G2/M phase [$p < 0.05$]). Additionally, PW1⁺ cells in the infarct zone showed DNA synthesis as detected by bromodeoxyuridine incorporation (Online Figure 5D).

CARDIAC PW1⁺ CELLS FOLLOWING MI. Previous reports in other tissues have shown that PW1 is down-regulated during stem cell differentiations (20,22) and that the PW1^{nLacZ}-reporter mouse model allows for short-term lineage tracing of cells derived from β -gal⁺ cells (on the basis of the stability [produrance] of the β -gal reporter). FSP1 (encoded by *S100a4*), a fibroblast marker not expressed in CMs, has been shown to increase after MI (23-25). Indeed, we found a significant increase of *S100a4* expression in the infarcted and border areas of ischemic hearts versus sham hearts (Online Figure 6A). Because PW1⁺ cells displayed a fibrogenic cell fate in vitro, we examined β -gal activity and FSP1 expression in vivo following MI (Figures 4C and 4D). β -gal expression was detected in histological sections in the epicardium and interstitium and through the infarct and border zones of ischemic hearts from PW1^{nLacZ}-reporter mice (Figure 4D). Importantly, we detected numerous cells in the infarct and border zones that coexpressed β -gal and FSP1 (Figure 4D). These cells were in close vicinity to cells expressing only 1 of these markers, consistent with the scenario of differentiation of PW1⁺ cells into fibroblasts. Specifically, $21.4 \pm 2.2\%$ of FSP1⁺ cells were β -gal positive in the ischemic heart (Figure 4E). In contrast, no β -gal⁺/FSP1⁺ cells were detected in control hearts (Online Figure 7) or in β -gal⁺ cells in the epicardium of ischemic hearts. Reciprocally, we found an increase in the expression of *S100a4* in PW1⁺ cells sorted from ischemic hearts 7 days after MI as compared with sham heart (Online Figure 6B).

CELLS COEXPRESSING PW1 AND C-KIT FOLLOWING MI. Our data in normal hearts showed that PW1⁺ cells expressed multiple CPC and MSC markers, leading us

to analyze expression of these markers in C₁₂FDG⁺ cells isolated from hearts 1 week post-MI. As compared with controls (Figures 1K and 1L), we observed an increase in Sca-1 and CD44 expression and a decrease in CD90 and CD105 expression; expression of other markers remained stable (Figures 5A to 5C). The expression of c-Kit was the most markedly changed in C₁₂FDG⁺ cells after MI (Figure 5B). We therefore investigated PW1 and c-Kit coexpression in C₁₂FDG⁻ cells and C₁₂FDG⁺ cells from PW1^{nLacZ}-reporter mouse in normal and ischemic hearts. There was a 3-fold increase in the C₁₂FDG⁺ population following MI compared to controls ($12.3 \pm 2.0\%$ of non-CMs in MI vs. $3.4 \pm 0.4\%$ in controls; $p < 0.01$) (Figure 5D). By gating the cells for C₁₂FDG and c-Kit expression, we defined 3 populations according to PW1 and c-Kit expression (Figure 5E). Fraction I corresponded to c-Kit⁺/PW1⁻ cells and represented $0.3 \pm 0.1\%$ of nonmyocytes cells in normal hearts versus $0.9 \pm 0.1\%$ in ischemic hearts ($p < 0.001$). Fraction II was defined as cells coexpressing both markers (PW1⁺/c-Kit⁺); fraction III was defined as PW1⁺/c-Kit⁻ cells. Although PW1 and c-Kit expression were nearly mutually exclusive in cells isolated from normal hearts, there was a cell population coexpressing both c-Kit and PW1 (fraction II) following MI (57-fold increase for fraction II [$0.1 \pm 0.0\%$ in control vs. $5.7 \pm 1.2\%$ in MI; $p < 0.001$] and 2-fold increase in fraction III [$3.3 \pm 0.4\%$ in control vs. $7.3 \pm 3.5\%$ in MI; $p < 0.01$]) (Figures 5E and 5F). Therefore, although PW1⁺/c-Kit⁻ cells were the most abundant fraction in normal hearts, a large proportion of PW1⁺/c-Kit⁺ cells appeared following MI (Figure 5G).

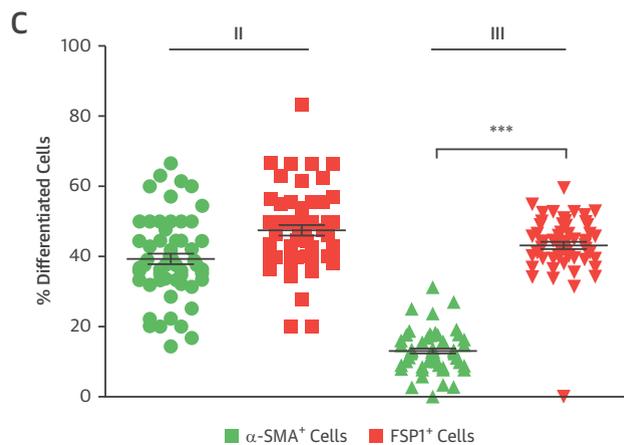
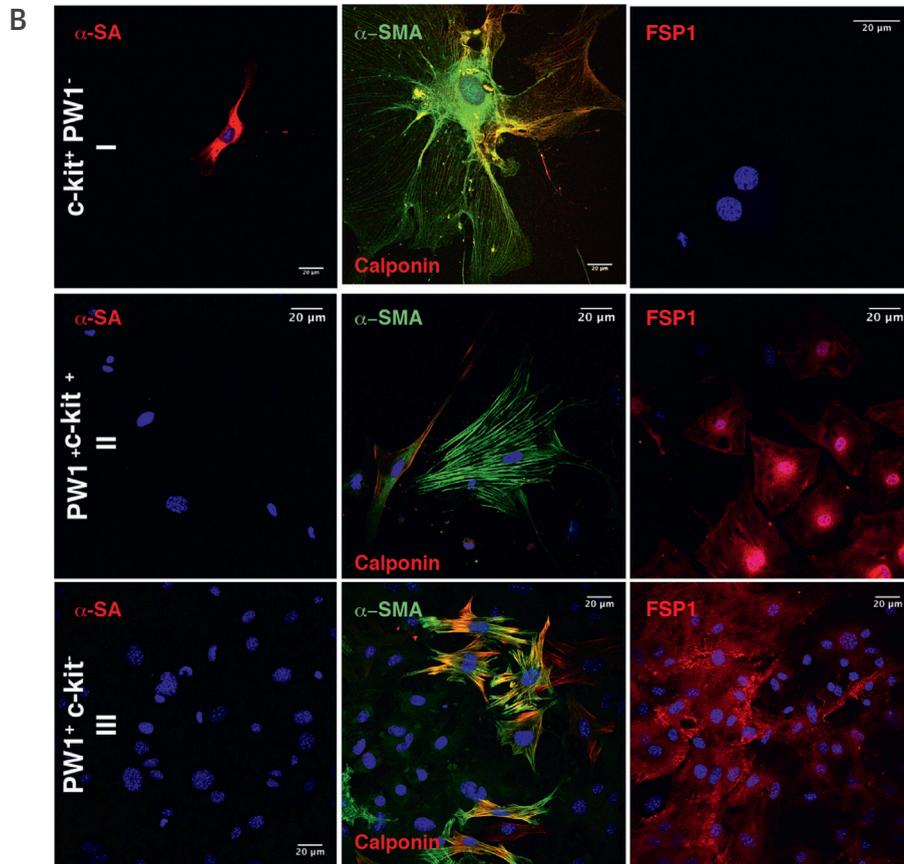
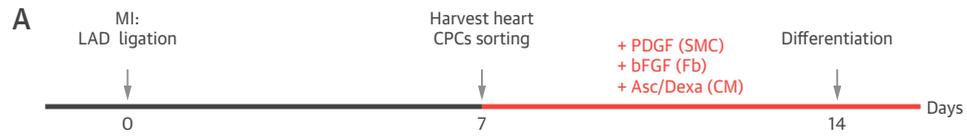
PW1 EXPRESSION AND DIFFERENTIATION CAPACITY OF C-KIT⁺ CELLS. The ability of isolated cardiac-derived PW1-expressing cells to differentiate in vitro into several cardiac lineages led us to test the potential of the fractions to give rise to CM-, smooth muscle-, and fibroblast-like cells. After 1 week in culture under the same stimulatory factors (Figure 6A), only fraction I (c-Kit⁺/PW1⁻) generated alpha-sarcomeric actinin-expressing cells, suggesting a lack of cardiomyocyte differentiation capacity in cells expressing PW1 (Figure 6B). The 3 fractions showed potential to generate SMC-like cells as indicated by the presence of α -SMA⁺-expressing cells derived from all fractions (Figure 6B). In contrast, fibroblast-like cells identified by FSP1 expression were obtained from fractions II and III, but not fraction I. While no differences were detected in the proportion of generated fibroblasts between fractions II and III ($45.1 \pm 1.7\%$ vs. $44.5 \pm 1.5\%$, respectively;



$p = \text{NS}$), a higher proportion of α -SMA⁺ cells were generated from fraction II cells (expressing both PW1 and c-Kit) versus fraction III cells expressing PW1 only ($38.0 \pm 1.9\%$ vs. $13.0 \pm 1.2\%$, respectively;

$p < 0.001$) (Figure 6C). These data suggested that PW1-expressing cells display a pronounced fibrogenic potential. Compared with the small proportion of c-Kit⁺/PW1⁻ cells that showed cardiogenic potential,

FIGURE 6 Differentiation Capacity According to PW1 ± c-Kit Expression



(A) Timelines for MI in PW1^{lacZ} reporter mice, isolation of PW1 ± c-Kit cells, and in vitro differentiation assays into mesodermal lineages. Sorted cells were maintained 7 days in culture with different stimulatory factors. LAD = left anterior descending coronary artery. **(B)** Typical pictures showing immunofluorescent staining of α-SA, α-SMA, and calponin, and FSP1 in c-Kit⁺/PW1⁻ (I, upper panels), PW1⁺/c-Kit⁺ (II, center panels), and PW1⁺/c-Kit⁻ (III, lower panels) populations. **(C)** Graphs of percentage conversion to α-SMA⁺ and FSP1⁺ cells in fractions II versus III relative to total number of cells. ***p < 0.001. Abbreviations as in Figures 1 and 2.

the abundant fraction of PW1⁺/c-Kit⁺ in post-MI hearts adopted a fibrogenic fate.

DISCUSSION

Our results support that PW1 expression identifies a resident cardiac endogenous stem cell population (**Central Illustration**). In healthy tissue, the cardiac PW1 stem cell population was distinct from previously reported cardiac progenitor populations, as shown by a partial overlap of typical stem cell marker expression (including Sca-1, PDGFR α , and c-Kit), presented a predominant epicardial and interstitial localization, had colony-forming capacity, and possessed multilineage differentiation capability in vitro. Our data further supported that PW1 identified an adult CSC population that preferentially generated matrix-forming stromal cells as shown by high expression of pro-fibrotic genes and by differentiation into fibroblasts both in vitro and in vivo as shown by cell fate-tracing experiments in ischemic hearts (**Central Illustration**). This result also fits with the presence of PW1⁺ cells in the infarct zones of human ischemic hearts, an area that experiences the most intense fibrotic remodeling after MI. Furthermore, PW1⁺ colonies did not give rise to cardiomyocytes in vitro. Finally, we found that PW1 and c-Kit expression were almost mutually exclusive in cells isolated from normal hearts but that a marked increase occurred in a cell population coexpressing both markers following MI. Strikingly, the c-Kit⁺/PW1⁻ cells showed cardiogenic potential but represent a minor proportion of the total c-Kit cells. Conversely, c-Kit⁺/PW1⁺ cells were much more abundant in ischemic hearts and did not generate CMs but gave rise to fibroblast-like cells.

Our data extended the recent finding that PW1 is a pan-stem cell marker in adult tissues (13,14,19,22) and suggested that PW1 indicates a CSC population different from previously reported CPCs. The cardiac PW1⁺ cells showed expression of mouse MSC surface markers (such as presence of CD90, CD44, CD105, and PDGFR α , and absence of CD45), and can differentiate into typical MSC lineages, therefore reaching the commonly used definition of MSC (26). MSC-like cardiac progenitor cells have previously been reported in the adult heart (11). These cells were mainly characterized by PDGFR α expression, a marker that only partially overlaps with PW1 expression in both healthy and ischemic hearts. Derived from pro-epicardial progenitors, these MSCs are usually found in the epicardium and the adjacent myocardial interstitium, locations where cardiac PW1⁺ cells were also found in healthy hearts. However, the

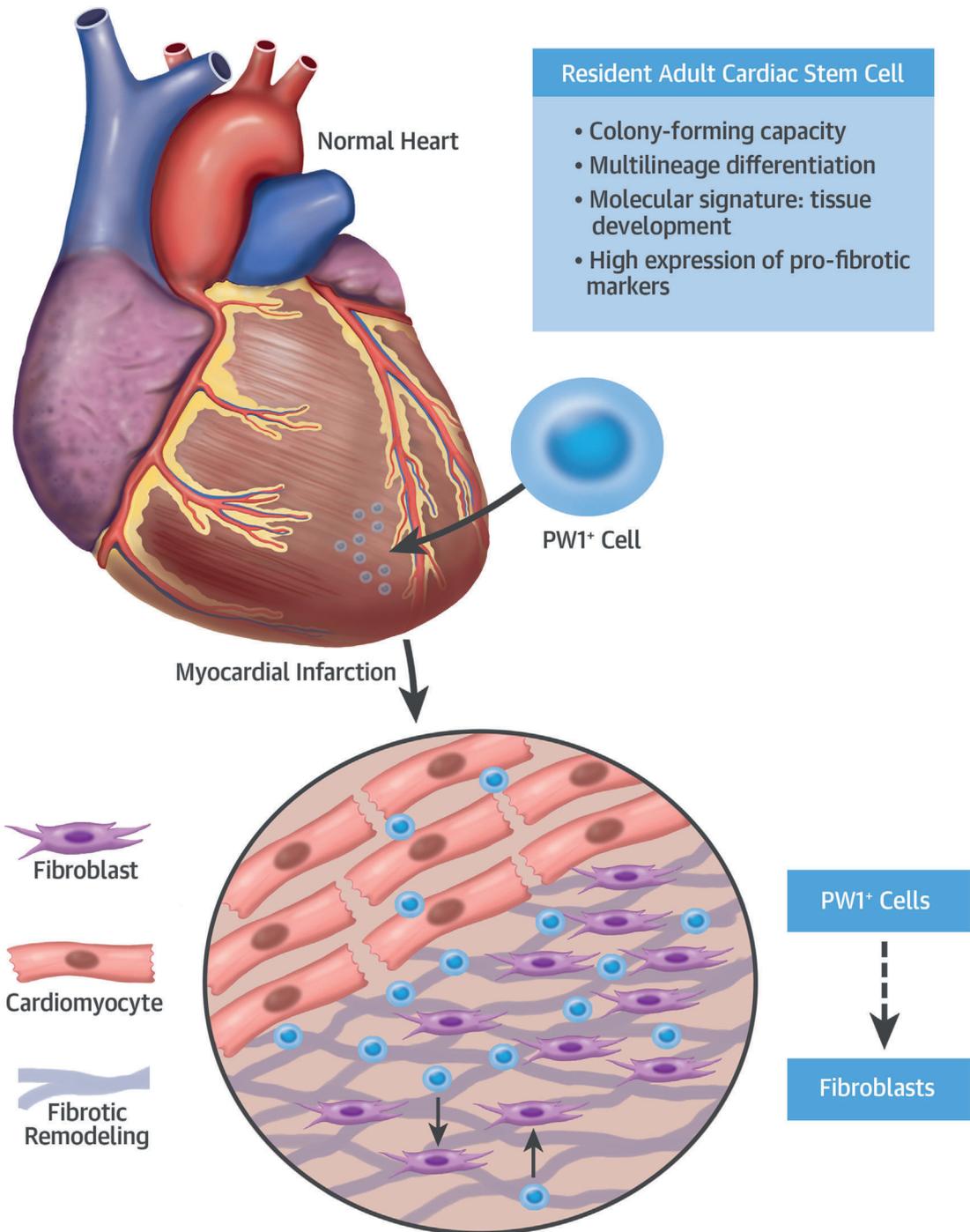
transcriptome profile of PW1⁺ cells isolated from healthy hearts showed significant differences with the 1 from BM-MSCs, the putative cell origin of solid organ MSCs (27). Interestingly, our transcriptomic analyses identified a higher expression of a set of genes involved in tissue and skeletal muscle development in PW1⁺ cells compared with mESCs, BM-MSCs, or CMs. This aligned with previous reports of PW1⁺ cells as skeletal muscle resident progenitors (20). However, in our experiments, we found that the cardiac PW1⁺ cells lacked cardiogenic potential, a capacity reported in MSCs (28).

Alternatively, resident MSCs have been proposed as a source of scar-forming myofibroblasts in heart fibrosis after MI (29). Interestingly, in this latter study, resident MSCs were identified as CD44⁺CD45⁻ and were shown to accumulate in the infarct, expressing both stem cell and canonical stem cell fibroblast markers. Whether these cells express PW1 was not determined. More recently, another type of MSC-like cells identified by Gli1 expression has been reported as a source of myofibroblasts that play a central role in organ fibrosis after injury, including after MI (30). Taken together, these data indicate that resident MSCs represent a heterogeneous cell population that can be divided into subpopulations. It is likely that cardiac PW1⁺ cells represent a distinct pool of MSC-like cells, but further experiments are needed to understand the level of overlap among these different MSC-like cell fractions.

The observations reported here were consistent with the proposal that resident MSC-like cells contribute to the adaptive pathophysiological response to tissue injury (31). We found that a substantial fraction (~20%) of FSP1⁺ cells originated from PW1⁺ cells in ischemic hearts. Reciprocally, we found an increase in the expression of *S100a4* (encoding for FSP1) in PW1⁺ cells from ischemic hearts as well as a high expression of pro-fibrotic markers (including collagen genes *Col1a1*, *Col1a2*, *Col6a1*, and metalloproteinases) in PW1⁺ cells from normal hearts. Therefore, our data did not contradict the existence of other mechanisms such as endothelial-to-mesenchymal transition (24) or a direct contribution of resident stromal cells (32) but rather proposed an additional source of fibroblasts in cardiac fibrosis. We recently reported that resident lung PW1⁺ cells participate in the neomuscularization of pulmonary arteries in a mouse experimental model of pulmonary hypertension (19), providing another example of the involvement of resident PW1⁺ cells in pathological remodeling.

We observed that post-MI, PW1⁺ cells accumulated in the infarct and border zones of ischemic hearts.

CENTRAL ILLUSTRATION Cardiac PW1⁺ Adult Stem Cells



Yaniz-Galende, E. et al. *J Am Coll Cardiol.* 2017;70(6):728-41.

Cardiac PW1⁺ cells naturally reside in the myocardium and have stem cell characteristics, including clonogenicity and multipotent differentiation potential. After myocardial infarction, cardiac PW1⁺ cells localize in the infarct area, where they give rise to fibroblast-like cells.

This increase in PW1⁺ cells was associated with an increase in their proliferative state. Most cardiac PW1⁺ cells were CD45⁻, suggesting a local mobilization of resident cardiac PW1⁺ cells, but we cannot rule out circulating cell recruitment. However, the existence of PW1⁺ circulating cells has not been reported thus far and previous BM transplant experiments did not show a significant recruitment of circulating cells to support the role of PW1⁺ cells in pulmonary artery neomuscularization (19). Another possibility might be that PW1⁺ cells arise de novo from PW1⁻ cells involved in post-MI healing. Previous studies have revealed that ischemic injury leads to the proliferation and migration of epicardial-derived cells into the damaged myocardium (5). PW1 expression has been shown to increase in response to several stress stimuli, including hypoxia, in different organs (19,33,34). However, PW1⁺ cells isolated from post-MI hearts displayed similar characteristics to PW1⁺ cells isolated from healthy hearts, including a similar expression of cell surface markers and differentiation potential into nonmyocyte mesodermal lineages.

Finally, our data supported the recent proposal that at least 2 populations of cardiac cells express c-Kit (35), a key marker for resident cardiac cells with cardiomyogenic capacity (7,8); however, recent lineage-tracing experiments showed a largely vasculogenic and adventitial lineage predisposition (9,10). During development, c-Kit is expressed in early first heart field progenitors that give rise exclusively to CMs and SMCs. However, the reminiscence of these cardiogenic progenitors in the adult heart is uncertain. Different studies have shown c-Kit expression localized to the proepicardial progenitors that also express MSC-associated markers that have mesodermal lineage differentiation potential. Our results showed that c-Kit⁺ cells isolated from ischemic hearts can be separated based upon PW1 expression. After MI, a large majority of c-Kit⁺ cells express PW1 (constituting ~5.7% of the total non-CM pool of ischemic hearts). As opposed to the few c-Kit⁺ cells that do not express PW1 (quantified as ~0.9% of nonmyocyte cardiac cells after MI), the PW1⁺/c-Kit⁺ cells were unable to generate CMs. Rather, these cells displayed differentiation potential into SMCs and fibroblasts. These data therefore supported that most c-Kit⁺ cells are unable to generate cardiomyocytes and display MSC-like characteristics as seen in cardiac PW1⁺ cells. Conversely, the c-Kit⁺ cells not expressing PW1, as identified in this study, might represent a CPC population. Intriguingly, our results further

suggested a gradient in myogenic potential following c-Kit expression because PW1⁺/c-Kit⁻ cells displayed a lower capacity to generate SMCs compared with PW1⁺/c-Kit⁺ cells. Further experiments, such as transcriptomic profiling, will be needed to understand the underlying molecular mechanisms explaining the loss of cardiogenic potential in c-Kit⁺ cells expressing PW1.

STUDY LIMITATIONS. This study did not explore the angiogenic potential of cardiac PW1⁺ cells. Whether PW1⁺ cells can also contribute to vessel formation deserves further investigation. Additionally, we explored cardiac PW1⁺ cells in a murine MI model with permanent occlusion of the coronary artery but not in the context of myocardial ischemia-reperfusion injury.

CONCLUSIONS

Taken together, these data demonstrated the existence of a population of resident adult cardiac stem cells expressing PW1⁺ and their involvement in fibrotic remodeling after MI. Our results also supported the existence of PW1⁺ cells in human ischemic hearts. Whether these cells could represent a source of new therapeutic strategies for ischemic HF deserves further investigation.

ACKNOWLEDGMENT RNA sequencing was performed with the help of Plateforme P3S at Sorbonne Universités, Paris, France.

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE: Dr. Jean-Sébastien Hulot, UMR_S 1166 ICAN Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, 3ème étage, 91 Boulevard de l'hôpital, 75013 Paris, France. E-mail: jean-sebastien.hulot@aphp.fr.

PERSPECTIVES

COMPETENCY IN MEDICAL KNOWLEDGE: In patients with myocardial infarction, defunct cardiac myocytes are progressively replaced by fibrous, noncontractile tissue. Resident adult stem cells expressing PW1⁺ are involved in fibrotic remodeling and may play a role in muscle repair and recovery of myocardial contractile function.

TRANSLATIONAL OUTLOOK: Targeting adult cardiac stem cells expressing PW1 could represent a therapeutic opportunity to limit adverse myocardial remodeling after myocardial infarction.

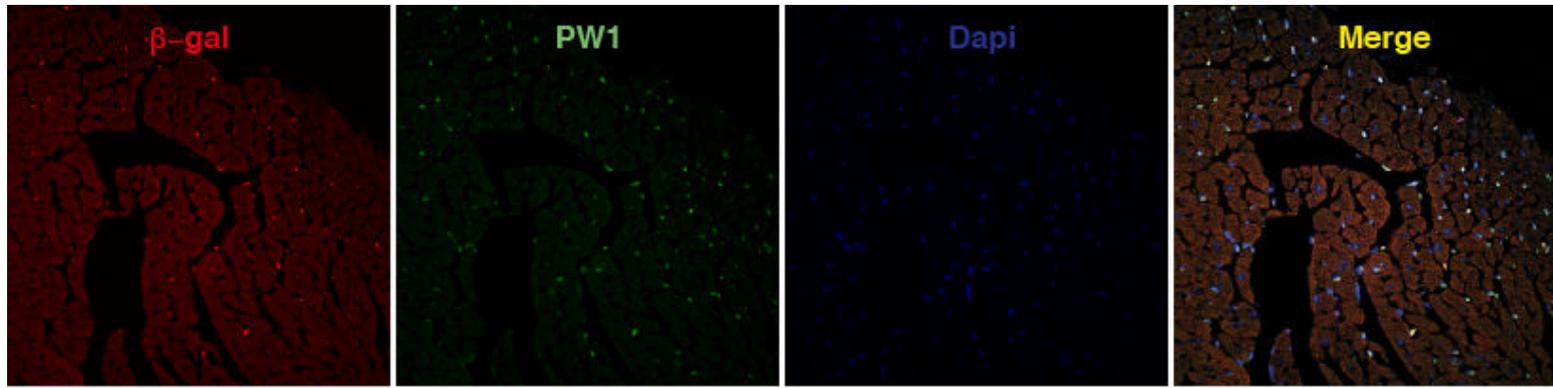
REFERENCES

1. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics—2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2012;125:e2-220.
2. Seferovic PM, Stoerk S, Filippatos G, et al. Organization of heart failure management in European Society of Cardiology member countries: survey of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology in collaboration with the Heart Failure National Societies/Working Groups. *Eur J Heart Fail* 2013;15:947-59.
3. Maggioni AP, Dahlstrom U, Filippatos G, et al. EURObservational Research Programme: regional differences and 1-year follow-up results of the Heart Failure Pilot Survey (ESC-HF Pilot). *Eur J Heart Fail* 2013;15:808-17.
4. Martin-Puig S, Wang Z, Chien KR. Lives of a heart cell: tracing the origins of cardiac progenitors. *Cell Stem Cell* 2008;2:320-31.
5. Smart N, Bollini S, Dube KN, et al. De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature* 2011;474:640-4.
6. Lin Z, Pu WT. Strategies for cardiac regeneration and repair. *Sci Transl Med* 2014;6:239rv1.
7. Ellison GM, Vicinanza C, Smith AJ, et al. Adult c-kit(pos) cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair. *Cell* 2013;154:827-42.
8. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114:763-76.
9. van Berlo JH, Kanisicak O, Maillat M, et al. c-kit+ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. *Nature* 2014;509:337-41.
10. Sultana N, Zhang L, Yan J, et al. Resident c-kit(+) cells in the heart are not cardiac stem cells. *Nat Commun* 2015;6:8701.
11. Chong JJ, Chandrakanthan V, Xaymardan M, et al. Adult cardiac-resident MSC-like stem cells with a proepicardial origin. *Cell Stem Cell* 2011;9:527-40.
12. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:12313-8.
13. Mitchell KJ, Pannerec A, Cadot B, et al. Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nat Cell Biol* 2010;12:257-66.
14. Besson V, Smeriglio P, Wegener A, et al. PW1 gene/paternally expressed gene 3 (PW1/Peg3) identifies multiple adult stem and progenitor cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:11470-5.
15. Chen C, Khaleel SS, Huang H, Wu CH. Software for pre-processing Illumina next-generation sequencing short read sequences. *Source Code Biol Med* 2014;9:8.
16. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 2011;12:323.
17. Yates A, Akanni W, Amode MR, et al. Ensembl 2016. *Nucleic Acids Res* 2016;44:D710-6.
18. Pannerec A, Marazzi G, Sassoon D. Stem cells in the hood: the skeletal muscle niche. *Trends Mol Med* 2012;18:599-606.
19. Dierick F, Hery T, Hoareau-Coudert B, et al. Resident PW1+ progenitor cells participate in vascular remodeling during pulmonary arterial hypertension. *Circ Res* 2016;118:822-33.
20. Pannerec A, Formicola L, Besson V, Marazzi G, Sassoon DA. Defining skeletal muscle resident progenitors and their cell fate potentials. *Development* 2013;140:2879-91.
21. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 2010;466:829-34.
22. Besson V, Kyryachenko S, Janich P, Benitah SA, Marazzi G, Sassoon D. Expression analysis of the stem cell marker Pw1/Peg3 reveals a CD34 negative progenitor population in the hair follicle. *Stem Cells* 2017;35:1015-27.
23. Zeisberg EM, Kalluri R. Origins of cardiac fibroblasts. *Circ Res* 2010;107:1304-12.
24. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 2007;13:952-61.
25. Schneider M, Kostin S, Strom CC, et al. S100A4 is upregulated in injured myocardium and promotes growth and survival of cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 2007;75:40-50.
26. Park D, Spencer JA, Koh BI, et al. Endogenous bone marrow MSCs are dynamic, fate-restricted participants in bone maintenance and regeneration. *Cell Stem Cell* 2012;10:259-72.
27. Pelekanos RA, Li J, Gongora M, et al. Comprehensive transcriptome and immunophenotype analysis of renal and cardiac MSC-like populations supports strong congruence with bone marrow MSC despite maintenance of distinct identities. *Stem Cell Res* 2012;8:58-73.
28. Karantalis V, Hare JM. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circ Res* 2015;116:1413-30.
29. Carlson S, Trial J, Soeller C, Entman ML. Cardiac mesenchymal stem cells contribute to scar formation after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2011;91:99-107.
30. Kramann R, Schneider RK, DiRocco DP, et al. Perivascular Gli1+ progenitors are key contributors to injury-induced organ fibrosis. *Cell Stem Cell* 2015;16:51-66.
31. Kim J, Braun T. Targeting the cellular origin of organ fibrosis. *Cell Stem Cell* 2015;16:3-4.
32. Moore-Morris T, Guimaraes-Camboa N, Banerjee I, et al. Resident fibroblast lineages mediate pressure overload-induced cardiac fibrosis. *J Clin Invest* 2014;124:2921-34.
33. Yamaguchi A, Taniguchi M, Hori O, et al. Peg3/Pw1 is involved in p53-mediated cell death pathway in brain ischemia/hypoxia. *J Biol Chem* 2002;277:623-9.
34. Ebert SM, Monteys AM, Fox DK, et al. The transcription factor ATF4 promotes skeletal myofiber atrophy during fasting. *Mol Endocrinol* 2010;24:790-9.
35. Keith MC, Bolli R. "String theory" of c-kit(pos) cardiac cells: a new paradigm regarding the nature of these cells that may reconcile apparently discrepant results. *Circ Res* 2015;116:1216-30.

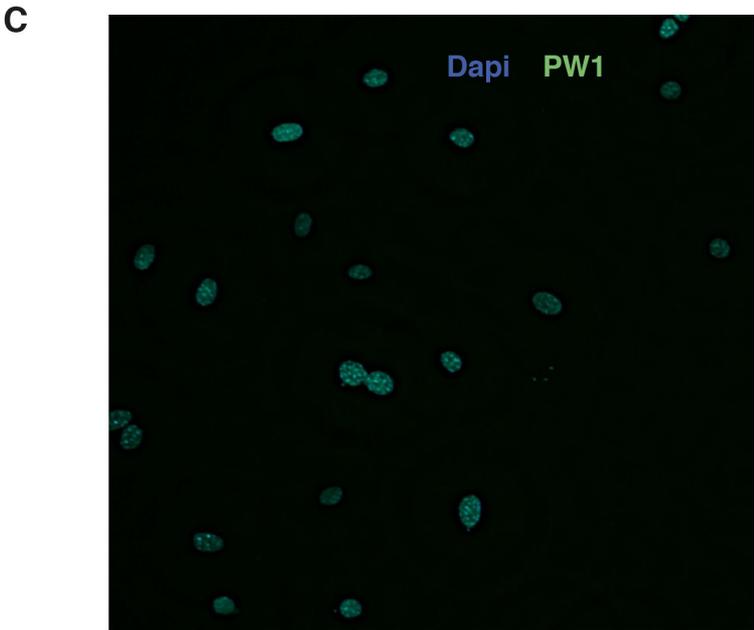
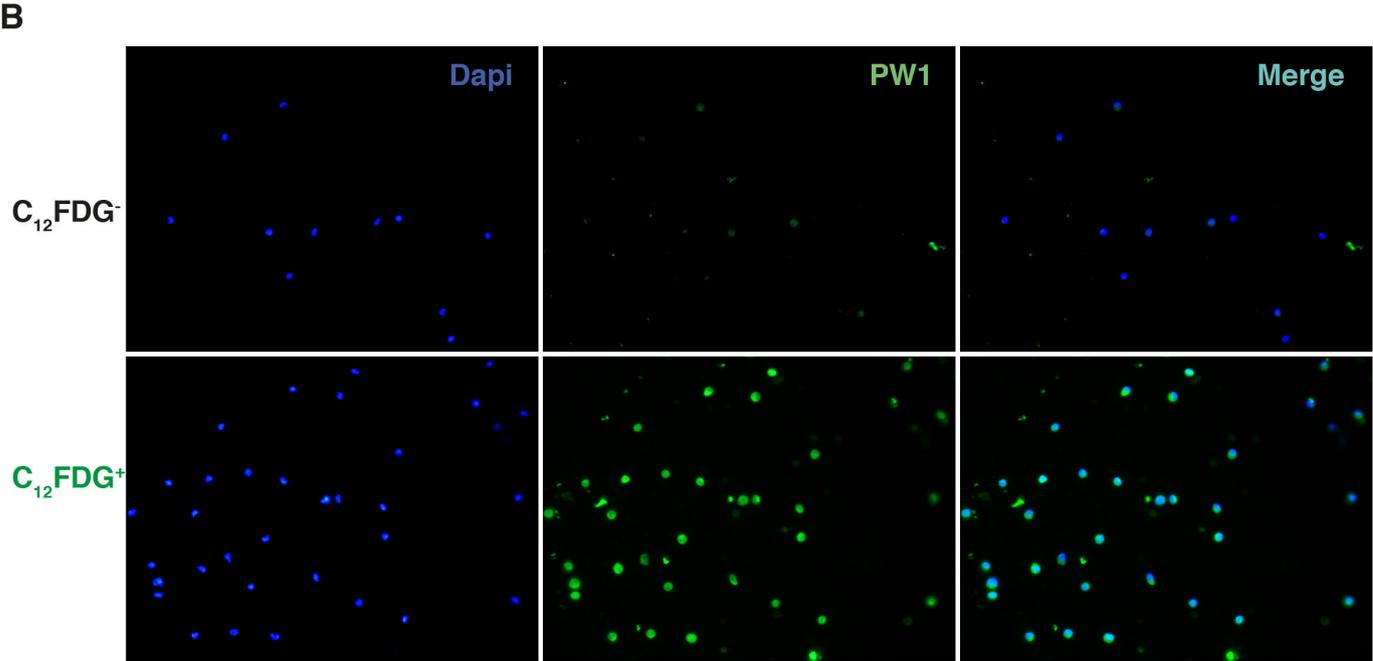
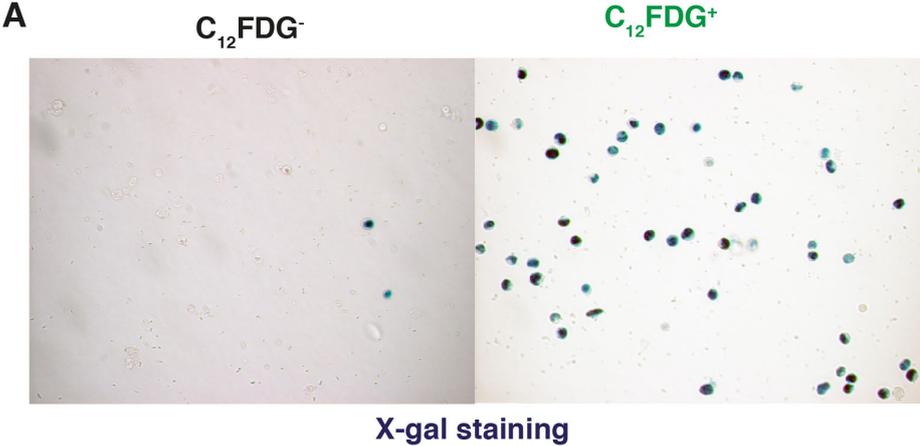
KEY WORDS cardiac stem cells, fibrosis, ischemic cardiomyopathy, myocardial infarction

APPENDIX For a supplemental Methods section as well as figures and tables, please see the online version of this article.

Supplemental figure 1

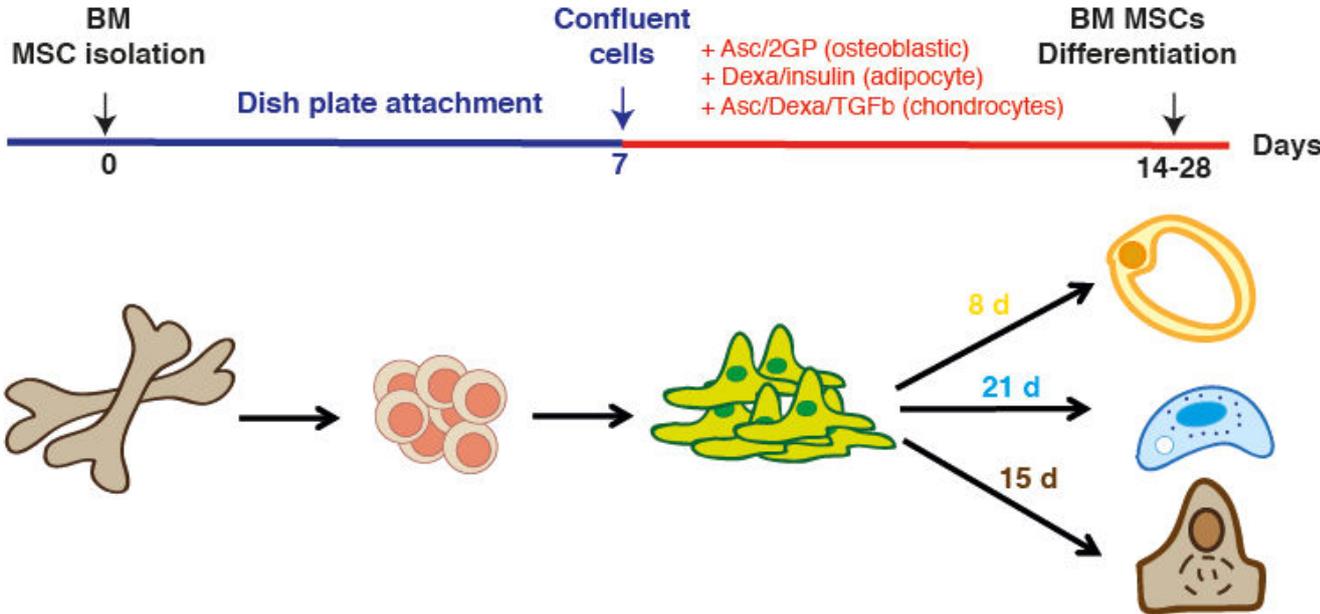


Supplemental figure 2

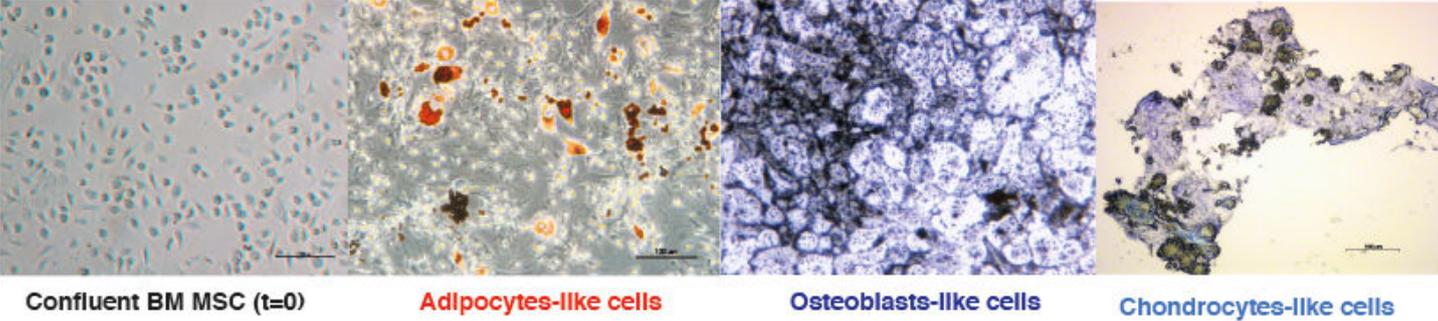


Supplemental figure 3

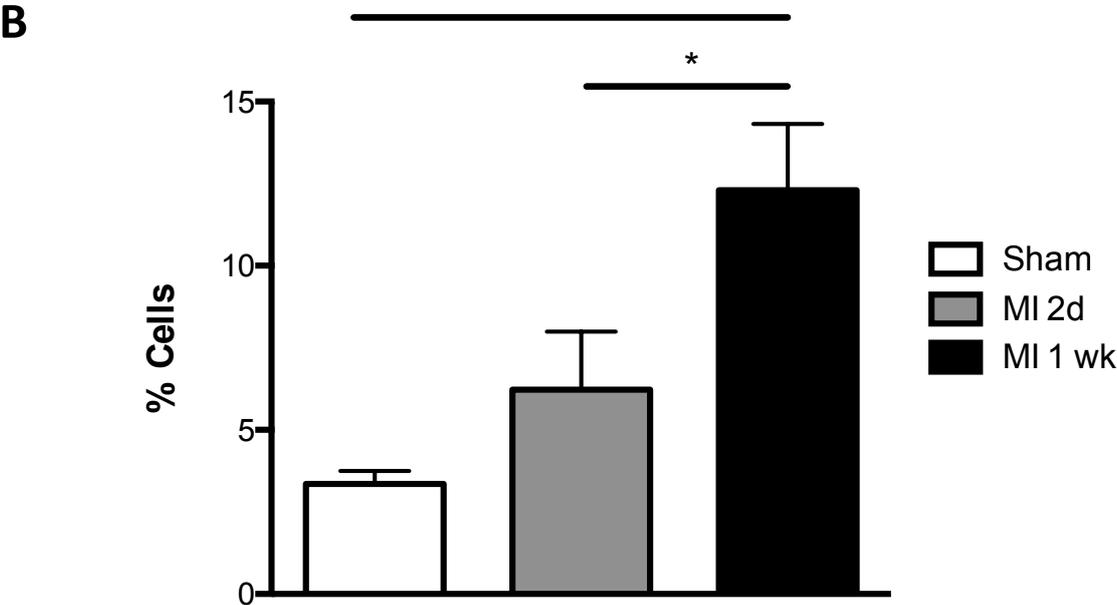
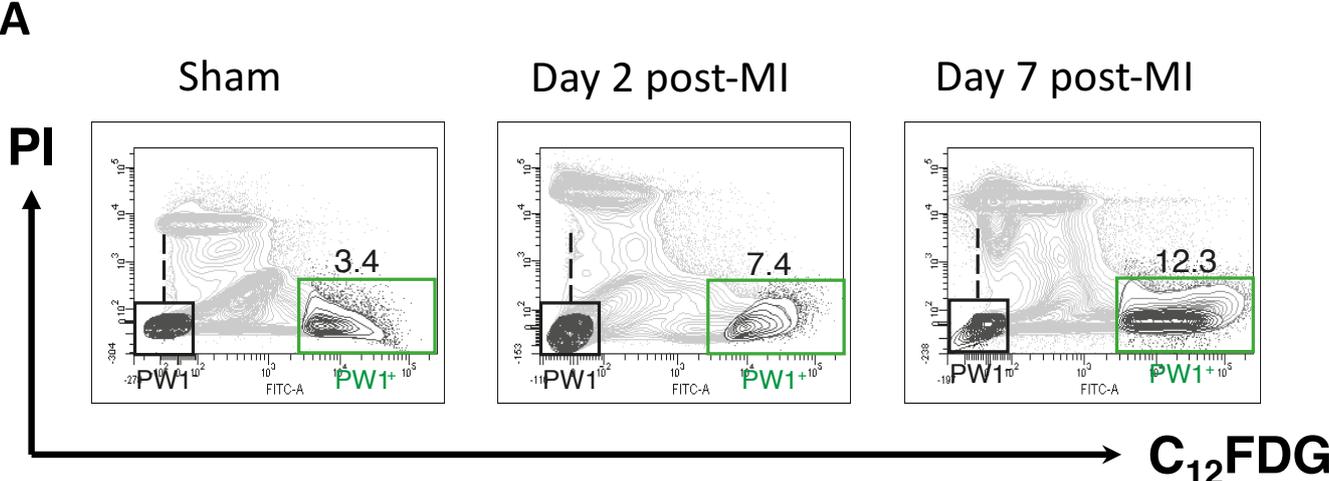
A



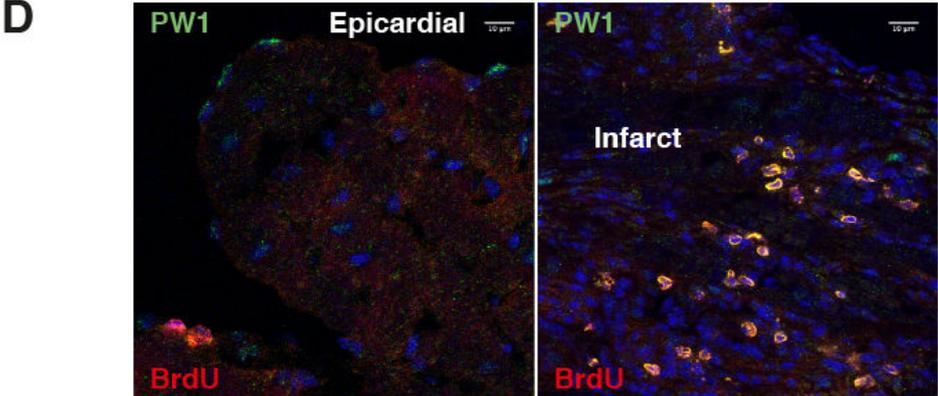
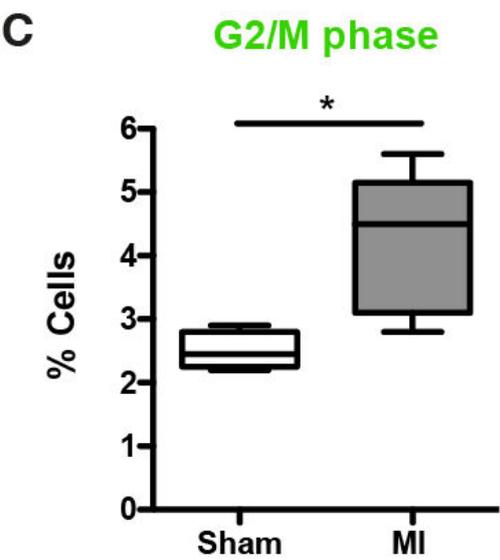
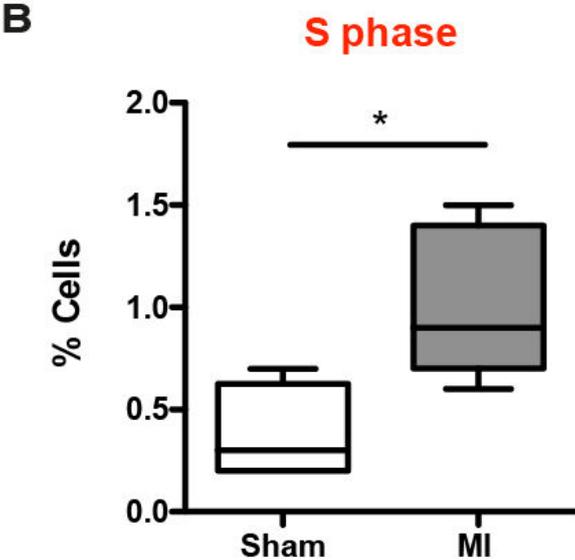
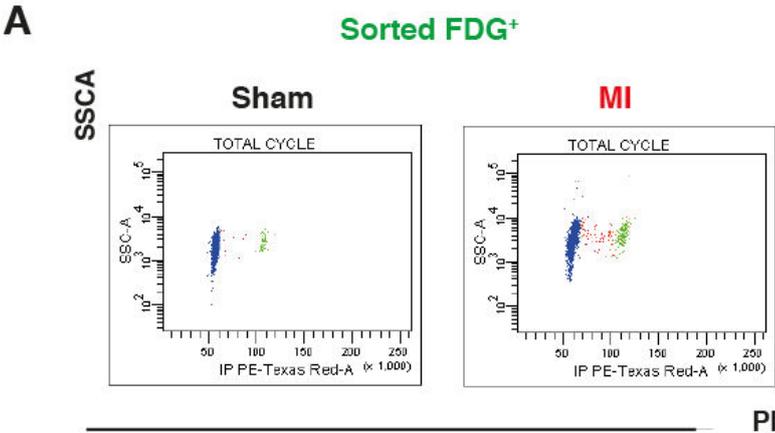
B



Supplemental figure 4

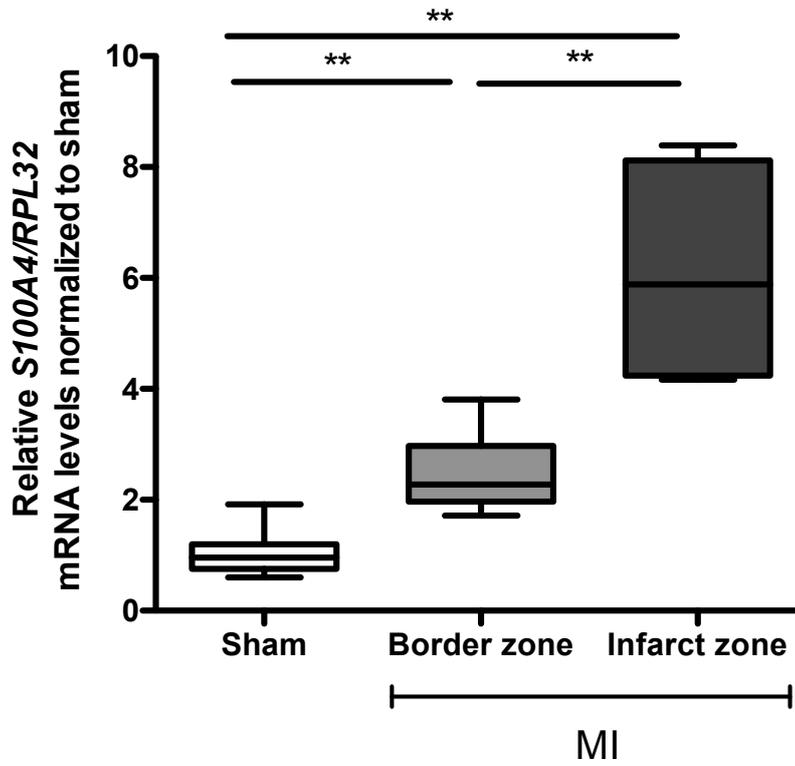


Supplemental figure 5

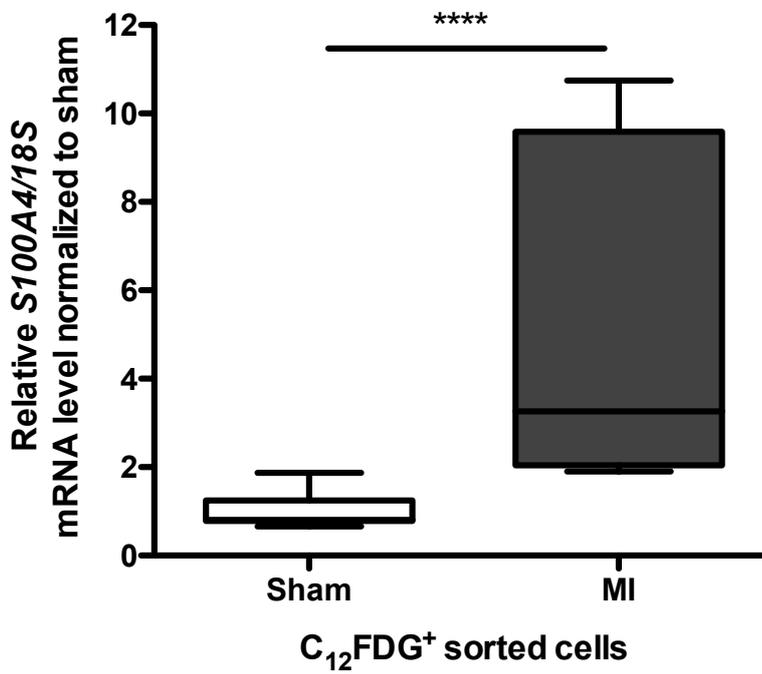


Supplemental figure 6

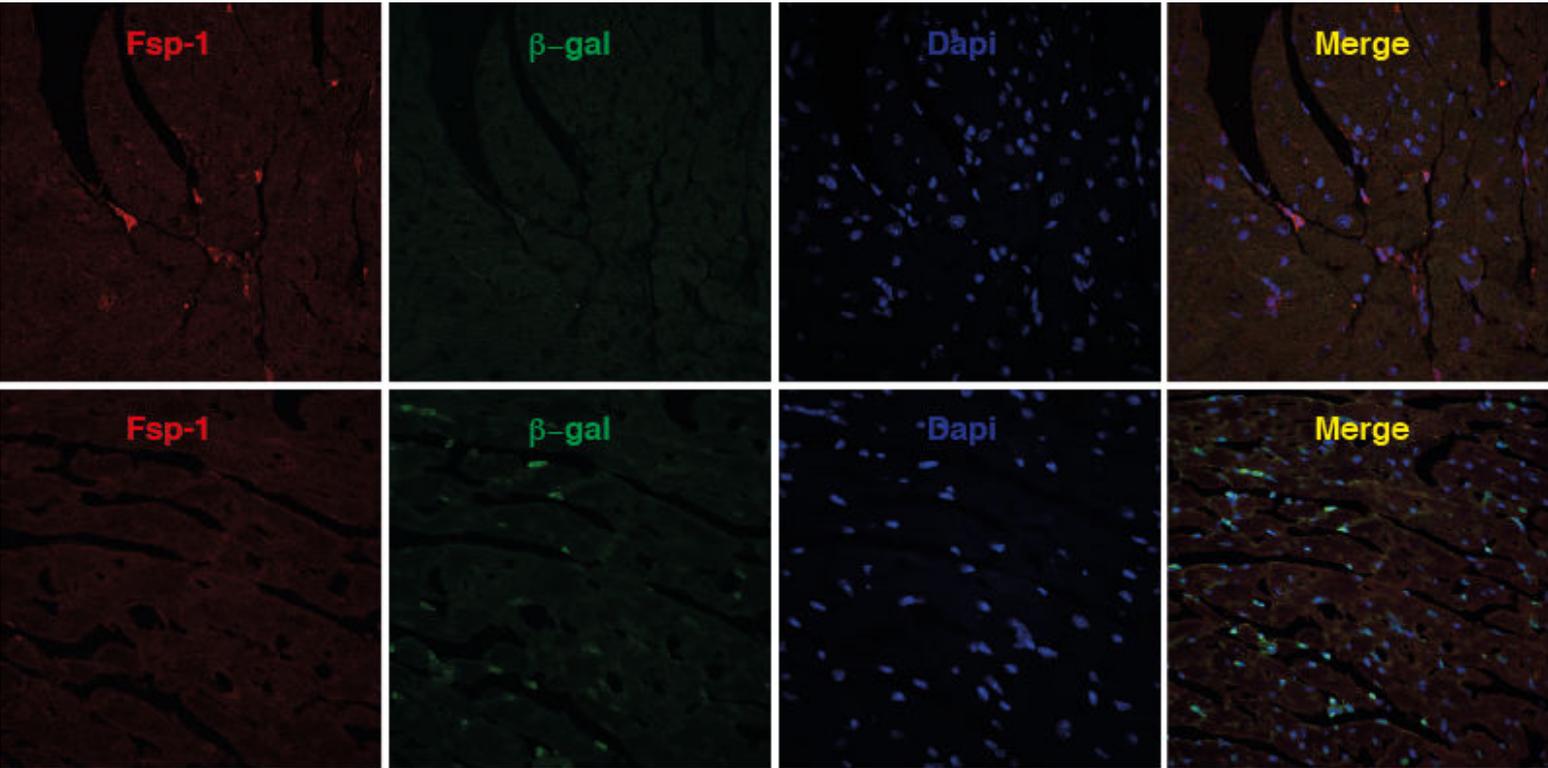
A



B



Supplemental figure 7



Objectifs de travail

- 1) Caractériser le membranome des cellules souches adultes cardiaques (CSC) exprimant PW1⁺
- 2) Déterminer une signature membranaire corrélée à la présence de PW1 dans les CSC
- 3) Explorer la possibilité d'une inhibition de ces cellules via un transducteur membranaire déterminé par l'étude du membranome.

Partie 3 : Définir un membranome reflétant l'expression de PW1

Notre stratégie initiale était (1) de caractériser le membranome des cellules cardiaques exprimant PW1 (qui est un facteur de transcription) afin d'identifier un marqueur fiable qui puisse être utilisé comme cible d'un anticorps couplé à un fluorophore pour isoler, trier et caractériser ces cellules par FACS et (2) d'analyser le rôle des marqueurs identifiés sur la fonction de ces cellules. La spectrométrie de masse est couramment utilisée pour détecter et analyser des mélanges complexes de protéines en haut débit. Cette technique permet d'identifier des protéines connues, mais également de découvrir de nouvelles protéines non référencées dans les bases de données. Cependant, il n'est pas simple de catégoriser l'appartenance d'une protéine nouvellement identifiée et de savoir si elle appartient plus spécifiquement à une sous-population cellulaire. Aussi, notre objectif a été de croiser ces résultats protéomiques avec des données transcriptomiques pour obtenir une double stratégie permettant l'identification sensible et spécifique de ces marqueurs. Cette seconde approche utilise les données de séquençage ARN à l'aide d'une suite bio-informatique spécifiquement conçue pour prédire le « membranome » des cellules étudiées, l'ensemble des protéines de la membrane plasmique d'une population cellulaire.

De plus, dans une autre étude, nous avons cherché à déterminer les molécules secrétées par les progéniteurs PW1 et C-kit et celles différemment exprimées au cours de l'hypoxie, en utilisant l'outil prédictif bio-informatique d'analyse des séquences ARN précédemment construit. Ceci correspond à un changement des paramètres pour prédire le « secrétome » à partir du séquençage ARN, puis à une comparaison des différences entre les secrétomes prédits des conditions physiologiques et pathologiques.

Identification de nouveaux marqueurs membranaires

Premiers tests protéomiques

Dans la première partie de ma thèse, j'ai commencé à travailler sur la mise en place de cette approche. Bien que la spectrométrie de masse soit utilisée de manière routinière pour l'analyse de mélanges complexes, il est difficile de passer d'une culture cellulaire à l'analyse en masse car de nombreux composés nécessaires à la croissance des cellules ne sont pas compatibles avec la technique ; les sels présents en grande quantités dans les milieux de culture en sont un exemple.

Par ailleurs, le nombre limité des cellules PW1⁺ dans les cœurs de souris (environ 50 000 cellules par cœur) rendait les conditions expérimentales difficiles. C'est pourquoi nous avons opté pour la technique de FACS pour isoler et trier les cellules d'intérêts. Malgré les conditions de stress qu'imposent cette technique, notamment le stress physique dû aux conditions environnementales, il s'agit de l'approche la plus fiable et la moins stressante pour les cellules qui permet un isolement de matériel cellulaire immédiatement après le tri.

Le maintien de ces cellules en culture représente un biais expérimental compte-tenu du changement phénotypique constaté lors des conditions d'amplification nécessaire à l'obtention d'un nombre suffisant de cellules pour la MS. En effet, ces cellules ont tendance à se différencier très rapidement lorsqu'elles sont en culture en présence de SVF (10 %) modifiant profondément le protéome des cellules. Le SVF est également une limite pour passer en MS car dans une approche où l'on ne sait pas ce que l'on recherche, le SVF masque le signal des autres protéines. Enfin, la privation de SVF ne permet pas la culture de ces cellules. Nous avons initialement étudié cette approche et vite réalisé les limites importantes de celle-ci

Mise en place bio-informatique

Suite à ces résultats préliminaires montrant une difficulté importante de mise en place de cette approche dans notre problématique, nous avons travaillé à élaborer une nouvelle stratégie. Celle-ci devait prendre en compte à la fois le nombre limité de cellules récoltées pour une recherche sans *a priori* des effecteurs protéiques et les difficultés liées à la culture de ces cellules qui ne permet pas de les multiplier tout en les gardant dans un état indifférencié.

Une publication relativement récente s'intéressant au rôle paracrine des cellules mésenchymateuses, faisait part de la découverte par microarray d'une protéine, dont la présence avait été prédite par analyse automatisée du génome. Les auteurs ont utilisé un traitement informatique particulier pour prédire, parmi les séquences présentes sur la puce du microarray, celles qui étaient les moins documentées et qui avaient les plus grandes chances d'être secrétées (Korf-Klingebiel et al., 2015). Dans cette approche, la sélection des candidats protéiques est donc prédite à partir d'une lecture transcriptomique (plus simple à mettre en place) puis, ces candidats protéiques seront validés par une approche ciblée sur les candidats identifiés (figure 35). Cette approche nous a semblé très compatible avec notre problématique.

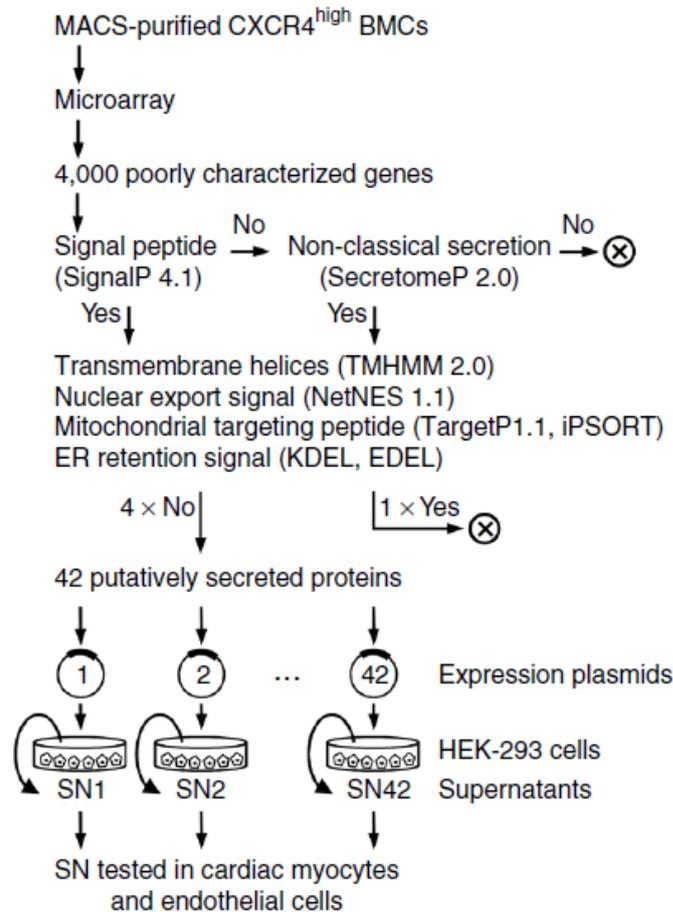


Figure 35 : Schéma résumant la stratégie utilisée par Korf-Klingebiel et al. pour identifier des protéines sécrétées de manière spécifique par une population de MSC. Les MSC isolées par tri magnétique de moelle osseuse sont analysées par microarray. Parmi les 47 000 séquences présentes, seules 4000 représentant des séquences mal caractérisées sont considérées. L'analyse bio-informatique permet d'en garder les protéines prédites comme sécrétées. Les 42 séquences obtenues sont clonées pour produire des protéines recombinantes dont les effets sont étudiés sur plusieurs types cellulaires (Korf-Klingebiel et al., 2015).

Nous avons donc choisi d'étudier la possibilité de mettre en place cette stratégie à partir d'une analyse des séquences des ARN messagers (RNAseq) des cellules PW1⁺ cardiaques. Cette analyse avait été réalisée pour mieux caractériser ces cellules (Yaniz-Galende et al., 2017). Dans un premier temps, j'ai donc construit un système informatique similaire à celui utilisé dans la publication de référence (Korf-Klingebiel et al., 2015). Ce pipeline est basé sur une suite de logiciels prédictifs d'analyse protéique qui permet d'analyser les séquences pour identifier certains motifs caractéristiques. Les séquences sont ensuite sélectionnées en fonction de la présence ou de l'absence de ces motifs.

Généralités sur le système informatique prédictif

D'après la publication originale (Korf-Klingebiel et al., 2015), j'ai étudié la possibilité de transposer la méthode décrite à partir d'un microarray vers un système basé sur des données de RNAseq. Un microarray est une technique d'analyse consistant en une puce sur laquelle sont immobilisées des séquences connues d'ADN simple brin dont on veut savoir si le gène correspondant est exprimé par des cellules. L'échantillon à tester est de l'ADN complémentaire (ADNc) obtenu à partir des ARN messagers (ARNm) de l'échantillon et couplé à un fluorophore. L'ADNc est déposé sur la puce. Si l'ADN fixé à la puce est mis en présence d'ADNc correspondant, ces deux brins vont s'hybrider et seront retenus tandis que les ADNc non hybridés vont être lavés. Les ADNc hybridés vont alors être détectés par fluorescence, reflétant ainsi l'expression du gène correspondant. Les auteurs ont donc pris la séquence des ARNm détectés et en ont prédit une séquence en acides aminés, sans tenir compte de l'abondance d'expression. La séquence en acides aminés est ensuite analysée afin d'y trouver des motifs particuliers concordant avec une sécrétion de protéines.

Les données du RNAseq sont très différentes et comprennent de très nombreuses séquences d'ARNm. Ces séquences ont également été validées qualitativement et quantitativement. L'ensemble de ces premières étapes a été réalisé avec l'aide de l'équipe bio-informatique (Dr TREGOUËT UMR 1166) qui a analysé les données de RNAseq dans la publication de notre équipe (Yaniz-Galende et al., 2017).

J'ai ensuite utilisé un outil avec une interface graphique me permettant facilement de mettre en place des traitements automatisés des tâches, Galaxy (<http://usegalaxy.org>). Galaxy est une plateforme web d'analyse de données. Il fonctionne comme une boîte à outils et permet cette automatisation. Galaxy est couramment utilisé en génomique et de nombreux serveurs sont disponibles à travers le monde (<https://galaxyproject.org/public-galaxy-servers/>). Cependant ces serveurs n'intègrent pas les logiciels nécessaires à l'étude des protéines qui sont disponibles à titre gracieux pour les universitaires (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) (Emanuelsson, Brunak, von Heijne, & Nielsen, 2007). La plupart des logiciels utilisés par les auteurs ont été adaptés pour être utilisable sous

l'environnement Galaxy, mais les logiciels SecretomeP et NetNES ne le sont pas. Aucune alternative n'est disponible pour SecretomeP mais NetNes a pu être remplacé (Cf. infra).

Afin de pouvoir se servir d'outils de prédictions liés aux protéines, il a fallu créer un serveur local sur une machine relativement puissante et ayant comme système d'exploitation un Linux. J'ai choisi linux Mint car je suis familier de cette distribution bien que CentOS soit conseillé, le choix de la distribution n'a pas d'impact sur le fonctionnement du serveur en local. Le système Galaxy a été installé suivant les informations données par la communauté (<http://galaxyproject.org>). Les outils de prédiction ont ensuite été rajoutés et paramétrés manuellement.

La souplesse d'utilisation de Galaxy et des différents outils m'a permis d'obtenir de manière relativement facile les membranomes et secrétomes prédits de chaque population étudiée.

Du fait de l'utilisation de cette approche, j'ai également mis en place une vérification en deux étapes des données de sortie afin d'en ôter les faux-positifs (séquences sélectionnées alors que la protéine ne respecte pas les critères souhaités). J'ai également préféré choisir des critères de tri assez larges sachant cette étape de vérification des données afin de minimiser les faux négatifs (séquence écartée bien que la protéine soit conforme aux exigences souhaitées). La vérification des données ont été réalisées en 2 étapes, la première à l'aide du logiciel *IPA – Ingenuity pathway analysis*, licencié par Qiagen, la seconde réalisée manuellement en criblant des bases de données. IPA est également une boîte à outils, résolument tournée vers l'analyse de listes de protéines, d'ARN ou de gènes, afin de trouver des liens fonctionnels entre eux. Ce logiciel permet, parmi d'autres fonctions, de faire de la *curation* automatisée de bases de connaissances, fonction qui nous permet de vérifier si des informations sont déjà connues à propos des protéines que nous avons prédites comme présentes dans nos échantillons. Cela nous permet également de vérifier les données de sortie par rapport aux informations connues et vérifiées quant à la localisation subcellulaire des protéines.

Le deuxième filtre d'analyse est réalisé sur les données obtenues après IPA. IPA peut ne pas avoir d'informations sur certaines protéines ou avoir des informations incomplètes. Afin de décider de l'inclusion ou de l'exclusion de ces protéines incertaines, les

informations issues de plusieurs bases de données (Uniprot, Ensembl, BioGPS et the Human Protein Atlas) ont été croisées manuellement.

Outils utilisés

WolfPsORT (Horton et al., 2007)

Nous avons utilisé l'outil bio-informatique WolfPsORT comme prédicteur de localisation subcellulaire. Cet outil transforme les acides aminés *in silico* en vecteurs directionnels et finalement les présente sous forme de score pour chaque destination. Les localisations sont ensuite classées en fonction de ce score. On sélectionne ici les directions « plas » ou « extr » arrivées en première position et qui correspondent respectivement à une localisation à la membrane plasmique ou extracellulaire. L'exactitude de l'outil est d'environ 70 %.

TMHMM 2.0 (Emanuelsson et al., 2007; Krogh, Larsson, Von Heijne, & Sonnhammer, 2001; Möller, Croning, & Apweiler, 2001; Sonnhammer, von Heijne, & Krogh, 1998)

Basé sur le modèle mathématique de Markov caché, l'outil TMHMM permet de prédire la présence d'hélices transmembranaires dans la séquence. La version 2 de cet outil permet de retrouver 97 à 98 % des protéines transmembranaires, et permet de discriminer les protéines solubles et membranaires avec une spécificité et une sensibilité supérieure à 99 %. Cette spécificité décroît si le peptide signal est présent (certains types de peptides signaux sont de nature hydrophobe induisant une mauvaise interprétation par le logiciel qui les identifie comme domaine transmembranaire). Ce logiciel permet également de prédire l'orientation des protéines bien que les protéines à un seul segment transmembranaire soient parfois inversées.

[SignalP 3.0](#) (Bendtsen, Nielsen, Von Heijne, & Brunak, 2004; Emanuelsson et al., 2007; Nielsen, Engelbrecht, Brunak, & von Heijne, 1997)

SignalP permet de prédire la présence de peptide signal. Un peptide signal est un élément de séquence protéique permettant l'adressage des protéines vers la voie de sécrétion (via le réticulum endoplasmique et le translocon). Cette voie d'export concerne les protéines membranaires, les protéines excrétées et les protéines des différents organites intracellulaires. Deux modèles informatiques sont utilisés : un modèle de Markov caché et un modèle de réseaux neuronaux artificiel afin de prédire les sites de clivages par la « signal peptidase 1 ». Ce système permet d'avoir une sensibilité avoisinant les 99 %, une spécificité de 85 % et une précision de 93 %.

[NLStradamus](#) (Nguyen Ba, Pogoutse, Provar, & Moses, 2009)

Egalement basé sur un modèle de Markov caché, et basé sur deux algorithmes, NLStradamus permet de retrouver des séquences pouvant potentiellement être un signal d'adressage au noyau. Premièrement, il semblerait que moins de 40 % des protéines aient un signal NLS. Deuxièmement cet outil a des critères très stricts et est assez peu sensible (37 % de séquences positives retrouvées mais un taux de faux positifs faible). Troisièmement, contrairement au peptide signal retrouvé majoritairement dans le N-terminal des protéines, les signaux NLS peuvent être localisés tout au long de la séquence. Enfin les développeurs conseillent d'utiliser plusieurs approches pour contourner les limitations de leur logiciel.

[Predict NLS](#) (Cokol, Nair, & Rost, 2000; Emanuelsson et al., 2007)

Predict NLS est un outil basé sur une liste de séquences NLS connues et prédites mais vérifiées. Son efficacité est de 43 % avec une exactitude de 100 %.

Utilisés seuls, chacun des deux outils de prédiction des séquences NLS donne des résultats assez pauvres : de nombreuses protéines retrouvées dans le noyau n'étaient pas retirées

des listes des protéines membranaires et secrétées. L'utilisation des deux outils de prédiction des séquences d'adressage au noyau ensemble a permis d'obtenir une couverture assez complète et de réduire drastiquement le nombre de faux négatifs aux séquences NLS et ainsi de réduire la liste prédite qui est ensuite manuellement vérifiée.

Données sources

Les données sources sont composées de 27 échantillons analysés en deux fois. Ces 27 échantillons représentent 11 populations (tableau 3) : Cardiomyocytes, Cellules souches embryonnaires, Fibroblastes cardiaques, cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse et populations de cellules souches cardiaques obtenues par FACS en conditions normales et infarctées, selon l'expression de C-kit et de l'activité β -Gal.

Tableau 3 : Liste des types cellulaires utilisés pour le RNAseq et leur origine.

Types cellulaires analysés	Méthodes d'obtention
Cardiomyocytes	Isolés par la méthode de Langendorf à partir de cœur de souris
Cellules souches embryonnaires	Lignée de cellules souches (mES) de souris
Fibroblastes cardiaques	Fraction non-myocytaire après isolat d'un cœur murin, composée à >80% de fibroblastes
Cellules souches mésenchymateuses	Obtenus par FACS à partir de la moelle osseuse de souris
FDG⁺	Obtenus par FACS à partir de cœurs de souris
C-kit⁺	Obtenus par FACS à partir de cœurs de souris
MI C-kit⁺	Obtenus par FACS à partir de cœurs de souris infarctées
MI FDG⁺	Obtenus par FACS à partir de cœurs de souris infarctées

De plus l'analyse par FACS a permis de préciser si les cellules FDG⁺ (donc PW1⁺) exprimaient aussi le marqueur C-kit. Il a donc été possible de différencier les cellules dites

doubles positives (PW1⁺/C-kit⁺) des cellules PW1⁺/C-kit⁻. Cependant, nos résultats ont montré très peu de différences entre ces deux sous-populations de cellules et nous avons donc considéré les cellules FDG⁺ dans leur ensemble sans tenir compte de l'expression de C-kit.

Stratégie d'obtention du membranome prédit

1^{ère} étape : prédiction du membranome

La première étape est réalisée pour chaque jeu de données à partir de l'ensemble des transcrits issu du RNAseq, condition par condition. Y interviennent les 4 outils précédemment décrits. Cette première étape est détaillée dans l'annexe 1, l'annexe 3 et résumée dans la figure 36. Cette étape permet de transformer les séquences ARN des fichiers source en séquences protéiques. SignalP 3.0 permet ensuite de déterminer puis de sélectionner les séquences possédant un probable peptide signal. Un peptide signal est une portion de la chaîne peptidique qui permet un adressage vers l'un des compartiments cellulaires (noyau, réticulum endoplasmique transport ou rétention, mitochondrie, peroxysome ...). A partir de ces séquences, on prédit ensuite leur localisation subcellulaire (WoLF PSORT), la présence de segment transmembranaire (TMHMM) et la présence de signaux d'adressage au noyau (NLStradamus et Predict NLS). Pour chaque condition, sont sélectionnés les séquences qui ne possèdent pas de signal NLS et au moins un segment transmembranaire et adressées à la membrane plasmique afin de créer la liste des protéines membranaires hypothétiques (membranome). Les séquences qui satisfont à ces exigences sont alors étudiées avec le plus grand soin afin de retirer les faux positifs.

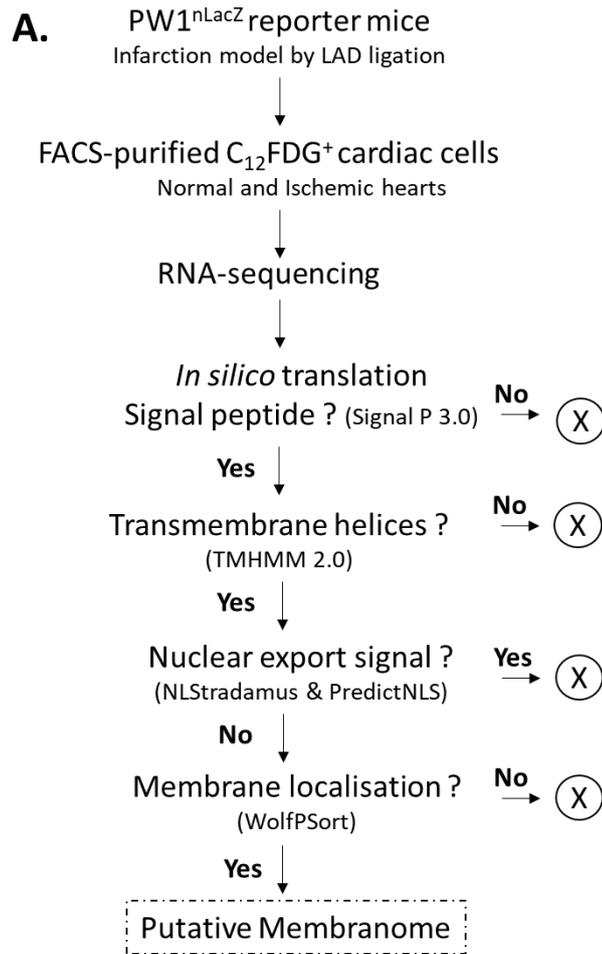


Figure 36 : Schéma de la stratégie d'obtention du membranome hypothétique des cellules PW1⁺.

Ces 378 protéines représentent de nombreuses fonctions, résumées dans la figure 37. Néanmoins la majorité de ces protéines ne sont pas associées dans les bases de données avec une fonction précise.

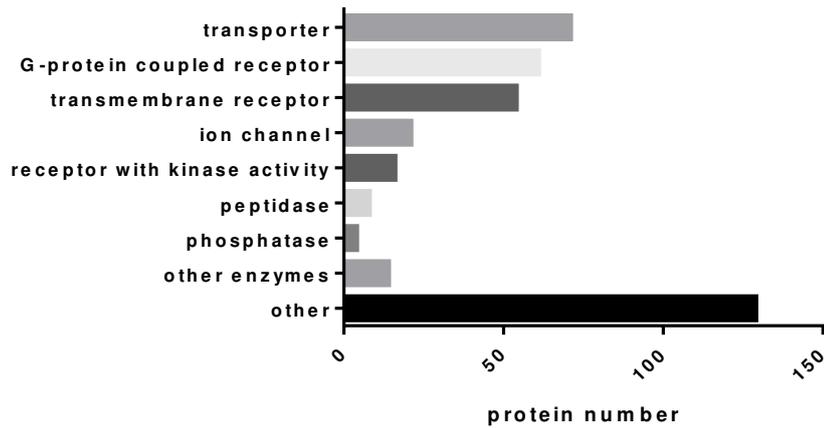


Figure 37 : Les 378 protéines associées à la présence de PW1 sont associées à de nombreuses fonctions mais la majorité est encore mal caractérisée.

2ème étape : fusions des points semblables et adjonction des identifiants « Ensembl »

Pour obtenir un marqueur membranaire présent seulement à la surface des cellules exprimant PW1, les membranomes prédits des cellules exprimant PW1 ont été extraits puis les conditions « normales » et « MI » ont été comparés. Seules les séquences à la fois présentes dans les deux conditions ont été gardées (figure 38). En conditions normales, 2113 protéines membranaires ont été retrouvées parmi les cellules exprimant PW1 tandis qu'en condition pathologiques, 2284 protéines ont été retrouvées. Le chevauchement des deux listes est important puisque 2040 séquences ont été retrouvées exprimées par les cellules PW1 de manière indépendante des conditions ischémiques. Pour permettre au logiciel IPA de reconnaître convenablement toutes les séquences, l'identifiant unique de gène codant pour chaque séquence issue de la base de données *Ensembl* a également été ajouté.

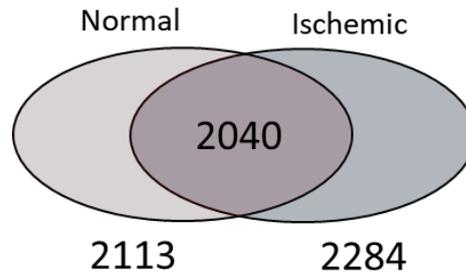


Figure 38 : Le membranome prédit pour les cellules PW1⁺ en conditions normales contient 2113 protéines, le membranome prédit pour les cellules PW1 en conditions pathologiques contient 2284 protéines. 2040 protéines ont été retrouvées en commun décrivant ainsi le membranome des PW1⁺ insensible à la pathologie.

3^{ème} étape : Comparaison des différents types cellulaires et extraction du membranome des PW1⁺

Les séquences communes à toutes les cellules exprimant PW1 ont été comparées aux séquences des autres types cellulaires et seules les séquences présentes uniquement dans les PW1⁺ aussi bien issues de cœur sain que de cœur pathologique ont été gardées. Le résultat obtenu est considéré comme le membranome hypothétique spécifique des cellules PW1⁺. Ce membranome a été construit pour être insensible à la pathologie. Il est composé de 913 transcrits associés à la présence de PW1 et insensibles à la pathologie (figure 39).

4^{ème} étape : Tri manuel et critères de choix

La liste des 913 protéines est alors rentrée dans IPA. On élimine les protéines qui sont des isoformes, les faux positifs, celles qui n'ont pas d'informations (*unknown*). Sont sélectionnées celles dont la localisation subcellulaire est indéterminée (*other*) ou à la membrane plasmique. La liste est ensuite exportée.

La liste des candidats obtenus après IPA est manuellement vérifiée en criblant les bases de données Uniprot, Pubmed, BioGPS, Expasy, Protein Atlas et peptide Atlas pour trouver des informations fiables et certaines. Le tri est réalisé de manière à ne conserver dans la liste finale que des protéines connues pour être adressées à la membrane et pouvant

servir de marqueur pour du tri cellulaire. Une liste de 378 séquences est alors conservée pour la suite du projet (figure 39) (annexe 4).

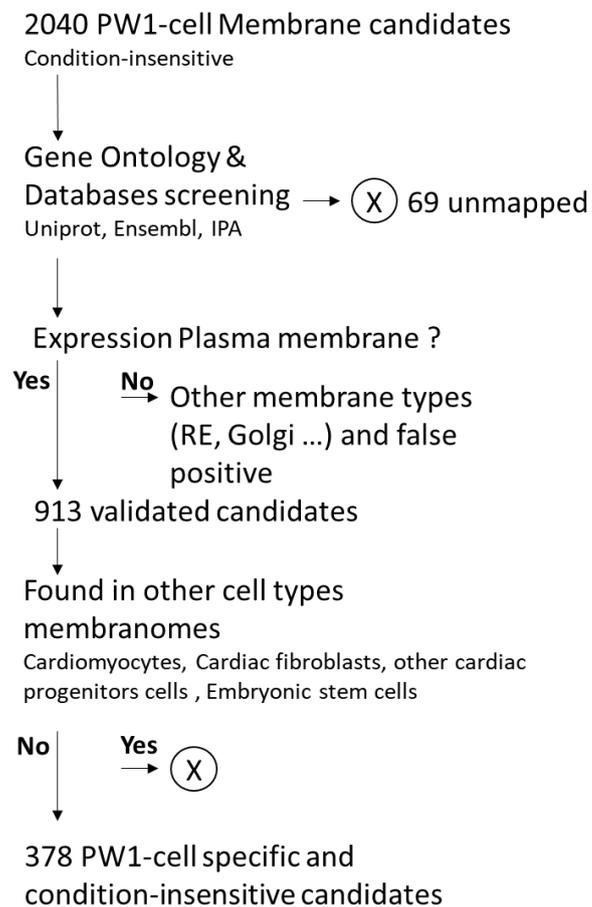


Figure 39 : Schéma récapitulatif de la stratégie de criblage des séquences.

Conclusion

Il est possible de prédire un membranome et un secrétome à partir de données RNAseq à l'aide d'un système informatique.

Ce système nous a permis d'obtenir une liste de 378 cibles membranaires certaines dont l'expression protéique doit toutefois être attestée.

Etude du membranome des cellules PW1⁺ par Spectrométrie de masse

Généralités

L'obtention d'un protéome potentiel est un avantage certain, cependant les ARN pouvant être réprimés avant leur traduction en protéines (Bartel, 2009), il est primordial de vérifier la présence des protéines identifiées par RNAseq. La méthode la plus simple et la plus efficace en termes de temps et de coût est la spectrométrie de masse.

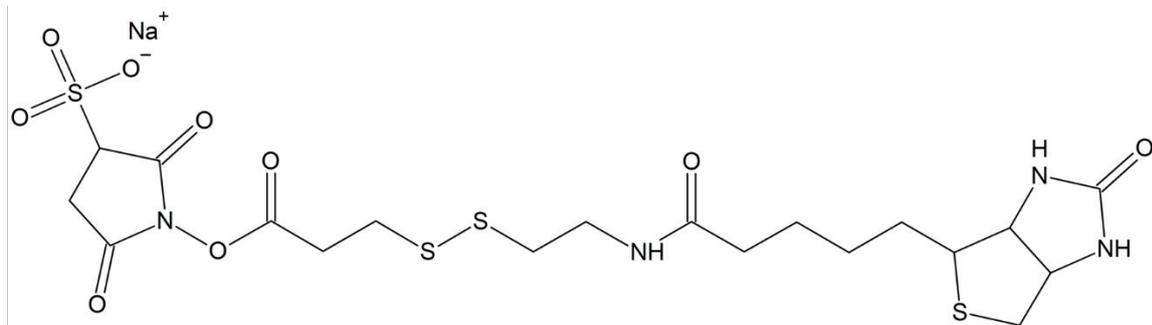
Méthodologie

Plusieurs stratégies sont disponibles pour préparer les échantillons avant de les analyser en spectrométrie de masse. Cependant il y a de nombreuses limitations du fait de la complexité du protocole. En effet, les populations étudiées sont très peu représentées dans le cœur et, malgré une sensibilité de l'ordre théorique de la femtomole de la spectrométrie de masse, la complexité de l'échantillon ne permet pas d'être dans des conditions idéales. A partir de cellules PW1⁺ obtenues par tri cellulaire en Cytométrie en flux, plusieurs options ont été envisagées et testées :

1/ Dérivatisation des protéines accessibles à l'aide d'un NHS ester et purification par la streptavidine

La première approche réalisée est une méthode d'enrichissement faisant intervenir un réactif se liant aux amines primaires des protéines. Ce réactif est le Sulfo-NHS-SS-biotin (figure 40). L'intérêt de ce réactif est multiple. Tout d'abord le groupement réactionnel NHS-ester, couramment utilisé en chimie clic (réaction chimique biocompatible aux conditions réactionnelles simples) est substitué par un groupement sulfonique permettant une plus grande solubilité dans l'eau, solvant des protéines. Le groupement NHS-ester réagit de manière très préférentielle avec les amines primaires des protéines (N-terminal et chaînes latérales). Ensuite la phase de purification est réalisée sur billes

magnétiques couplées à de la streptavidine, procédé robuste et éprouvé. Enfin l'élu­tion se fait dans un milieu réducteur, étape réalisée obligatoirement avant une électrophorèse SDS-PAGE (phases de réduction/alkylation en présence de dithiothréitol et d'agent alkylant, généralement de l'iodoacétamide).



Groupement réactionnel

Groupement de sélection

Groupement cicatriciel après élu­tion

Biotine

Figure 40 : Structure du Sulfo-NHS-SS-biotine.

L'utilisation d'un tel procédé s'est révélée cependant plus difficile à mettre en place que prévu. Au cours du tri cellulaire, du sérum est nécessaire, et bien que les cellules triées soient lavées après tri, des protéines sériques restent présentes. De plus, le tri en lui-même est un stress intense pour les cellules, une forte proportion est abimée par le tri et le contenu protéique de celles-ci se répand dans le milieu. Enfin les conditions opératoires sont également assez sévères (présence de DMSO, et pH acide) et l'intégrité des membranes est compromise.

2/Lyse totale

Une seconde stratégie a été tentée par la lyse de l'ensemble des cellules à l'aide d'un tampon RIPA dont la concentration en détergent a été augmentée afin de bien solubiliser les protéines membranaires. La complexité de l'échantillon m'a amené à rechercher une solution pour augmenter les chances de retrouver les protéines membranaires prédites à l'aide du RNAseq. Le principe repose sur la création d'une base de données construite à

partir des séquences retrouvées dans le RNAseq. Un script développé « maison » permet le calcul des masses théoriques des protéines et des peptides réduits et alkylés (par l'iodoacétamide) constituant ces dernières. Y sont également calculés les masses théoriques en cas de N-glycosylation (et de déglycosylation par la PNGaseF), de dérivatisation (par le Sulfo-NHS-SS-biotin) (annexe 5). Cette méthode quoiqu'élégante n'a pu être appliquée, car l'implémentation du logiciel d'analyse de masse aurait induit un biais d'analyse.

A la vue du travail nécessaire, il a été préféré une autre méthode plus traditionnelle. De plus cette stratégie induit un biais dans l'analyse. En ne nourrissant le logiciel qu'avec des protéines connues, le risque de tomber sur un faux positif est plus grand. En effet, il faudrait pouvoir classer les peptides calculés en fonction de leur abondance. Si un peptide n'est présent que dans une seule protéine (quel que soit la base de données) sa présence indique avec une certitude élevée la présence de cette protéine dans l'échantillon considéré ; à contrario si un peptide est commun à plusieurs protéines, la présence du peptide est moins importante, il faudrait dans ce cas avoir plusieurs peptides partagés pour classer les protéines retrouvées par un score de probabilité de présence dans l'échantillon. Cette façon de calculer la présence des protéines est celle généralement utilisée par les logiciels d'analyse de données MS. Nourrir le logiciel avec une base ne contenant que ce que l'on cherche risque fortement de faire monter artificiellement le score de présence des protéines.

3/ Lyse douce et enrichissement en protéines membranaires

La méthode finalement choisie a été une lyse « douce » des cellules (Pionneau et al., 2005). Cela permet de casser les cellules sans désintégrer totalement les organites, les différentes membranes et les noyaux. Cette méthode permet de récupérer des fractions enrichies nucléaires, cytosoliques et membranaires séparément par centrifugation différentielle. Le protocole original décrit une étape finale d'extraction des protéines membranaires par un solvant (TFE – trifluoroéthanol). Des tests de faisabilité ont été réalisés à partir de HEK293 en nombre comparable au nombre de cellules d'intérêt que l'on peut obtenir par FACS (100 000 – 1 000 000 cellules). Bien que l'étape finale permette

une purification finale plus importante, la perte de quantité de protéine est telle qu'il a été décidé de s'en passer et de réaliser une électrophorèse SDS-PAGE afin de préparer les protéines extraites pour analyse en spectrométrie de masse (figure 41).

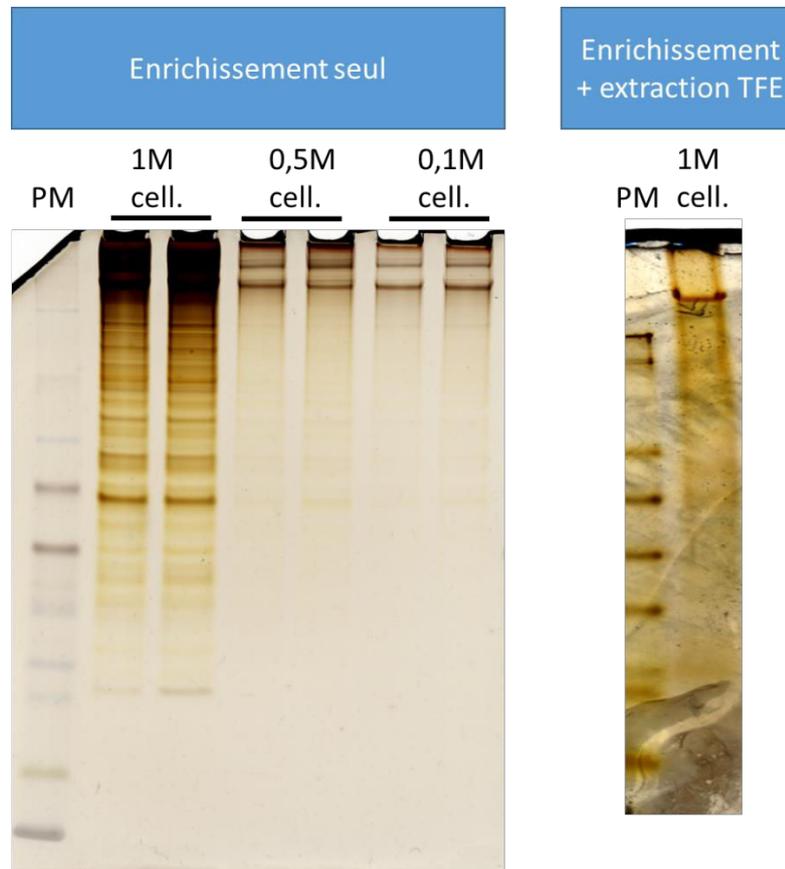


Figure 41 : Tests de faisabilité d'enrichissement en membrane plasmique. Gels SDS-Page colorés au nitrate d'argent. A gauche, 1million, 500 000 et 100 000 cellules de la lignée HEK293 ont été lysées et mécaniquement dissociées au Potter de douce avant la centrifugation des échantillons afin de n'en récupérer que la fraction enrichie en protéines membranaire. A droite, même protocole suivi d'une extraction liquide-liquide au TFE. Un signal n'est visible qu'à partir de 1million de cellules.

Méthode utilisée :

Environ 300 000 cellules PW1⁺ obtenues par FACS sont centrifugées à 500g après tri puis reprises dans 100µL de tampon de lyse (10mM HEPES, 1,5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0,5mM DTT, 1mM Na₃VO₄ et *protease inhibitor cocktail* (Sigma, réf. : P8340)) et incubé 15 minutes sur glace. La solution est ensuite homogénéisée par 20 allers-retours dans un Potter de

douce sur glace (avec le pilon lâche pour ne pas disrupter les noyaux). La solution est alors centrifugée à 600g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite centrifugé à 100 000g pendant 25 minutes à 4°C (Beckman Coulter Optima Max LX, rotor TLA-120.1). Le culot obtenu est rincé par 150µL de *rinse buffer* (50mM Tris, 0,15mM PMSF & protease inhibitor cocktail). Cette dernière solution est de nouveau centrifugée à 100 000g pendant 25 minutes à 4°C. Ce culot final est repris par 150µL de NH₄HCO₃ 50mM et homogénéisé. 20µL d'échantillon sont déposés sur un gel SDS-PAGE (concentration 4 %, résolution 12 %) et mis à migrer (5min pour l'entrée dans le gel puis 32min de séparation, 20mA). Le gel obtenu est alors coloré au nitrate d'argent selon une méthode compatible avec la spectrométrie de masse. Les bandes sont ensuite excisées en une bande large et découpée en cubes de 1mm³. Les protéines subissent alors une réaction de réduction/alkylation (DTT, Iodoacétamide) terminée par une hydrolyse trypsique (500ng, dans AMBIC 50mM, ACN 5 %) avant que les peptides ne soient extraits dans 20µL d'un mélange ACN 30 % AF 0,1 %.

L'analyse par spectrométrie de masse s'est déroulée sur une chaîne LC-MS *online* composée d'une nanoHPLC Dionex ultimate 3000 (Dionex) couplée à un spectromètre de masse Qexactive+ (ThermoScientific), selon un gradient de 2h, 4µL par injection.

L'ensemble des manipulations de protéomique a été réalisé avec l'aide de Cédric PIONNEAU et Solenne CHARDONNET, de la plateforme P3S (UPMC). L'analyse MS a été réalisée par Cédric PIONNEAU et Solenne CHARDONNET sur la plateforme 3P5 (Paris Descartes), ils ont également interprété les données issues de l'analyse à l'aide du logiciel X!Tandem.

Paramètres de l'analyse bio-informatique :

Identification de protéines avec X!tandem via X!tandemPipeline

Version X !tandem = 2015.04.01.1

Version X !tandemPipeline = 3.4.3

Méthode = Qexactive_Trypsine-FDR_noNter_4-20ppm.xml

Database = Uniprot_mouse_ref-proteome_161212.fasta + contaminants standards

Elimination des contaminants

Filtres :

- Au moins 1 peptide avec une e value < 0.05
- Score de la protéine : $\log(e \text{ value}) < -2$
 - ➔ FDR peptide = 0.12816405 %
 - ➔ FDR protéine = 0.959808 %

1679 groups / 1831 subgroups

Résultats de MS & comparaisons avec le membranome prédit

La liste des protéines obtenue après interprétation des données MS comprend 1885 protéines. Cette liste a été vérifiée et seules les protéines connues comme étant associées à la membrane dans les bases de données (figure 42) ont été conservées, représentant 230 protéines.

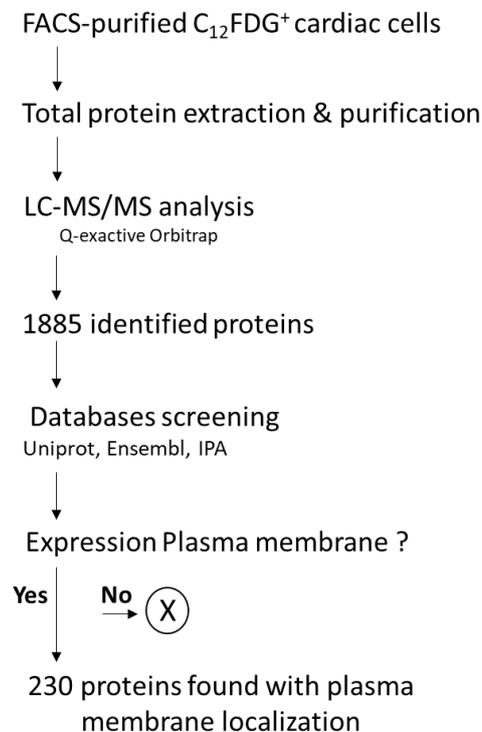


Figure 42 : Schéma résumant la stratégie utilisée pour analyser les protéines membranaires des cellules PW1⁺.

Cette liste de 230 protéines membranaires retrouvées par MS (annexe 6) a été confrontée à la liste de 378 protéines membranaires des cellules PW1⁺ prédites lors de l'analyse du RNAseq grâce au serveur Galaxy. 9 protéines ont été retrouvées à la fois prédites pour être associées à la présence de PW1 et détectées en MS et ont été considérées par la suite comme des candidats potentiels (tableau 4).

Tableau 4 : Liste des protéines retrouvées à la fois prédites pour être associées à la présence de PW1 et par spectrométrie de masse.

Gene	Alias	Category	GO Molecular function	Uniprot ID
<i>Abca8</i>	-	transporter	ATPase coupled with transmembrane movement of substances	Q8K440
<i>Abcb1</i>	MDR1B, CD243	transporter	Xenobiotic-transporting ATPase activity	P06795
<i>Cnm2</i>	-	transporter	Magnesium ion transmembrane transporter activity	Q3TWN3
<i>CD163</i>	-	receptor	Scavenger receptor activity	Q2VLH6
<i>Fcer1g</i>	-	receptor	Immunoglobulin binding	P20491
<i>Itgav</i>	CD51	receptor	Extracellular matrix protein binding	P43406
<i>Pdgfra</i>	CD140a	receptor	Platelet derived growth factor binding	P26618
<i>Sirpa</i>	CD172a	enzyme	SH3 domain binding	P97797
<i>Entpd1</i>	CD39	enzyme	Nucleotide phosphohydrolase activity	P55772

L'analyse de l'ontologie des protéines communes par le logiciel ConsensusPathDB (Max Planck Institute) a permis de retrouver des fonctions communes et importantes que sont la réponse aux blessures, l'activation cellulaire, le mouvement des compartiments

cellulaires, la réponse inflammatoire, l'adhésion cellule-ECM, la régulation du transport vésiculaire, la phagocytose et l'agrégation plaquettaire (figure 43).

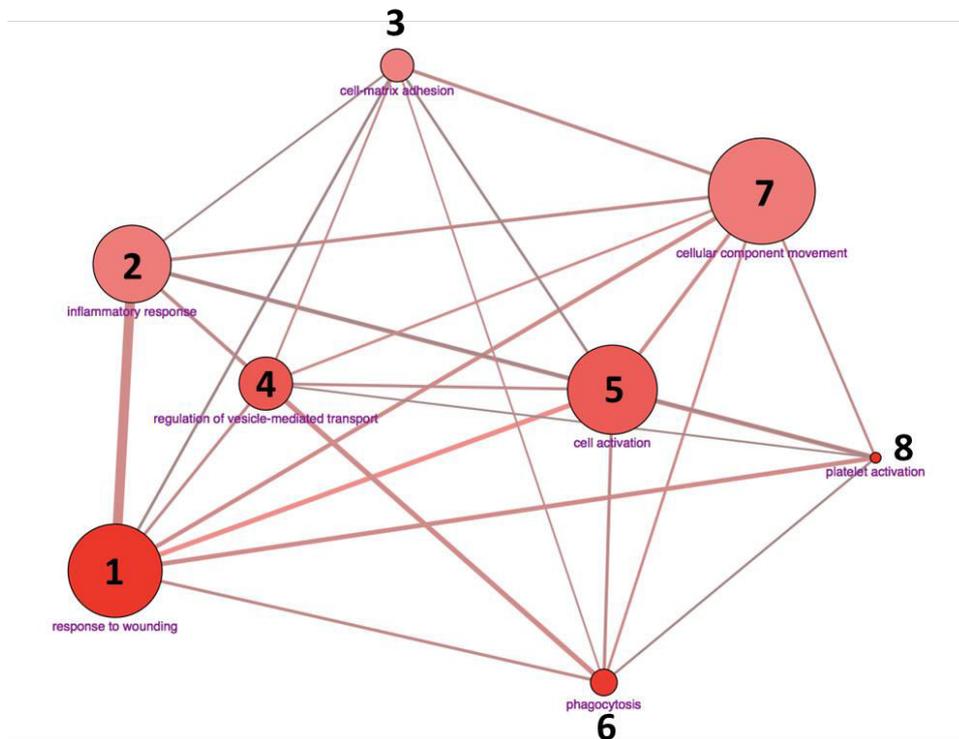


Figure 43 : Ontologie des 9 protéines communes aux analyses transcriptomiques et de spectrométrie de masse. (1) réponse aux blessures, (2) réponse inflammatoire, (3) adhésion cellule-ECM, (4) régulation du transport vésiculaire, (5) activation cellulaire, (6) phagocytose, (7) mouvement des compartiments cellulaires et (8) agrégation plaquettaire.

Enfin une étape de sélection de candidats, qui seront ensuite étudiés, est réalisée en fonction de la bibliographie mais également de la disponibilité d'anticorps fiables pour une utilisation en Cytométrie en flux. Sont finalement sélectionnés CD39, CD51, CD140a, CD163 et CD172a.

CD39 : est également connu sous la dénomination ENTPD1. C'est une ectopeptidase qui hydrolyse l'ATP extracellulaire. Cet ATP est un signal de stress qui peut se lier aux récepteurs purinergiques pour induire une réponse inflammatoire (Jacob, Novo, Bachert,

& Van Crombruggen, 2013). CD39 peut hydrolyser l'ATP extracellulaire afin d'inhiber cette réponse inflammatoire et l'activation du système immunitaire. CD39 est préférentiellement exprimée par des cellules du système immunitaire et les cellules endothéliales mais également dans le placenta (Spaans, de Vos, Bakker, van Goor, & Faas, 2014). Les cellules endothéliales l'exprimant semblent jouer un rôle important dans le processus thrombotique (Plesner, 1995).

CD51 : c'est également l'intégrine αV (αV). C'est un récepteur pour de nombreux composants de la matrice extracellulaire comme la vitronectine et la fibronectine. CD51 reconnaît une séquence peptidique courte RGD qui est contenue dans de très nombreuses protéines. Cette intégrine forme un hétérodimère avec les intégrines $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ ou $\beta 8$ (Barczyk, Carracedo, & Gullberg, 2010). C'est également un point d'ancrage pour plusieurs virus (Lafoya et al., 2018). Plusieurs types de cancers expriment CD51 qui est une cible thérapeutique dans ces cancers (Scaringi, Minniti, Caporello, & Enrici, 2012).

CD140a : également appelé PDGFR α , c'est le récepteur au PDGF a,b,c (*platelet derived growth factor*). La voie PDGF est une voie majeure de l'activation de la prolifération entre autres des fibroblastes et des cellules musculaires lisses (Heldin & Westermark, 1999). Du fait de son rôle dans l'angiogenèse, son inhibition fait l'objet de nombreuses recherches afin de limiter la progression tumorale (Raica & Cimpean, 2010). CD140a est également connu pour être exprimé par les cellules souches mésenchymateuses (Farahani & Xaymardan, 2015).

CD163 : également connu sous le nom d'ED2, marqueur de macrophages M2, CD163 est un récepteur de type « scavenger » ou poubelle. Ce rôle de nettoyeur est impliqué dans les phénomènes de d'endocytose de l'hémoglobine. Une étude a montré l'augmentation de cellules exprimant CD163 après injection intra myocardique de cellules souches cardiaques résidentes (Zhang et al., 2015).

CD172a : également nommé SIRPA. C'est un récepteur au CD47 qui va moduler l'action de SIRPA. CD172a est impliqué dans la croissance des neurites, l'adhésion des neurones et l'attachement des cellules gliales. Il est également impliqué dans la régulation négative des récepteurs à tyrosine kinase, modulant ainsi l'adhésion cellulaire, et la réponse à

l'insuline et aux facteurs de croissance (Latour et al., 2001). Une étude fait état d'une population transitoire au cours du développement cardiaque exprimant SIRPA en combinaison avec NKX2.5 et CD34 qui a la capacité de donner naissance à des cellules endothéliales et des cellules engagées dans la différenciation myocardique (Skelton et al., 2014).

Conclusion

A l'aide de deux techniques nous avons été capables de définir un membranome théorique et un membranome observé. Cependant les contraintes techniques sont nombreuses, limitant considérablement la quantité d'informations que l'on peut obtenir du membranome observé. De nombreuses améliorations sont possibles. La comparaison orthogonale de deux techniques a permis néanmoins de déterminer une liste de protéines associées à la présence de PW1 dans les progéniteurs cardiaques. L'association entre ces nouveaux marqueurs membranaires candidats et PW1 doit à présent être vérifiée.

Partie 4 : Validation de l'expression des marqueurs

Nous avons ensuite cherché à savoir si les candidats que nous avons identifiés à l'aide de l'approche combinée de prédiction transcriptomique/ bio-informatique et de spectrométrie de masse sont bien exprimés dans les cellules cardiaques PW1⁺. Si tel est le cas, nous devons vérifier le recouvrement de la population PW1⁺ que nous observons à l'aide du FDG. Enfin le dernier objectif est de déterminer un panel de cibles nous permettant de trier ces cellules sans avoir recours au FDG.

Méthode de préparation des échantillons pour analyse par Cytométrie en flux.

i - Préparation d'une suspension de cellules cardiaques enrichies en cellules

Les animaux destinés à l'étude des cellules PW1⁺ par Cytométrie en flux subissent une injection d'héparine (100 UI/animal de 25g env.) et sont laissés au repos 10min avant de procéder à leur euthanasie par dislocation cervicale. La poitrine est ouverte par deux incisions de part et d'autre de la cage thoracique. Le cœur est précautionneusement dégagé du thymus puis l'oreillette droite est incisée. A l'aide d'une seringue et d'une aiguille de 25G, 2mL et 8mL de PBS (ThermoScientific, réf. : 10010-015) sont doucement injectés respectivement dans les ventricules droits et gauches du cœur. Le cœur est ensuite prélevé, les oreillettes ainsi que l'artère pulmonaire et l'aorte en sont ôtées. Le cœur est placé dans une boîte de pétri de 6cm de diamètre pour être découpé finement au scalpel en morceaux ne dépassant le millimètre cube et placé à 37°C dans 5mL d'une solution contenant 2400U de collagénase 2 (Worthington, réf. : LS004177) solubilisée dans du DPBS (ThermoScientific, réf. : 14040-091) préalablement filtrée (0,22µm). Au bout de dix minutes, la suspension est agitée et remise à incuber 10min. La suspension

est alors triturée à l'aide de pipettes pasteur (environ 10 allers-retours). La suspension est incubée une dernière fois 10 à 15 minutes en fonction de l'état de digestion. La suspension est triturée une nouvelle fois puis filtrée sur un tamis cellulaire réticulé à 100µm (Falcon, réf. : 352360). Le filtre est rincé 2 fois par 10mL de DMEM 10 % SVF 1 % Peni/Strep (ThermoScientific, DMEM : réf. 10566-016 ; Peni/Strep : réf. 15070-063 ; Sigma : SVF : réf. : F7524). L'échantillon est alors centrifugé pendant 10min à 400g à 4°C sur rotor oscillant (Eppendorf, 5804R ou 5810R, rotor : A-4-44), le surnageant est alors jeté.

ii - Lyse des rouges

Le culot est repris par 500µL de tampon RBCL (*red blood cell lysis*, Ebiosciences, réf. : 00-4300-54) dilué dans de l'eau ultrapure (Lavoisier, réf. : 312 049-5) et incubé 30s à TA sous agitation douce. La lyse est stoppée par l'ajout de 10mL de DPBS et le tube centrifugé une nouvelle fois (400g, 4°C, 10min) et le surnageant une nouvelle fois éliminé.

iii - Marquage des sites antigéniques.

Un comptage des cellules peut être effectué à cette étape (avant centrifugation), sur cellule de Malassez. Cependant, la complexité du tissu digéré ne permet pas un comptage fiable du nombre de cellules mais le nombre global de cellules et de débris de grosse taille (> 10µm) est estimé à 10-12 millions par cœur. Le culot est alors repris par 300µL de HBSS 1 % SVF (HBSS ThermoScientific, réf. 14025-100) et l'on ajoute un mix d'anticorps défini selon l'expérience. La liste des anticorps utilisés pour cette étude sont listés dans le tableau 5. L'hybridation se déroule alors pendant 45min sur glace à l'abri de la lumière. 10mL de HBSS 1 % SVF sont alors ajoutés et le tube une nouvelle fois centrifugé (400g, 4°C, 10min).

Tableau 5 : Liste des anticorps couplés utilisés au cours de cette étude.

Cible	Fluorophore	Clone	Fournisseur	Référence
CD31	BUV737	MEC13.3	BD Biosciences	565097
CD34	Bv421	MEC14.7	Biolegend	119321
CD39	PerCp-Ef710	24MDS1	eBiosciences	46-0391-82
CD44	AF700	IM7	eBiosciences	56-0441-82
CD45	PE-Cy7	30-F11	eBiosciences	25-0451-82
CD45	Biotin/PacBlue	30-F11	eBiosciences	13-0451-85
CD51	PE	RMV-7	eBiosciences	12-0512-83
CD117	APC	ACK2	eBiosciences	17-1172-83
CD140a	APC	APA5	eBiosciences	17-1401-81
CD163	PE/AF555	x	Bioss	bs-2527R-A555
CD166	PE	eBioALC48	eBiosciences	12-1661-82
CD172a	AF700	P84	biolegend	144021
TER119	BUV395	Ter-119	BD Biosciences	563827

Iv - Réaction avec le FDG

La présence de la β -galactosidase (β -Gal) reflétant l'expression de *Pw1* est visualisée grâce à un substrat de l'enzyme qui une fois hydrolysé devient fluorescent. Il existe plusieurs composés ayant ces propriétés, celui qui est utilisé dans cette étude est le C_{12} FDG (5-Dodecanoylamino fluorescein Di- β -D-Galactopyranoside) (ThermoScientific, réf. : D2893). Le culot de cellules obtenu est repris par 300 μ L de HBSS 1 % SVF auquel est ajouté le C_{12} FDG solubilisé dans du DMSO (Sigma-Aldrich, réf. : 276855) à une concentration finale de 60 μ M. Les tubes sont alors incubés 60 minutes à 37°C sous agitation modérée, et à l'abri de la lumière. La réaction (figure 44) est stoppée par l'ajout de 10mL de HBSS 1 % SVF, et le tube centrifugé (400g, 4°C, 10min). Le culot est repris par 200 μ L de HBSS 1 % SVF.

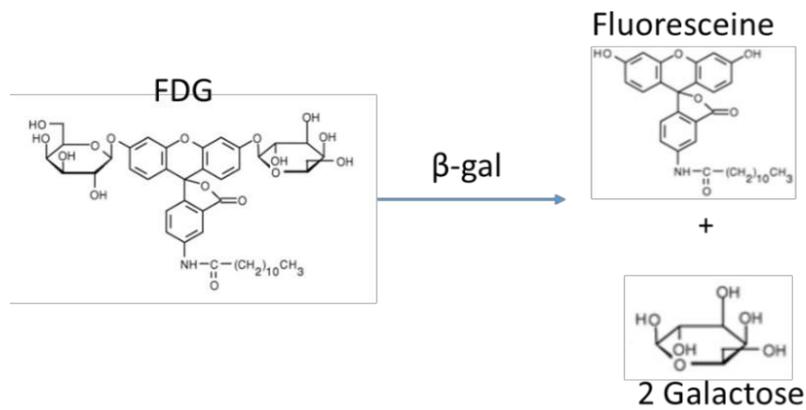


Figure 44 : Réaction schématisée de l'action de l'enzyme β -galactosidase sur le C₁₂FDG, permettant la libération d'un composé fluorescent qui est utilisé pour cribler les cellules exprimant PW1.

V - Marquage des cellules mortes

Bien qu'il existe de nombreux marqueurs de viabilité permettant théoriquement d'exclure les cellules mortes ainsi que les débris, tels les *Live dead blue dye* (ThermoScientific) ou *Viability dye* (Miltenyi), la pratique a montré que l'utilisation de l'iodure de propidium (PI), se fixant dans le noyau des cellules mortes et mourantes, se révèle plus simple à mettre en œuvre et à observer dans un échantillon assez complexe comme le cœur de souris adulte digéré. L'iodure de propidium a été ajouté extemporanément à l'analyse à 2 μ L de PI dilué au 1/50^{ème} dans du DPBS par échantillon.

Résultats d'analyse d'expression des marqueurs par Cytométrie en flux.

La stratégie d'obtention des cellules PW1⁺

Le seuil de viabilité cellulaire est fixé en comparant les conditions avec et sans marqueur de viabilité (PI). Les différentes populations marquées par anticorps sont obtenues en comparant les signaux de cellules non marquées et de FMO (Fluorescence Minus One) contrôles respectifs. Le seuil β -Gal⁺ / β -Gal⁻ est obtenu en comparant des cellules β -Gal⁻ et des cellules β -Gal⁺. Seule la fraction de cellules très positives est considérée comme

étant la population d'intérêt (figure 45). Cette stratégie a été appliquée dans notre précédente étude. Environ 4 % des cellules cardiaques non-myocytaires expriment un niveau élevé de β -Gal et > 99 % de ces cellules expriment PW1 (Yaniz-Galende et al., 2017).

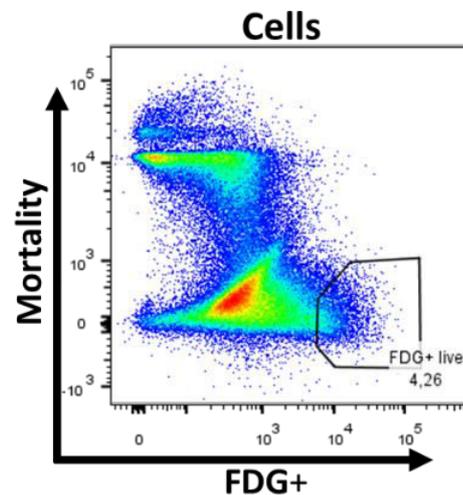


Figure 45 : Les cellules FDG⁺ sont sélectionnées pour être négative au marqueur de viabilité (PI) et présentant une forte activité β -Gal, reflétant une expression de PW1.

Test des marqueurs nouvellement identifiés

La première étape a été de vérifier l'expression correcte des protéines candidates dans la fraction FDG⁺. Nous avons également vérifié l'expression de certains marqueurs typiques de cellules souches ou d'autres types cellulaires précédemment décrits.

L'étude des nouveaux marqueurs a montré rapidement que la population FDG⁺ exprime de manière sensible et spécifique le marqueur CD51 et de manière très disparate les autres marqueurs déterminés précédemment (figure 46) ou des marqueurs de cellules souches précédemment décrits dans la littérature (figure 48). Sur plus d'une dizaine d'isolats, nous retrouvons une expression de CD51 dans plus de 90 % des cellules FDG⁺. L'expression moyenne des autres marqueurs est environ 50 %. L'observation de l'expression de marqueurs de cellules souches déjà connus ne permet pas de marquer l'ensemble des cellules exprimant PW1, néanmoins on retrouve une distinction nette entre les cellules provenant de la moelle osseuse (CD45⁺) exprimant également CD44, et les cellules CD45⁻ qui semblent exprimer de manière plus spécifique CD34, marqueur de

cellules souches et progénitrices (Sidney, Branch, Dunphy, Dua, & Hopkinson, 2014) (figure 49).

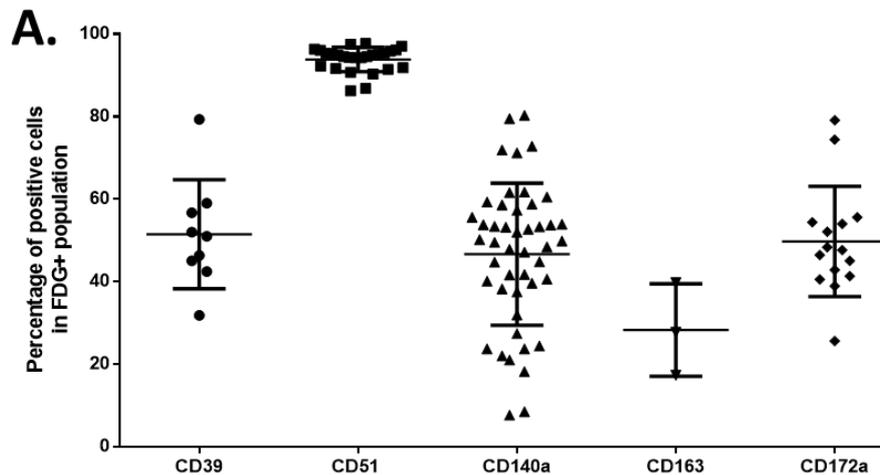


Figure 46 : Evaluation de la proportion de cellules FDG^+ exprimant les marqueurs CD39, CD51, CD140a, CD163 et CD172a. Seul le marqueur CD51 décrit de manière stable l'ensemble de la population exprimant la β -Gal reflétant l'expression de PW1.

En observant la ségrégation des marqueurs les uns par rapport aux autres dans la population exprimant PW1 (figure 47), il est apparu que CD51 permet de décrire deux populations exprimant de manière intermédiaire et forte cette protéine. L'observation des autres marqueurs prédisent ainsi que des marqueurs connus de cellules souches adultes a permis de mieux les caractériser. La population décrite par une expression de CD51 intermédiaire, exprime également PDGFR α (CD140a) tandis que la population exprimant fortement CD51 présente également le marqueur de la lignée myéloïde CD45 ainsi que les marqueurs CD172a, CD163 et CD39.

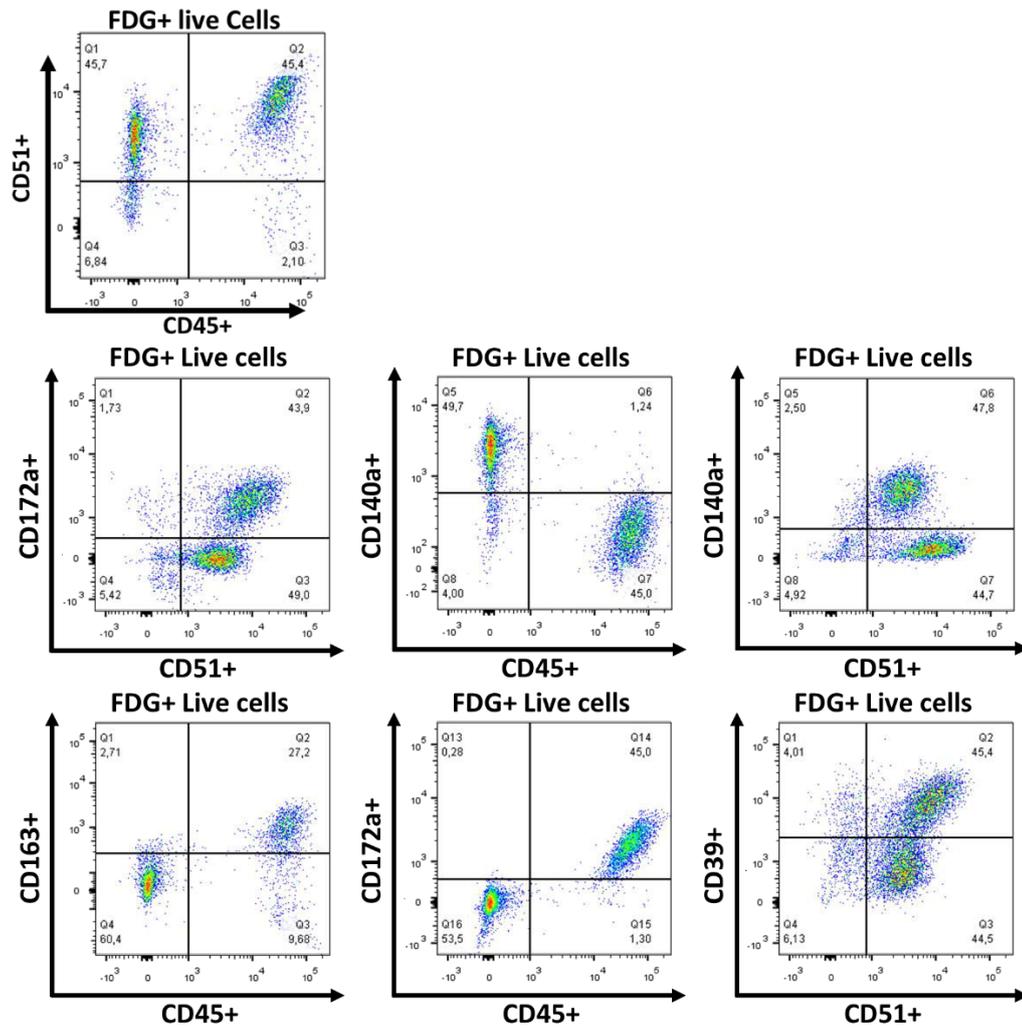


Figure 47 : Cytogrammes représentatifs de l'analyse de l'expression des marqueurs CD39, CD51, CD140 α (PDGFR α), CD163 et CD172 α par des cellules vivantes possédant une activité B-Gal reflétant l'expression de PW1 dans la fraction non myocytaire de cœurs de souris saines. L'expression de CD51 est exprimée par la grande majorité des cellules β -Gal⁺ et les autres marqueurs décrivent deux populations majoritaires exprimant soit CD45, CD39, CD172 α et CD163 ou CD140 α

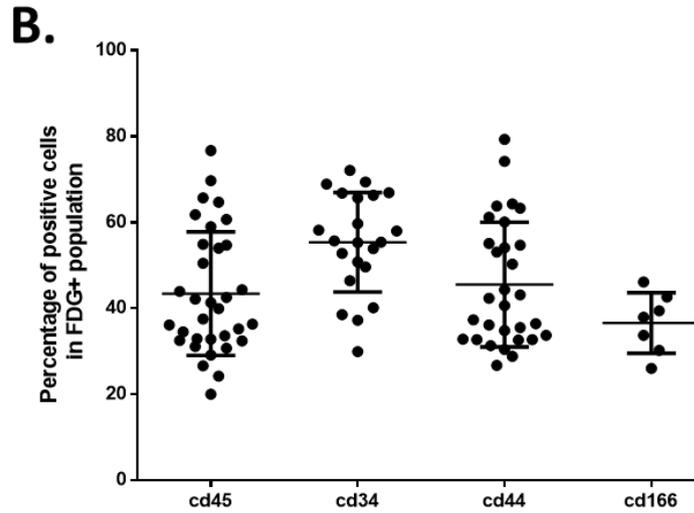


Figure 48 : Evaluation de l'expression de marqueurs de cellules souches par les cellules PW1⁺. Ces marqueurs précédemment décrits dans les cellules souches et observés également dans certaines populations de cellules dérivées de cellules souches adultes cardiaques ne permettent pas de décrire la population exprimant PW1.

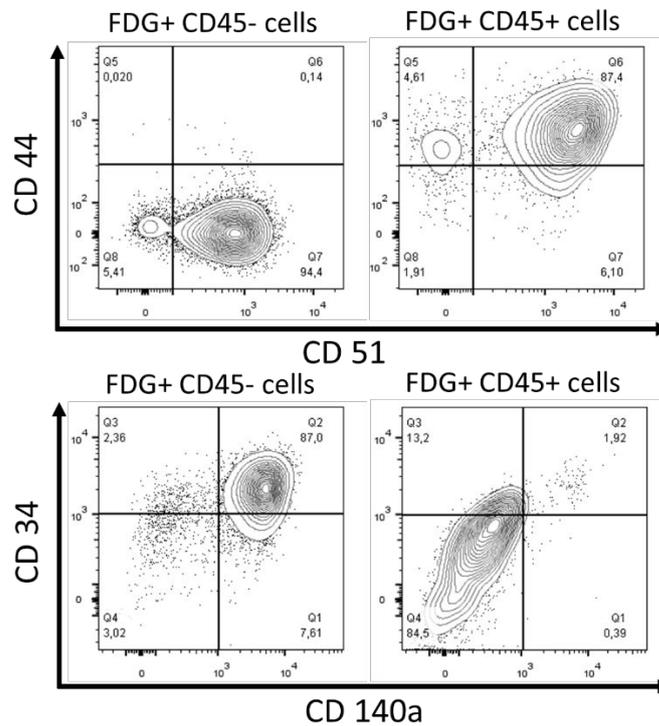


Figure 49 : Cytogrammes représentatifs de l'analyse de l'expression des marqueurs CD34, CD44 CD51 et CD140a dans des populations β -Gal positives exprimant CD45 (à droite) et n'exprimant pas CD45 (à gauche). L'expression de CD45 est associée à l'expression de CD CD44 tandis que l'expression de CD140a est associée à l'expression de CD34.

Vérification de l'expression des marqueurs vasculaires et myéloïdes

Nous avons ensuite cherché à savoir si les cellules que nous observions étaient issues d'autres compartiments de l'organisme tel la moelle osseuse (CD45, TER119) ou d'origine vasculaire (CD31) (figure 50). A partir des cellules vivantes (figure 50 C) nous avons déterminé 3 populations en fonction de leur expression des marqueurs CD45 (lignée hématopoïétique) et TER119 (exprimé par la lignée érythroblastique à partir des proérythroblastes précoces). La population exprimant TER119 est une population d'érythrocytes qui revient négative (figure 50 E) pour le marqueur CD51 et pour l'activité β -Gal ce qui indique que ces cellules TER119⁺ ne participent pas à la population PW1⁺/CD51⁺ observée. La population positive pour CD45, possède une activité β -Gal majoritaire, exprime CD51 pour moitié, exprime également CD31 pour moitié. Ces résultats indiquent que ces cellules sont sans doute dérivées de la lignée hématopoïétique et possèdent un potentiel vasculaire (H. Kim et al., 2010). Enfin la population négative pour CD45 et TER119 exprime pour une large majorité (figure 50 D) le marqueur CD51 en corrélation avec une activité β -Gal. Ces mêmes cellules expriment CD140a, confirmant les résultats obtenus précédemment, mais n'expriment pas CD31, excluant une origine vasculaire. Cette dernière population de cellules semble donc être une population endogène du cœur, qui pourrait être à l'origine des populations fibroblastiques observées en IDM. De plus, on observe que parmi les cellules résidentes CD45⁻ Ter199⁻, la très grande majorité (environ 95 %) des cellules exprimant CD51 sont FDG⁺.

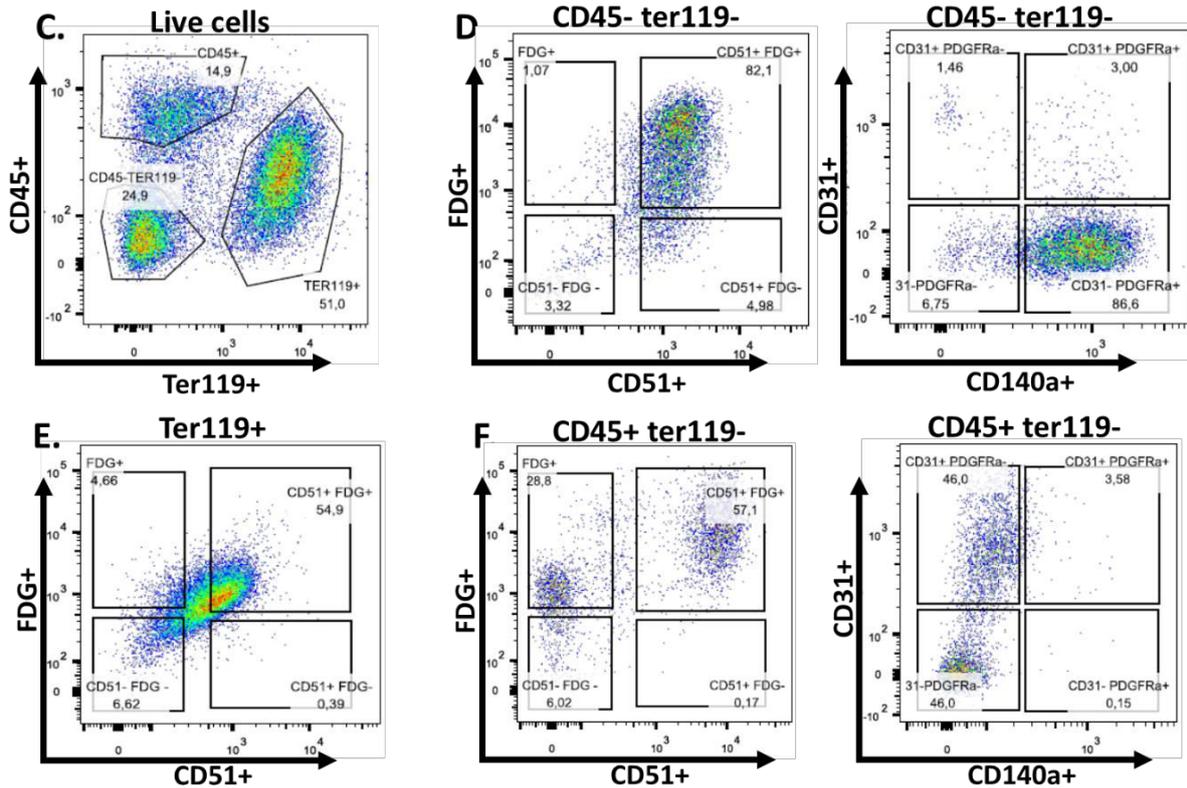


Figure 50 : Cytogrammes représentatifs de l'expression des marqueurs (C) CD45 et TER 119 par les cellules vivantes de la fraction non myocytaire de cœur de souris sain. (D) de la population n'exprimant ni CD45 ni TER119, exprimant CD51 et CD140a et ayant une activité β -Gal, mais négative pour CD31. (E) Population CD45 négative et TER119 positive, négative pour CD51 et sans activité β -Gal. (F) Population TER119 négative, CD45 positive, exprimant majoritairement la β -galactosidase, pour moitié CD51 et CD31 sans expression de CD140a.

Peut-on trier facilement ces cellules sans l'aide du FDG ?

Sachant à présent que CD51 est exprimé par la plupart des cellules ayant une activité β -Gal, nous avons voulu vérifier en premier lieu si les cellules exprimant CD51 dans la fraction non myocytaire sont bien positifs pour la β -Gal. Nous sommes donc repartis des cellules vivantes de la fraction non myocytaire dont nous avons observé la répartition selon les marqueurs CD45 et CD51 (figure 51). Les populations positives pour CD51 ont ensuite été sélectionnées et la proportion de cellules β -Gal positives a été évaluée. La population CD51⁺ CD45⁺ est associée à une forte activité β -Gal (95 %) et la population CD51⁺ CD45⁻ est positive à plus de 80 %. De manière intrigante, la population CD51⁺ CD45⁻ est majoritairement positive pour β -Gal dans le sous-groupe exprimant PDGFR α , alors

que l'inverse est visible dans la population CD51⁺ CD45⁺, dans laquelle l'expression de PDGFR α exclut totalement l'expression de la β -Gal (annexe 2).

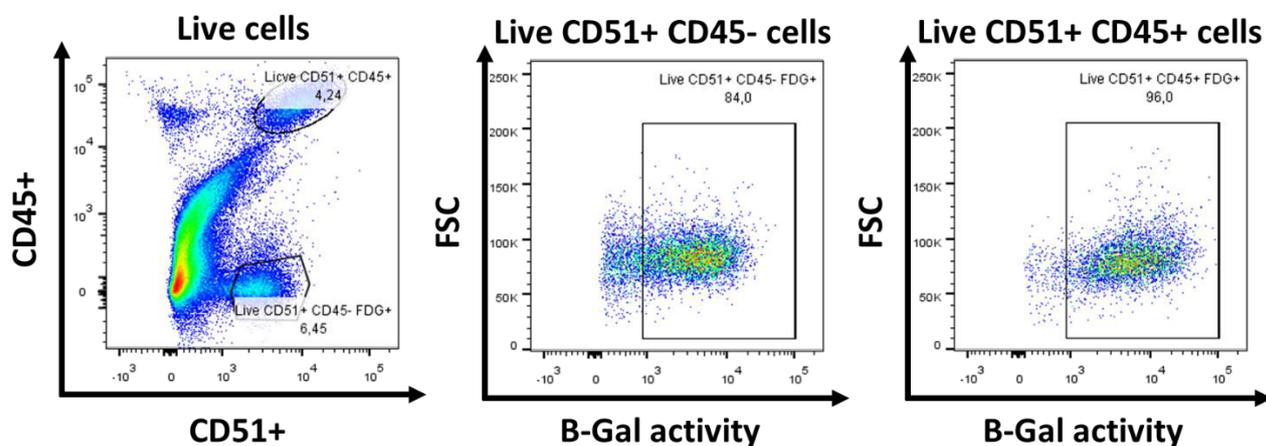


Figure 51 : Cytogrammes représentatifs de l'expression des marqueurs CD51 et CD45 parmi les cellules vivantes de la fraction non myocytaire (gauche). Evaluation de la proportion des cellules exprimant la β -Gal dans les populations CD51⁺ CD45⁻ (centre) et CD51⁺ CD45⁺ droite).

Conclusion

L'ensemble des marqueurs prédits et observés en MS ont bien été retrouvés par cette approche de Cytométrie. Un marqueur parmi les 9 est excessivement bien corrélé avec la présence de PW1 (attesté par l'activité β -Gal). Ce marqueur CD51, est exprimé par 95 % des cellules β -Gal⁺ et environ 85 % des cellules CD51⁺ sont retrouvées avec une activité β -Gal, attestant d'une sensibilité et d'une spécificité importantes. Les autres marqueurs ont été retrouvés associés avec des sous populations aux origines diverses et dont la nature et les rôles devront être étudiés dans le futur. Enfin, l'utilisation de CD51 en association de marqueurs précédemment connus pourra permettre l'isolement des cellules PW1⁺ dans le cœur de souris à l'avenir, et pourrons permettre l'isolement de ces mêmes cellules dans d'autres organismes après transposition.

Partie 5 : Une cible pour inhiber les cellules souches cardiaques PW1⁺ ?

Généralités

Les intégrines sont à la fois des protéines d'adhésion et des récepteurs (Humphries, 2000). Elles possèdent un large domaine extracellulaire et un seul segment transmembranaire. Elles sont organisées en hétérodimères composés de sous-unités α et β . Il existe 18 sous-unités alpha et 8 sous-unités beta différentes chez les mammifères qui ont été décrites en 24 combinaisons jusqu'à maintenant (figure 52). CD51 est codé par le gène ITGAV présent sur le chromosome 2 chez l'humain comme chez la souris. D'un point de vue structurel CD51 possède 4 sites de liaison du calcium, 13 sites de glycosylation et 9 ponts disulfures dont un inter-chaînes. En effet CD51 est clivé post-traductionnellement et est donc formé de deux chaînes.

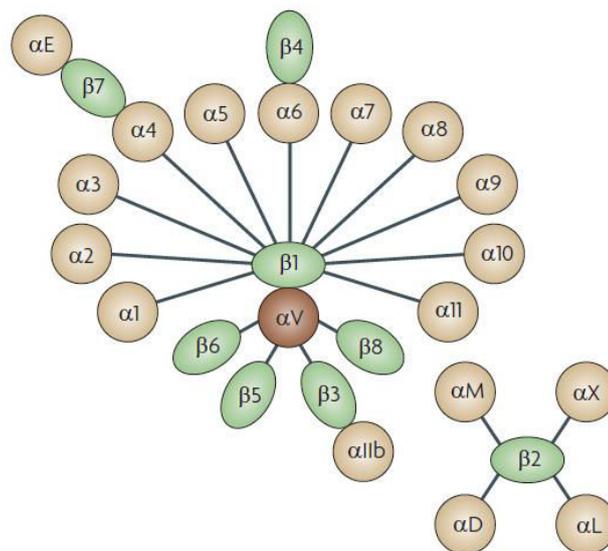


Figure 52 : Schéma résumant les différentes combinaisons observées jusqu'à maintenant. L'intégrine αV est l'intégrine ayant le plus grand nombre de partenaires β , alors que les autres sous-unités alpha ont un seul partenaire Beta (Cox, Brennan, & Moran, 2010).

Le dimère d'intégrines composé avec CD51 est connu pour interagir avec de nombreux partenaires extra et intracellulaires. Ce récepteur sert également de point d'ancrage pour un certain nombre de virus comme l'Herpès virus humain 8 ou le virus de la fièvre du Nil occidental (Van der Flier & Sonnenberg, 2001). L'intégrine alpha V, également appelé CD51 ou encore récepteur à la vitronectine est connu pour pouvoir composer 5 combinaisons avec les intégrines $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ ou $\beta 8$. La spécificité de reconnaissance du ligand repose sur l'interaction des deux partenaires, ainsi deux complexes différents ne reconnaissent pas les mêmes ligands (Felding-Habermann & Cheresch, 1993; Hynes, 2002; Van der Flier & Sonnenberg, 2001). La combinaison avec l'intégrine $\beta 6$ n'est retrouvée que dans les cellules épithéliales (Breuss et al., 1995), les autres combinaisons sont très diversement exprimées et toutes sont associées à de nombreuses maladies : des défauts majeurs du développement embryonnaire (αv , $\beta 8$) mortalité périnatale (αV , $\beta 8$) défauts d'homéostasie ($\beta 3$), ostéosclérose ($\beta 3$) Hémorragies ($\beta 3$), mais également dans de nombreux cancers (poumon, foie, cerveau, sein, pancréas) (αV) (Donnenberg et al., 2018; Gvozdenovic et al., 2016; Horioka et al., 2016; Taga et al., 2002; Ulmasov et al., 2016). Ces intégrines sont également impliquées dans des phénomènes de régulation de l'angiogenèse (Bader, Rayburn, Crowley, & Hynes, 1998).

Ces 5 dimères d'intégrines reconnaissent une séquence peptidique RGD dans de nombreux ligands (Vitronectine, fibronectine, osteopontine, Von Willebrand Factor, Tenascin, ou encore l'Aggrin) (Felding-Habermann & Cheresch, 1993; Hynes, 2002). Cependant l'implication dans les différents processus sains et pathologiques semble être liée à la composition du dimère, la spécificité de reconnaissance des ligands se faisant alors, soit par des domaines particuliers, soit par une conformation particulière du site de reconnaissance du motif RGD. De nombreuses propriétés semblent pourtant communes aux intégrines, en particulier la définition d'un « adhésome » organisé autour des intégrines, et rassemblant plus de 150 protéines au niveau des sites d'adhésion (Legate, Wickström, Fässler, Fa, & Wickstro, 2009; Zaidel-Bar, Itzkovitz, Ma'ayan, Iyengar, & Geiger, 2007). Ce complexe d'adhésion met en relation le cytosquelette et des enzymes qui vont permettre le contrôle de la forme, de la motilité et de la migration des cellules mais également la prolifération et la différenciation des cellules. En effet, les intégrines vont pouvoir à la faveur de l'interaction avec la talin, la paxillin et la FAK (*Focal adhesion*

Kinase), contrôler l'activation d'effecteur en aval, qui eux-mêmes sont requis pour réguler les quantités de cyclines, CKI (*Cyclin-dependant kinases inhibitors*) et finalement activer la transcription de C-jun et de E2F, facteurs impliqués dans la mitose et la prolifération (Walker & Assoian, 2005). L'absence des intégrines empêche l'entrée dans le cycle cellulaire et ainsi inhibe la prolifération cellulaire chez les animaux (LaFlamme, Nieves, Colello, & Reverte, 2008; Streuli, 2009).

La matrice extracellulaire n'est pas cantonnée au rôle de support et de point d'ancrage des cellules, elle sert également de réservoir de facteurs de croissance. La concentration et la composition de ces facteurs de croissance est extrêmement importante pour la régulation de la vie de la cellule. Ces signaux extérieurs permettent le maintien en vie, l'apoptose, la différenciation ou la prolifération. Bien que l'entrée dans le cycle prolifératif soit pilotée par les intégrines, la progression de ce cycle est soumise à la coopération des facteurs de croissance. Cette coopération peut être directe ou indirecte. De manière indirecte, on retrouve les diaphonies (*crosstalk*) entre les voies de signalisation des intégrines et les voies activées par les facteurs de croissance. En particulier les voies PI3K/Akt, Mek/Erk et Rho/Rac (Grassian, Schafer, & Brugge, 2011; Hood, Frausto, Kiosses, Schwartz, & Cheresch, 2003; Skuli et al., 2009). Dans les coopérations directes, on retrouve l'activation des intégrines par des récepteurs aux facteurs de croissance et l'activation des récepteurs aux facteurs de croissance par les intégrines en absence de ligand (Margadant & Sonnenberg, 2010; Munger, Harpel, Giancotti, & Rifkin, 1998; Rapisarda et al., 2017; Shen et al., 2017; Somanath, Malinin, & Byzova, 2009) (Figure 53).

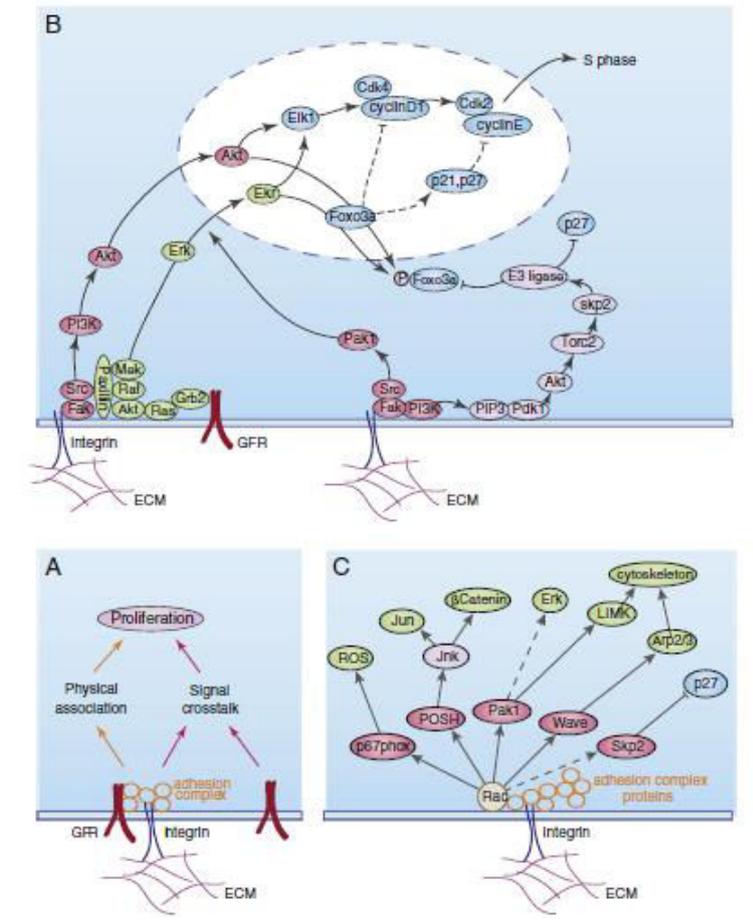


Figure 53 : Différents modes de coopération sont possibles entre les intégrines et les récepteurs aux facteurs de croissance (GFR). A) en interagissant directement ensemble, B) en diaphonies de voies de signalisation dans la même temporalité, ici est représenté la coopération afin de passer en phase S, via les voies ERK et Akt, C) Diaphonie sur des temporalités différentes, en exemple l'activation de Rac permettant la prolifération à travers l'activation de plusieurs effecteurs (d'après (Moreno-Layseca & Streuli, 2014)).

De nombreuses publications ont traité depuis 30 ans de l'implication de ces intégrines dans les processus pathologiques ainsi que des partenaires se liants aux intégrines. Dans un premier temps, c'est l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ qui été étudiée et qui a permis de développer des anti thrombotiques (Harker, 1998). L'étude de l'intégrine β3 a permis ensuite des avancées dans la compréhension de la progression tumorale ce qui a poussé au développement d'inhibiteurs spécifiques (Dechantsreiter et al., 1999; Henderson et al., 2013).

L'ensemble des 5 dimères contenant CD51 ($\alpha\text{V}\beta\text{1}$, $\alpha\text{V}\beta\text{3}$, $\alpha\text{V}\beta\text{5}$, $\alpha\text{V}\beta\text{6}$, $\alpha\text{V}\beta\text{8}$) ainsi que 3 autres dimères ($\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, $\alpha\text{5}\beta\text{1}$, $\alpha\text{8}\beta\text{1}$) sont capables de se lier au motif RGD, bien que les

3 intégrines ne contenant pas CD51 semblent être régulées différemment et ne fixent pas tous les sites RGD disponibles. La majorité des sites RGD de la matrice extracellulaire sont d'ailleurs masqués et deviennent accessibles après dénaturation ou dégradation de la MEC (Barczyk et al., 2010).

Ce motif RGD est également retrouvé dans la séquence de molécules libres. En particulier, il est retrouvé dans la séquence d'un peptide lié au Tgf- β , empêchant sa liaison à son récepteur. Cette forme particulière du Tgf- β et de son inhibiteur est appelée Tgf-latent. Cependant la liaison du peptide contenant le motif RGD aux intégrines permet le rapprochement du Tgf- β à la membrane et ce dernier va pouvoir rencontrer son récepteur. On peut alors imaginer que la proximité physique et temporelle des récepteurs activés facilite la diaphonie des deux voies qu'ils régulent (Chang et al., 2017; Reed et al., 2015; Song, Cho, & Song, 2016).

Cette interaction avec le TGF- β est importante au regard de l'importance de observations de l'implication des intégrines $\alpha V\beta x$ dans la fibrose. De nombreux articles ont traité de l'importance des intégrines dans la survenue de la fibrose dans de nombreux organes et l'inhibition des intégrines $\alpha V\beta x$ permet de réduire significativement la fibrose dans ces organes (Henderson et al., 2013; Munger et al., 1999; Ulmasov et al., 2016). Plusieurs études pointent le rôle du partenaire $\beta 1$ dans le contrôle de la fibrose (Henderson et al., 2013; Reed et al., 2015; Ulmasov et al., 2016) des expériences de KO sélectif des intégrines $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ et $\beta 8$ semblent indiquer que ces derniers ne sont pas impliqués, cependant un mécanisme de compensation par une autre intégrine n'est pas à exclure (Aluwihare et al., 2009; Henderson et al., 2013; Margadant, Charafeddine, & Sonnenberg, 2010)

Inhibiteurs disponibles

L'implication des intégrines dans de nombreuses maladies a poussé de nombreuses firmes pharmaceutiques à développer des solutions thérapeutiques dirigées contre les intégrines. De nombreuses molécules ont été synthétisées mais peu ont dépassé les phases précliniques. Une des difficultés est la recherche de spécificité d'action pour un dimère particulier à cause de la grande similarité de structures. On peut également noter

la difficulté à ne cibler qu'un processus, l'inhibition d'un couple d'intégrines pour une fonction peut avoir des conséquences graves sur d'autres processus également médié par ces intégrines ; on peut citer le cas de l'inhibition du couple $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ (LFA1) : un anticorps modifié (efalizumab) avait été approuvé pour le traitement des formes sévères du psoriasis. Cependant ce traitement avait un effet secondaire dramatique : le développement de leucoencéphalopathies multifocales progressives, dues sans doute à un effet immunosuppresseur du traitement (Warnke et al., 2010). Un autre traitement similaire dirigé contre plusieurs formes de scléroses a également provoqué les mêmes effets secondaires probablement par réactivation du virus JC dans le système nerveux central ("Multiple sclerosis woes," 2005).

Ainsi des efforts considérables ont été réalisés pour obtenir des petites molécules chimiques avec une forte spécificité soit pour un couple d'intégrine soit pour une classe. De nombreuses molécules ont été testées mais peu ont passés les phases de tests cliniques du fait d'un manque d'efficacité en traitement de cancers (Cox et al., 2010; Goodman & Picard, 2012). Parmi les candidats médicaments pour l'inhibition des intégrines αV , un a fait l'objet de grandes attentes dans le traitement du neuroglioblastome : le Cilengitide (Carter, 2010; Cox et al., 2010; MacDonald et al., 2008; Reardon et al., 2011; Stupp et al., 2010). On peut également citer le GLPG0187, inhibiteur des intégrines αV , dont l'efficacité *in vivo* n'a pas été prouvée (Cirkel et al., 2016).

Le Cilengitide (figure 54), également référencée sous le nom EMD121974 est un pentapeptide biomimétique contenant le motif RGD. Ce pentapeptide cyclique a été développé pour inhiber spécifiquement les intégrines $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ et $\alpha\text{V}\beta\text{5}$ (Dechantsreiter et al., 1999; Mas-Moruno, Rechenmacher, & Kessler, 2010); cependant des effets d'inhibition ont également été reportés sur le dimère $\alpha\text{V}\beta\text{1}$ (Alghisi, Ponsonnet, & Rüegg, 2009). L'IC50 (concentration inhibitrice médiane) du Cilengitide pour les différentes intégrines ligand le RGD a été rapportée (0,61nM ; 8,4nM ; 2050nM, 2350nM ; 14,9nM ; 5400nM respectivement pour les couples $\alpha\text{V}\beta\text{3}$, $\alpha\text{V}\beta\text{5}$, $\alpha\text{V}\beta\text{6}$, $\alpha\text{V}\beta\text{8}$, $\alpha\text{5}\beta\text{1}$, $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$) cependant les intégrines $\alpha\text{V}\beta\text{1}$ et $\alpha\text{8}\beta\text{1}$ n'ont pu être testées dans les mêmes conditions (Kapp et al., 2017) mais une estimation de leur pouvoir d'inhibition de l'adhésion cellulaire existe et est légèrement plus faible que l'action sur $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ (Hatley et al., 2018). Ce candidat médicament a été testé en tant que traitement anticancéreux pour inhiber les intégrines

$\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$, dont l'expression est dérégulée dans de nombreux cancers (Reardon et al., 2011). Les phases 1 et 2 ont montré un effet antitumoral et une biocompatibilité intéressante (Scaringi et al., 2012), cependant lors de la phase 3 (essai CENTRIC) aucun bénéfice n'a été retrouvé à l'utilisation du Cilengitide (Stupp et al., 2010).

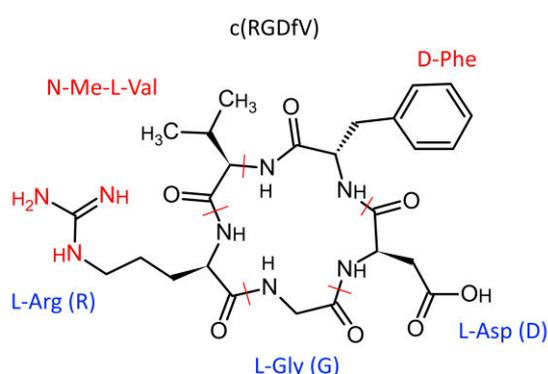


Figure 54 : Structure du Cilengitide. En Bleu est noté le nom des acides aminés composant le motif de reconnaissance, en rouge ceux permettant la cyclisation. Les traits rouges symbolisent les limites entre les acides aminés.

Cette molécule semble donc un candidat pharmacologique de choix pour cibler et inhiber CD51 et a ainsi été retenue pour la suite de nos expérimentations.

Détermination des partenaires d' αV dans les PW1⁺

Nous avons cherché à valider à l'échelle protéique l'expression de CD51 dans les cellules PW1⁺ et déterminer s'il existe une sous-unité beta plus particulièrement retrouvée dans ces cellules. CD51 faisant partie d'un hétéro dimère, nous avons souhaité déterminer si une des intégrines Bêta était préférentiellement exprimée dans le cœur et dans les cellules PW1⁺.

Electrobuvardage

Matériel et méthodes

Isolement de cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes

Les cardiomyocytes ventriculaires (CM) sont isolés à partir de ventricules de cœurs de souris adultes C57Bl6/j âgés de 8 à 10 semaines selon la méthode dite « langerdorff-free » décrite par Ackers-Johnson *et al.* en 2016 avec des modifications mineures.

Après anesthésie des souris par 50mg/kg de pentobarbital en intrapéritonéal, le thorax des animaux est désinfecté avec de l'éthanol puis incisé pour découvrir le cœur. L'aorte abdominale et la veine cave inférieure sont sectionnées avant d'injecter 8mL de solution de perfusion (130mM NaCl, 5mM KCl, 0,5mM NaH₂PO₄, 10mM HEPES, 10mM Glucose, 10mM BDM, 10mM Taurine) contenant de 5 mM d'EDTA à 37°C à une vitesse de 80mL/h directement dans le ventricule droit dans le but d'éliminer le sang et de chélater le calcium au niveau du cœur.

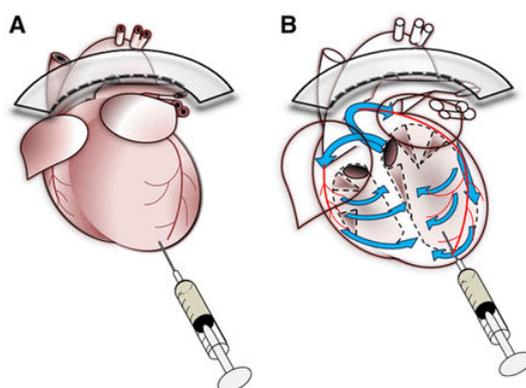


Figure 55 : Schéma d'un cœur de souris clampé (A) et perfusé, et schématisation de la circulation des solutions perfusées via le ventricule gauche.

L'aorte est ensuite clampée juste au-dessus des oreillettes (Figure 55 A) avant de prélever le cœur et de le rincer dans la solution de perfusion contenant de l'EDTA. Le cœur est ensuite placé dans une solution de perfusion contenant 1mM de MgCl₂ à 37°C et perfusé via le ventricule gauche (figure 55 B) avec 8 mL de cette même solution à un débit de 80mL/h. La perfusion du cœur se poursuit alors au même débit pendant 30min avec la

solution de digestion (collagénase II (Worthington, 105U/mL), collagénase IV (Worthington, 130U/mL, réf. : LS004189), protéase XIV (Sigma-Aldrich, 0,05mg/mL, réf. : P5147) dans la solution de perfusion contenant 1 mM MgCl₂) à 37°C et le cœur est dans le même temps immergé dans cette même solution de digestion. A la fin de la digestion, le cœur est déconnecté de l'aiguille (26G) et les oreillettes et le système vasculaire sont éliminés. Le cœur est dissocié à l'aide d'un scalpel avant d'homogénéiser le lysat pendant 1 à 2 min avec 2mL de solution de digestion à l'aide d'une pipette pasteur. Un volume de 3mL de solution stop (10 % SVF, 12,5μM CaCl₂ dans la solution de perfusion contenant 1mM MgCl₂) est alors ajouté pour arrêter l'action des enzymes avant de filtrer la suspension cellulaire obtenue sur un filtre de 100μm. Le filtre est rincé avec 5mL de solution stop avant de laisser sédimenter les CM pendant 10 à 15 min. A ce moment, le surnageant comprend la fraction non-myocytaire et le culot les CM.

La fraction non-myocytaire est alors prélevée délicatement et complétée avec 10mL de milieu de culture (DMEM, 10 % SVF, 1 % Peni/Strep) avant d'être centrifugée pendant 10min à 200g. Les cellules sont cultivées à 37°C pendant 24h avec 10mL de milieu de culture dans une atmosphère à 5 % de CO₂. Le milieu de culture est changé tous les jours et les protéines cellulaires sont extraites lorsque les cellules arrivent à confluence.

Le culot cellulaire contenant les CM est resuspendu dans 10mL de solution de remontée calcique (5 % BSA, 12,5μM CaCl₂ dans la solution de perfusion contenant 1mM MgCl₂) afin de réintroduire progressivement le calcium au sein des CM. Ainsi, le volume indiqué dans le tableau 6 d'une solution de CaCl₂ à 100mM est ajouté à la solution de remontée calcique contenant les CM toutes les 4 min.

Tableau 6 : Volume de solution calcique ajoutée pour 10mL de suspension cellulaire et concentration en calcium lors de la remontée calcique.

Volume de solution ajouté	Concentration finale
5 μ L	62 μ M
5 μ L	112 μ M
10 μ L	212 μ M
30 μ L	500 μ M
50 μ L	1000 μ M

A la fin de la remontée calcique, les CM sont sédimentés par centrifugation pendant 3 min à 20g et les protéines cellulaires sont extraites.

Extraction des protéines

L'extraction des protéines cellulaires est réalisée à 4°C pendant 1h sur un agitateur orbital, à l'aide soit d'un tampon RIPA (50 mM Tris pH 7,4, 150mM NaCl, 1 % NP40, 0,5 % sodium deoxycholate et 0,1% SDS) supplémenté en anti-protéases (Protéases inhibitor cocktail (P8340), Phosphatase inhibitor Cocktail 2 et 3 (P5726 & P0044), Sigma-Aldrich) et 1mM d'orthovanadate de sodium (Na_3VO_4) soit d'un tampon Urée/Thiourée (5M urée, 2M thiourée, 50mM DTT, 0,1 % [m/v] SDS, dans du PBS pH 7,4). L'incubation terminée, les lysats sont centrifugés à 4°C pendant 15min à 15 300g afin de sédimenter les débris cellulaires et l'ADN, le surnageant contenant les protéines.

Dosage de la concentration en protéines

La concentration protéique des échantillons est déterminée par la méthode de Bradford, à l'aide d'une gamme étalon de concentration croissante (0 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20 μ g/ μ L) d'Albumine sérique bovine (BSA) dans 1mL de réactif de Bradford à 20 % (Biorad, réf. : 500-0006). Pour les échantillons extraits dans un tampon Urée/Thiourée, la gamme étalon est supplémentée en tampon d'extraction Urée du volume d'échantillon testé.

L'absorbance est mesurée sur un spectrophotomètre Flexstation 3 (Molecular Devices) à 595nm.

Electrophorèse en conditions dénaturantes

L'étape de séparation des protéines est réalisée par électrophorèse en gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Les protéines sont dénaturées en présence d'un tampon de Laemmli (NuPAGE LDS Sample Buffer (1x final), ThermoScientific, réf : NP0007) et réduit dans un tampon au dithiothréitol (NuPAGE reducing agent (1x final), ThermoScientific, réf. : NP0009) à 70°C pendant 10minutes. Les échantillons sont déposés sur des gels d'acrylamide / Bisacrylamide (Nupage 4-12 % Bis-Tris Gel, ThermoScientific, réf. : NP0336/NP0335) dans une cuve remplie de tampon de migration Mes SDS 1x (Nupage MES SDS Running buffer, ThermoScientific, réf. : NP0002). La migration est réalisée à voltage constant à 100V pendant 3h.

Transfert des protéines sur membrane

Une fois la migration terminée, les protéines sont transférées à l'aide d'un système semi-sec (Trans-Blot Turbo, BioRad) sur membrane de nitrocellulose (0,2µm) (Trans-Blot Turbo Transfer pack, BioRad, réf. : 1704158/1704159). L'efficacité de transfert et l'homogénéité de dépôts sont estimés par une coloration transitoire au rouge ponceau (Ponceau S solution, Sigma réf. : P7170).

Immunomarquages et révélation

La membrane décolorée est saturée par une solution de lait écrémé (Lait 5 % (p/v), TBS-Tween (0,1M Tris [pH : 7,4], 0,1 % (v/v) Tween 20)) 1h à TA, afin de rendre inaccessible les sites de fixation aspécifiques de l'anticorps (Ac) primaire. Après cette étape de saturation, l'Ac primaire est ajouté, et la membrane incubée à 4°C pendant la nuit sous agitation lente. Les conditions d'hybridation des membranes avec les différents anticorps primaires sont résumées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Liste des anticorps utilisés pour la révélation des western blots et conditions d'incubation correspondantes.

Anticorps	Fabricant	Référence	Dilution	Solution
CD51	Bioss	BS-2203R	1/500	Lait 5%
ITGB1	Abcam	AB52971	1/1000	BSA 5%
ITGB3	Cell Signaling	13166-	1/1000	BSA 5%
ITGB5	Cell Signaling	3629	1/500	BSA 5%
ITGB8	Sigma	HPA027796	1/1000	BSA 5%

A la fin de l'incubation de l'Ac primaire, la membrane est rincée 3 fois pendant 10min dans une solution de TBS-Tween pour laver l'excédent d'Ac primaire non fixé. L'Ac secondaire couplé à la peroxydase de raifort (Âne anti-Lapin, GE Healthcare, réf. : NA934V) dilué au 1/5000 (ou 1/3000 pour CD51) dans une solution de Lait 5 % TBS-tween, est alors déposé sur la membrane et laissé à incuber sous agitation douce pendant 1h à TA. Finalement la membrane est une nouvelle fois rincée par 3 lavages au TBS-Tween pendant 10 minutes afin d'éliminer l'excédent d'Ac secondaire. L'étape de révélation est réalisée à l'aide du réactif ECL (*Enhanced Chemiluminescence*) Super Signal West Pico-Plus (ThermoScientific, réf. : 34580) et de la caméra ChemiDoc XRS⁺ (BioRad) et les images sont traitées avec le logiciel Image Lab (BioRad). Pour ce faire, la membrane est incubée pendant 5min dans l'obscurité en présence d'ECL et les images acquises à la caméra sont obtenues en mode incrémental et l'acquisition stoppée avant saturation du signal. Dans le cas où différents Ac primaires sont incubés sur une même membrane, une étape de déshybridation des Ac primaires et Ac secondaire déjà fixés sur la membrane est nécessaire. Pour cela, la membrane est incubée pendant 15min et à TA avec la solution de déshybridation (Restore plus western blot stripping buffer, ThermoScientific, réf. : 46430) puis lavée 3 fois pendant 10min avec le TBS-Tween avant de procéder à la saturation.

Résultats

Nous avons dans un premier temps vérifié dans des cellules isolées de cœurs entiers la répartition des intégrines αV et les différents partenaires connus. Pour cela nous avons isolés les cardiomyocytes des autres cellules (Ackers-Johnson et al., 2016) et nous avons utilisé des cellules de la lignée HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) comme contrôle positif de l'expression de CD51. Nous observons une expression de CD51 aussi bien dans les HUVECs que dans la fraction non myocytaire et une absence dans la fraction myocytaire (figure 56 A). Les partenaires connus (Figure 56 B) sont également retrouvés seulement dans la fraction non myocytaire et dans les HUVEC, sauf ITGB1 et ITGB3 qui semblent également exprimées de manière faible dans les cardiomyocytes. On observe également un décalage de masse apparente des protéines entre les échantillons de souris et les HUVECs sans doute dû à une glycosylation différente entre la souris et l'humain.

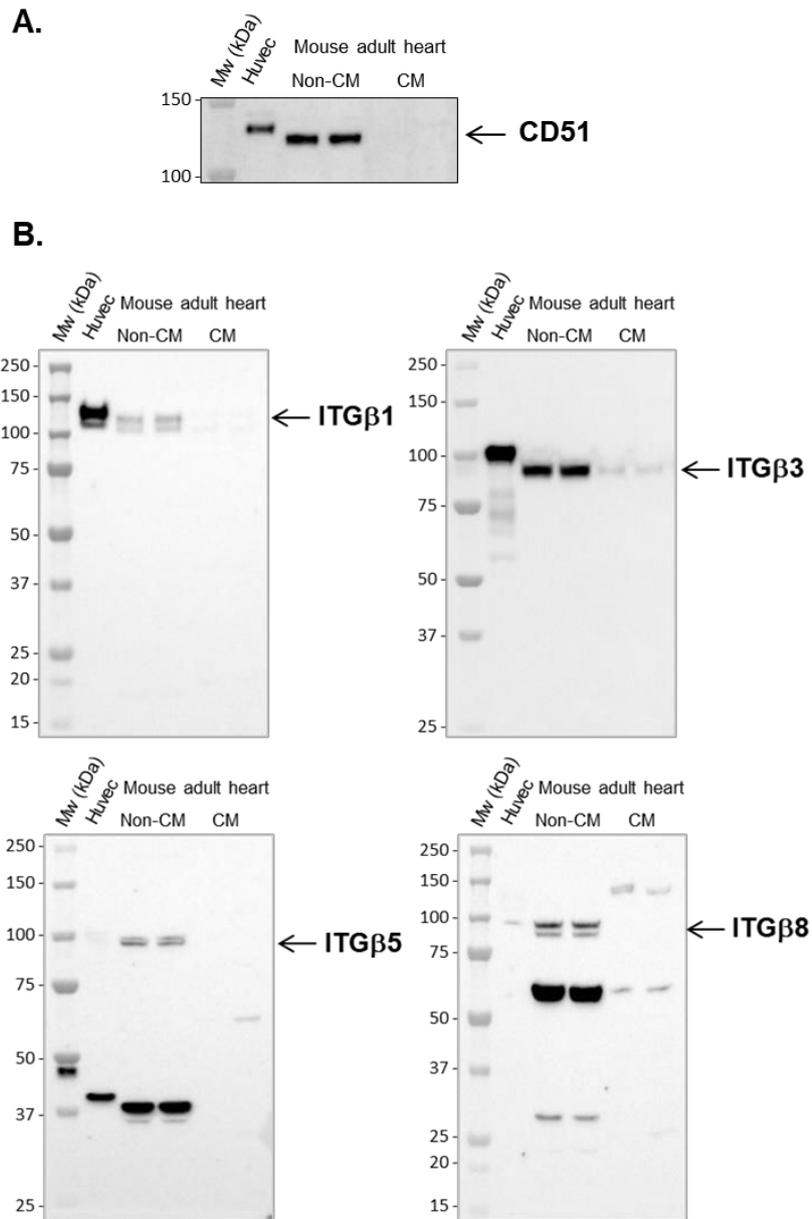


Figure 56 : Western blots dirigés contre les différentes intégrines dans des HUVECs, des cellules non myocytaires et des CM isolés de cœurs de souris. A) CD51 est retrouvé dans les HUVECS et la fraction non myocytaire mais absent des cardiomyocytes. B) Les HUVECS n'expriment que les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$. Les intégrines $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$ et $\beta 8$ sont retrouvées dans la fraction non myocytaires. Les cardiomyocytes expriment les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$.

Nous avons également cherché à savoir si dans les cellules PW1⁺ une intégrine bêta était privilégiée par rapport aux autres. Dans un premier temps nous avons regardé l'expression des différentes sous-unités bêta dans notre analyse transcriptomique (figure 57) qui nous permet de penser que les cellules PW1⁺ expriment majoritairement la sous-

unité $\beta 1$. Une confirmation physique est néanmoins nécessaire. Pour cela nous avons obtenu par FACS des cellules $PW1^+$ à partir 22 souris reproductrices $PW1^{nLacZ}$ et des cellules $PW1^-$ de 16 de ces mêmes souris. Des extraits protéiques de culture d'HUVECs ainsi que de cœurs de souris néonatales ont été utilisés comme contrôles positifs. Les mêmes conditions de western blotting ont été utilisées que précédemment. L'expression de CD51 est bien retrouvée (figure 58) dans les cellules $PW1^+$ et dans les extraits d'HUVEC et de cœurs de souris néonatales en comparaison aux cellules $PW1^-$ qui ne l'expriment pas. En ce qui concerne les sous unités bêta, l'expression de $\beta 1$ et $\beta 3$ a pu être confirmée dans les cellules $PW1^+$ et leur absence dans les cellules $PW1^-$. Il semblerait néanmoins que les intégrines $\beta 5$ et $\beta 8$ ne soient pas exprimées par les cellules $PW1^+$ et $PW1^-$. Ces observations sont majoritairement en corrélation avec l'étude transcriptomique sauf pour ITGB3, dont l'ARN n'avait pas été retrouvé. L'expression générale des intégrines semble faible mais la quantité de cellules $PW1^+$ récupérées est également faible, des expériences complémentaires sont en cours pour déterminer plus précisément les partenaires de CD51.

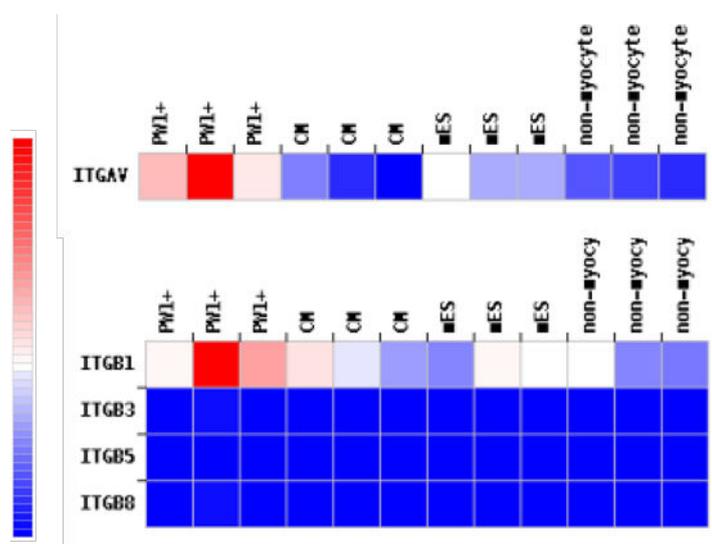


Figure 57 : Représentation graphique de la quantité d'ARN codant pour les différentes intégrines dans les différentes populations considérées lors de l'étude transcriptomique. L'échelle de couleur décrit une abondance du plus faible en bleu vers l'abondance la plus forte en rouge. Les cellules $PW1^+$ expriment de manière plus forte CD51 (ITGAV) que les autres cellules (en haut). Les intégrines $\beta 3$, $\beta 5$ et $\beta 8$ (ITGAB3, ITGAB5, ITGAB8) sont exprimées de manière faible par l'ensemble des populations, et l'intégrine $\beta 1$ (ITGB1) est exprimée de manière forte par les cellules $PW1^+$.

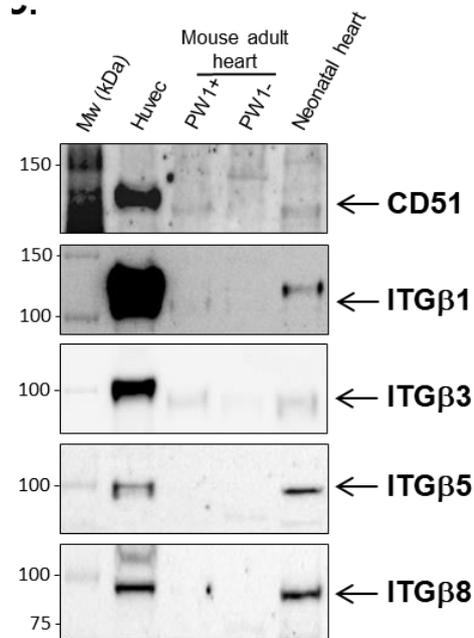


Figure 58 : Détails de Western blots. Les échantillons HUVEC et cœur de souris néonatale sont des contrôles positifs des différentes intégrines. L'expression de CD51 est retrouvée dans les cellules exprimant PW1, ainsi que les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ tandis que les intégrines $\beta 5$ et $\beta 8$ ne le sont pas.

Ces résultats nous permettent néanmoins de penser que les cellules PW1⁺ expriment les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$. La présence de $\beta 1$ est un élément qui nous permet d'émettre l'hypothèse d'une contribution de cette voie à la présence de la fibrose cardiaque post-infarctus médiée par ces cellules PW1⁺.

Inhibition des intégrines alpha-V

La disponibilité d'inhibiteurs des dimères d'intégrines contenant l'intégrine alphaV nous a donné l'opportunité de tester l'hypothèse que nous pouvions cibler ces cellules afin d'en limiter le caractère fibroblastique. Dans un premier temps nous avons récolté des cellules exprimant PW1 par FACS qui ont été mises en culture avant d'être traitées par doses croissantes de Cilengitide afin de valider notre hypothèse.

Expérience *in vitro*

Matériel et méthodes

Les cellules PW1⁺ obtenues par FACS sont mises en culture à une densité de 50 000 cellules par puits de P24 préalablement recouvert d'*attachment factor* (ThermoScientific, réf. : S-006-100) dans du milieu complet (DMEM, 10 % SVF, 1 % Peni/Strep). Le milieu est changé 24h après, puis à J5 post-tri. A ce moment-là le Cilengitide (Adooq, réf. : A12372) est ajouté à une concentration de 0 ; 30nM ; 300nM ; 1µM ou 10µM dans le milieu de culture. 24h après, le milieu est jeté, les cellules rincées par deux fois au PBS avant que les ARN ne soient extraits à l'aide du kit Pure Link RNA mini Kit (ThermoScientific, réf. : 12183025) en suivant les données du fabricant.

La rétro-transcription est réalisée à l'aide du kit *SuperScript IV First-Strand Synthesis System* (Thermo Scientific, réf. : 18091050) selon les données du fabricant. Les ARN extraits (entre 10pg et 5µG d'ARN) sont mis en présence de primer oligo dT (1µL à 50µM) (sélection des ARNm), d'hexamères aléatoires (1µL à 50ng/µL) et d'un mix de dNTP (1µL à 10mM) et incubés 5 minutes à 65°C sur un thermocycleur BioRad. L'incubation terminée, les tubes sont rapidement refroidis sur glace, puis sont ajoutés 4µL de tampon pour SuperScript IV (5x), 1µL de DTT 100mM, 1µL d'inhibiteur de ribonucléase et 1µL de reverse transcriptase SuperScript IV (200U/µL). Le mélange est ensuite incubé dans un thermocycleur Biorad en selon le programme suivant : 10minutes à 23°C, 10 minutes à 50°C puis 10 minutes à 80°C. Enfin 1µL de RNase H est ajouté et le tube incubé une dernière fois 20 minutes à 37°C.

La réaction de PCR est réalisée de manière quantitative sur un lightcycler LC 480 (Roche). Pour cela, 2µL d'ADNc obtenus à l'étape précédente de réverse transcription sont ajoutés à un mélange de 2,8µL d'eau ultrapure, 5µL de SYBR et 0,1µL de chaque primer sens et antisens des ARN codants pour des protéines considérées comme profibrotiques lors de notre précédente étude. La réaction de qPCR est ensuite réalisée en suivant le protocole suivant :

Paramètres utilisés pour la qPCR

Etape	Température	temps	Nombre de cycles
Pré-incubation			1x
	50°C	2min	
	95°C	2min	
Amplification			40x
	95	3sec	
	60	30sec	
Melting curve			1x
	95°C	5sec	
	60°C	1min	
	97°C	15sec	
cooling			
	40°C	30sec	

Résultats

Notre étude précédente nous avait permis de retrouver certains gènes profibrotiques surexprimés par les cellules PW1 après un infarctus. Nous avons obtenu des cellules PW1⁺ par FACS que nous avons mis jusqu'à 5 jours en culture et que nous avons traité à l'aide de Cilengitide (pour 24h) dans le but d'étudier la variation de l'expression des cibles profibrotiques *Col1A1*, *Col3A1*, *S100A4 (FSP1)*, *Acta2*, *FN1*, *MMP2* et *TGFRβ1*.

Nos résultats ne montrent pas une modification de l'expression de la plupart de ces gènes cependant pour *ACTA2*, *MMP2* et *TGFRβ1*, une tendance décroissante proportionnelle à la dose de Cilengitide est visible (figure 59). Cette tendance bien que faible peut indiquer un dosage trop faible de Cilengitide ou la nécessité de traiter des cellules issues d'un cœur malade ou recevant un stimulus pathologique, ce qui n'est pas le cas dans nos conditions expérimentales.

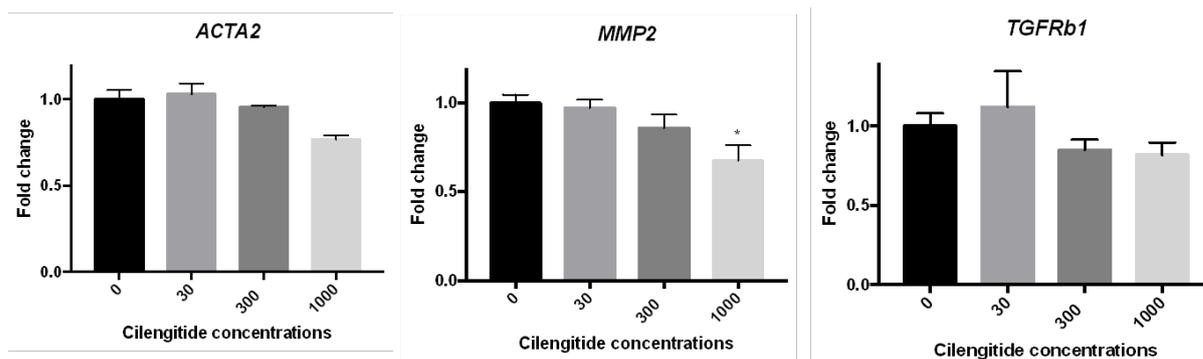


Figure 59 : Représentation statistique des données d'expression des gènes ACTA2, MMP2 et TGFR- β 1 en réponse au traitement au Cilengitide. Le traitement permet d'observer une tendance à la répression de l'expression des gènes profibrotiques, une dose suffisamment forte permettant de réduire de manière significative l'expression de la metalloprotéase 2 (MMP2).

Expériences *in vivo*

Nous avons ensuite mené une étude évaluant le traitement par du Cilengitide dans un modèle murin d'infarctus du myocarde.

Matériel et méthodes

36 souris mâles C57BL6/J obtenues chez Janvier Labs ont été réparties aléatoirement dans quatre groupes, ainsi que 14 souris mâles reportrices β -Gal (dans le but de faire des immunomarquages traçant le devenir des cellules PW1 dans les cœurs ischémiés) réparties dans les groupes IDM (tableau 8). Les animaux ont été élevés en animalerie agréée (plateforme CEF, CHU Pitié-Salpêtrière) et pourvus d'eau et de nourriture *ad libitum*. Les groupes « IDM » ont été dotés d'une population plus importante pour s'assurer d'un nombre suffisant de survivants, de manière à pouvoir réaliser des tests statistiques. En effet nous observons une mortalité d'environ 50 % de manière basale lors d'expériences similaires. Les animaux morts immédiatement au cours de l'intervention chirurgicale (induction anesthésique, erreur de geste chirurgical) ne sont pas comptabilisés lors des analyses. Les souris sont âgées de 7 semaines au début du protocole.

Tableau 8 : Répartitions des animaux dans les différents groupes.

	IDM	Ctrl
Cilengitide	16(+3 mort opératoires)	6
Véhicule (PBS)	16(+3 mort opératoires)	6

Le protocole d'essai de réduction de la fibrose post infarctus a été réalisé sur une durée de 14 jours (résumé dans la figure 60).

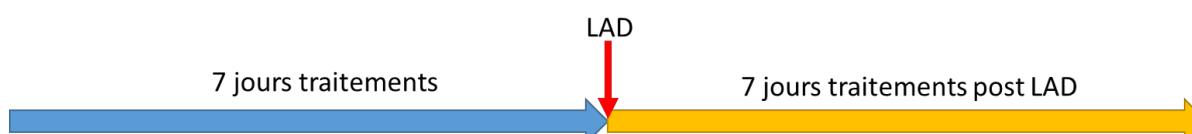


Figure 60 : Les animaux ont reçu une dose de Cilengitide (10mg/kg/jour dans un volume de 50µL) ou de solvant (50µL/jour) pendant 14 jours. Au bout de 6 jours, tous les animaux subissent une échographie cardiaque, et le lendemain les animaux du groupe « IDM » subissent une ligature de l'artère coronaire antérieure descendante. A 7 jours post IDM (14 jours après le début du traitement) une échographie cardiaque est réalisée, puis les animaux sont euthanasiés et leurs cœurs prélevés pour analyse.

Le Cilengitide est solubilisé la veille du premier traitement à 10mg/mL dans du PBS stérile à température ambiante sur un vortex par impulsions brèves. Une fois totalement solubilisé, la solution est filtrée à 0,22µm et aliquotée avant d'être stockée à -20°C jusqu'à utilisation.

Les animaux des groupes « Cilengitide » reçoivent une dose intrapéritonéale quotidienne de 10mg/kg/jour dans un volume total de 50µL (le volume de Cilengitide est complété par du PBS stérile). Les animaux des groupes « Véhicule » reçoivent un volume équivalent de solvant (PBS).

La veille de la chirurgie, les fonctions cardiaques des souris sont estimées par échocardiographies (plateforme PECEMV, la Pitié-Salpêtrière) et les animaux numérotés. Le lendemain, les animaux des groupes IDM subissent une ligature complète de l'artère coronaire descendante gauche (LAD). Ces opérations sont réalisées au sein du CEF par du personnel dûment qualifié. Les cages des animaux ayant subi un IDM sont pourvues de bouillie pour faciliter la prise alimentaire des animaux les plus fragiles.

Le traitement au Cilengitide est poursuivi pendant encore 7 jours. A J14 (7 jours post IDM), les paramètres fonctionnels cardiaques sont une nouvelle fois estimés par voie non-invasive puis les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale afin que leurs cœurs puissent être étudiés histologiquement.

Les cœurs sont placés 12h dans du formaldéhyde 16 % (Ted Pella, réf. : 18505) préalablement dilué à 4 % dans du PBS. Les cœurs sont ensuite transférés pour 24h dans une solution de sucrose 1M. Les cœurs sont ensuite enrobés de matrice de cryopréservation (OCT) (VWR, réf. : 00411243) puis congelés dans des vapeurs d'azote avant d'être transférés à -80°C pour conservation. Les blocs d'OCT contenant les cœurs ont été coupés à l'aide d'un cryostat Leica 3050s à une épaisseur de $6\mu\text{M}$. Une coupe est récupérée tous les $300\mu\text{M}$ du point de ligature jusqu'à l'apex (figure 61) et déposée sur des lames superfrost+ (ThermoScientific, réf : J1800AMNZ), une seule lame est utilisée par cœur. L'analyse est effectuée sur les 8 premiers niveaux sous la ligature de l'apex et les niveaux correspondants à l'apex (visible simplement sur la forme) sont exclus de l'analyse car représentant une concentration extrême et non représentative de remodelage fibreux.

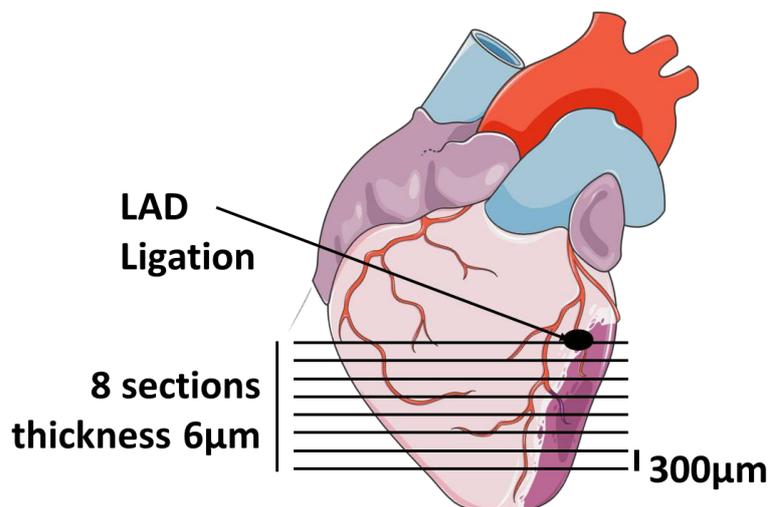


Figure 61 : Schéma représentant la localisation des coupes de cœurs utilisées pour calculer la surface occupée par la fibrose.

Les coupes sont ensuite colorées au rouge picrosirius pour en évaluer le pourcentage de fibrose. Pour cela, les lames sont incubées à 37°C pendant 30min pour sécher puis déshydratées par un bain d'éthanol 80 % pendant 5 minutes. Les coupes sont fixées pendant 24h par une solution de Bouin (Sigma, réf. : HT10132) puis rincées à l'eau courante pendant 15min et finalement 1min à l'eau distillée. Les lames sont ensuite immergées 2min dans une solution d'acide phosphomolybdique à 0,2 % avant d'être mises en présence du colorant rouge picrosirius pendant 1h. Enfin la coloration est fixée par un bain de 2min d'acide chlorhydrique à 0,01N, puis les coupes déshydratées par des bains successifs de 2min dans de l'éthanol (75 % ; 95 % ; 100 %) puis deux bains de xylène pur. Pour finir, le montage sous lamelle est réalisé avec un milieu de montage Eukitt quick hardening mounting medium (Sigma, ref. 03989).

La prise d'image est réalisée automatiquement à l'aide d'un microscope Perkin-Elmer Vectra 3 (Plateforme d'histologie de l'unité UMR 970, PARCC), et les images de 8 coupes les plus proximales du site de ligature sont analysées à l'aide de ImageJ et d'une Macro d'automatisation de calcul de surfaces développée par Jose Vilar (UMR 970, PARCC)

Résultats

Cette étude d'inhibition des intégrines αV dans le contexte d'infarctus du myocarde a pour but d'évaluer si le ciblage des cellules PW1⁺ du cœur peut être réalisé par l'intermédiaire de l'intégrine αV que nous avons montré spécifique des cellules exprimant PW1 dans le cœur.

L'analyse des données de survie des souris traitées au Cilengitide face à celle des souris n'ayant reçu que le solvant montre une amélioration significative de la survie à 7 jours post infarctus (figure 62). La survie des souris traitées avec le Cilengitide s'établit à 68,75 % tandis que la survie des animaux non traités s'élève à 43,75 % ($p < 0,05$). Ceci est un premier résultat important car les stratégies « anti-fibrotiques » peuvent être associées à un retard de développement de la fibrose de remplacement, c'est à dire la fibrose qui vient remplacer les zones vidées des cardiomyocytes nécrosés suite à l'ischémie. Dans ce

cas, il existe un sur-risque de rupture cardiaque qui doit se traduire par une surmortalité précoce chez les animaux traités. Nous n'observons pas cet événement dans notre expérience.

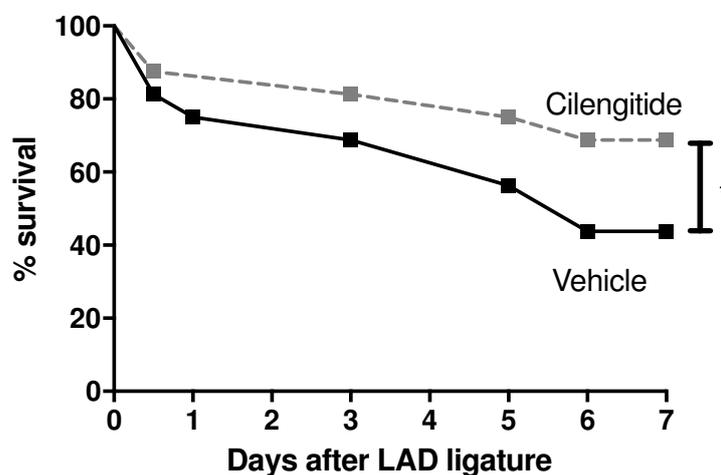


Figure 62 : Graphe représentant la survie des animaux traités au Cilengitide (gris) et des animaux non traités (noir) au cours de l'expérience. Une amélioration significative est visible avec un traitement inhibant les intégrines.

Au niveau des paramètres cardiaques, la présence de l'infarctus réduit très significativement les fonctions cardiaques dans les 2 groupes. Cependant, le traitement par le Cilengitide permet néanmoins une réduction moins importante des fonctions cardiaques et de la fraction d'éjection en particulier. Le traitement permet de conserver plus de 10 % de cette fraction d'éjection. En effet, la FE moyenne s'élève à 34,27 % pour les souris non traitées tandis que la moyenne de la FE pour les souris traité s'élève à 46,56 % ($p < 0,01$). Les souris traitées mais n'ayant pas subi de LAD ont une FE similaire au groupe non traité, indiquant que le Cilengitide n'a pas d'effets visibles sur les fonctions cardiaques d'un organisme sain (figure 63). De même, nous observons une survie normale dans les groupes contrôles recevant 14 jours de cilengitide ou de véhicule (PBS).

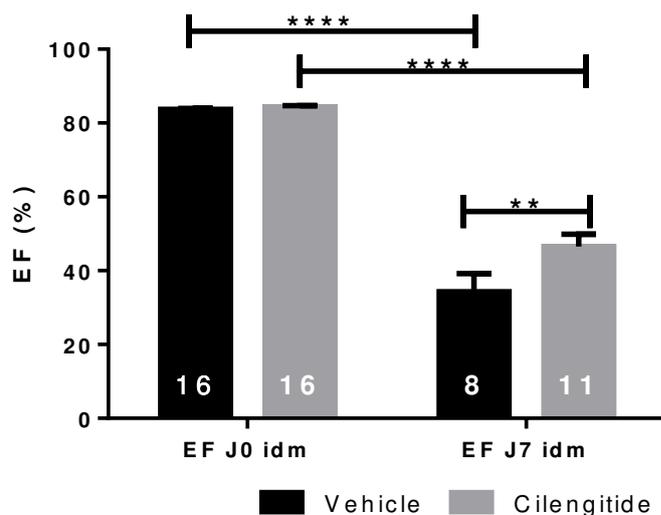


Figure 63 : Représentation statistique des données de fonctions cardiaques : les animaux traités (gris) et non traités (noir) sans IDM (gauche) sont comparables en termes de fonction cardiaque ($p < 0,0001$). Les animaux ayant subi un IDM (droite) voient leur FE baisser significativement ($p < 0,0001$), cependant les animaux traités ont des fonctions cardiaques significativement ($p < 0.01$) moins diminuées que les animaux non traités.

Afin de vérifier que nous avons bien ciblé les cellules PW1⁺, nous avons observé si le traitement à l'aide de l'inhibiteur avait un effet positif sur la fibrose cardiaque. Les cœurs des souris ont été prélevés et des cryosections ont été réalisées avant d'être colorées au rouge picosirius afin de distinguer les dépôts de matrice extracellulaire (en rouge) des zones musculaires (en jaune) (figure 64). L'analyse des 8 sections de cœurs de 4 animaux dont les fonctions cardiaques sont le plus proche de la moyenne de chaque groupe sont analysées afin d'en mesurer le pourcentage de fibrose (figure 65). Le traitement permet d'obtenir une réduction significative ($p = 0.002$) de la taille de la zone infarctée par rapport au groupe contrôle.

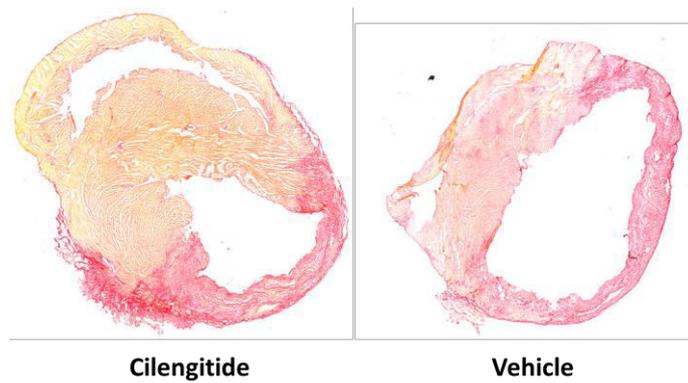


Figure 64 : Microphotographies représentatives de coupes de cœur colorées au rouge Sirius provenant de souris traitée au Cilengitide (à gauche), ou non traitée (à droite). Il semble que la zone infarctée soit de taille réduite et le muscle moins atteint dans les conditions traitées par rapport aux conditions contrôles, néanmoins des mesures fiables doivent être réalisées afin de confirmer ces observations.

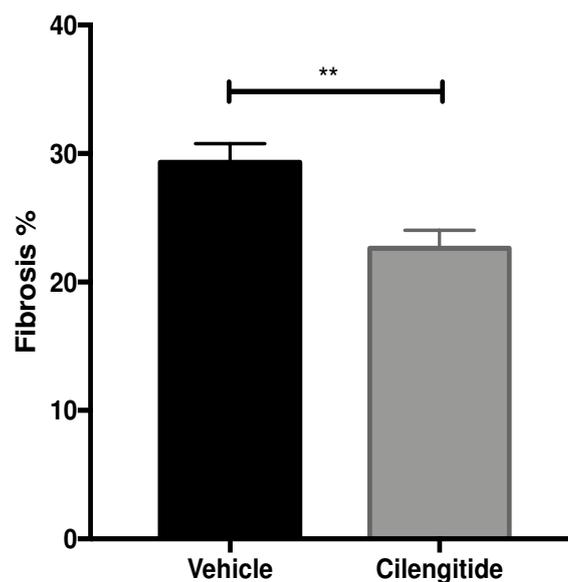


Figure 65 : Représentation statistique des mesures de fibrose cardiaque post infarctus en conditions traitées au Cilengitide (à droite) comparée aux conditions IDM non traitées (à gauche). Une réduction significative de la fibrose est visible dans les cœurs de souris traitées au Cilengitide ($p < 0,01$) ce qui représente une baisse de 7 % de fibrose entre les conditions traitées (21,34 % de fibrose) et les conditions non traitées (28 % de fibrose).

L'observation des coupes histologiques semble montrer la présence d'une fibrose cicatricielle au lieu de l'infarctus, mais une limitation franche de la fibrose myocardique interstitielle en réaction à l'infarctus dans les animaux traités par Cilengitide. Ceci est en accord avec les données de survie.

La mesure des tailles d'infarctus et la quantification de la fibrose interstitielle sont actuellement en cours.

Conclusions

Le fait que la population progénitrice cardiaque PW1⁺ exprime également une intégrine spécifique est une découverte qui nous a permis dans un premier temps de trier et de récolter spécifiquement ces cellules. Dans un second temps nous nous sommes intéressés à cette intégrine comme une cible pharmacologique potentielle nous permettant de moduler le comportement physiopathologique progéniteurs. L'étude *in vitro* nous a permis de valider cette idée. L'étude *in vivo* nous a permis de montrer qu'il était possible d'inhiber l'expansion de la fibrose cardiaque post-infarctus ; et que cette approche se traduit par une fonction cardiaque préservée et une survie plus importante. Ces expériences nous montrent à présent que notre approche mérite d'être poursuivie.

Des analyses supplémentaires sont néanmoins nécessaires pour mesurer s'il y a une réduction de la fibrose interstitielle, une modification de la densité capillaire et de la taille de l'infarctus. Une question demeure également, l'action du Cilengitide se traduit-elle par une inhibition de la prolifération et donc du nombre de cellules PW1⁺ progénitrices ? Est-ce un effet d'inhibition de la sécrétion des facteurs pro-fibrotiques ? ou bien est-ce une inhibition de la transition vers un phénotype fibroblastique ? Nous obtiendrons prochainement des résultats complémentaires permettant de répondre à ces questions.

PW1 + CELLS CONTRIBUTE TO CARDIAC FIBROSIS THROUGH α_v INTEGRIN

Short title: α_v -integrin in cardiac PW1+ cells

Olivier Claude¹ PhD, Marion Bouvet¹ PhD, Maguelonne Roux², Nathalie Mougenot³ PhD, Sophie Nadaud PhD², Catherine Blanc⁴ PhD, Solenne Chardonnet⁴ PhD, Cedric Pionneau⁴, Claire Perret² MSc, Sébastien Dussaud¹ PhD, David-Alexandre Trégouët² PhD, Giovanna Marazzi¹ MD, David Sassoon¹ PhD and Jean-Sébastien Hulot¹ MD PhD

1. Paris Cardiovascular Research Center PARCC, Inserm UMR970, Paris, France
2. Sorbonne-Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, Institute of Cardio metabolism and Nutrition (ICAN), Paris, France
3. Sorbonne-Universités, UPMC Univ Paris 06, PECMV, UMS28, Paris, France
4. Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Inserm, UMS Omique, Paris, France.

Funding: This work was supported by a grant from the Fondation Leducq (grant 13CVD01, CardioStemNet project) and Era-CVD (ANR-16-ECVD-0011-03, Clarify project) as well as the ANR REVIVE (Laboratoire d'Excellence) to DS.

Disclosure: Authors have nothing to disclose. There are no relationships with industry.

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE:

Pr Jean-Sébastien Hulot; UMR 970, PARCC, 56 Rue Leblanc, Paris ; Tel: +33 1 56 09 20 17 ,
Fax : +33; email: jean-sebastien.hulot@aphp.fr

ABSTRACT

Activated cardiac fibroblasts are essential for the production of extracellular matrix proteins that accumulate during cardiac fibrosis, and PW1⁺ cardiac adult stem cells were recently proposed as a cellular source of fibroblasts in the ischemic hearts. Here we identify α V-integrin as an essential regulator of PW1⁺ cardiac adult stem cells fibrogenic behavior. Using a combination of transcriptomic and proteomic approaches, we identified the presence of α V-integrin in the plasma membrane of cardiac PW1⁺ cells. Expression analyses revealed α V-integrin expression as highly sensitive and specific to cardiac PW1⁺ cells. Inhibition of α V-integrin reduce the profibrotic gene expression profile and the ability to differentiate into fibroblasts of cardiac PW1⁺ cells. Cardiac PW1⁺ cells showed a predominant expression of α V β 1 complex, a putative key mediator of organ fibrosis through TGF-beta activation. Consequently, pharmacological blockade of α V-containing integrins improved cardiac function and survival after MI by attenuating the extension of reactive cardiac fibrosis. These data identify a new mechanism that regulates cardiac fibrosis in response to an ischemic injury and suggest that pharmacological targeting of α V-integrin may provide clinical benefit in the treatment of cardiac ischemia.

Key words: Ischemic cardiomyopathy; Cardiac stem cells; Myocardial infarction; Fibrosis;

ABBREVIATIONS

α -SA	Alpha-sarcomeric actinin
α -SMA	Alpha smooth muscle actin
β -gal	Beta-galactosidase
bFGF	Basic fibroblast growth factor

BM-MSC	Bone Marrow – Mesenchymal Stem Cells
BRDU	Bromodeoxyuridine
C12FDG	5-Dodecanoylaminofluorescein Di- β -D-Galactopyranoside
CFU	Colony forming units
CM	Cardiomyocytes
CPC	Cardiac progenitor cells
CSC	Cardiac muscle Stem Cells
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
ECM	Extracellular matrix
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FSP1	fibroblast specific protein 1
LacZ	Bacterial beta-galactosidase
LAD	Left anterior descending coronary artery
HF	Heart failure
mESC	mouse Embryonic Stem Cells
MI	Myocardial infarction
MSC	Mesenchymal stem cells
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR α	Platelet-derived growth factor receptor alpha
RBCL	Red Blood Cell Lysing
RNA-seq	RNA sequencing
Sca-1	Stem cell antigen 1
SMC	Smooth muscle cells

INTRODUCTION

Heart failure (HF) remains a leading cause of mortality and hospitalizations worldwide and represents a heavy health care financial burden ¹⁻⁶. Current pharmacological treatments limit the peripheral consequences of cardiac dysfunction but there is a limited number of therapeutics that impact the primary adverse cardiac remodeling at the myocardial level. While the etiology of HF is diverse, HF is typically associated with a range of physiological and morphological changes including fibrosis of the myocardium ⁷⁻⁹. Indeed, cardiac fibrosis is characterized by the excessive production and deposition of extracellular matrix (ECM) proteins into the myocardium which leads to normal tissue architecture disruption, reduced tissue compliance, mechanical and electrical dysfunction and which eventually accelerates the progression to HF ^{10,11}. However, as the mechanisms contributing to cardiac fibrosis are incompletely understood, there is currently no effective anti-fibrotic therapeutic strategy that could complement the current therapies for HF ^{9,11,12}.

Activated cardiac fibroblasts are essential for the production of ECM proteins that accumulate during cardiac fibrosis, however, recent studies have established that cardiac fibroblasts represent a very heterogeneous cell population ¹⁰⁻¹⁴. The exact nature of activated fibroblasts and consequently the sources of cardiac fibrosis remain poorly understood ^{9,12}. Different mechanisms have been reported including proliferation and activation of resident fibroblasts ¹⁵, transformation of endothelial and/or epicardial cells after injury through endothelial-mesenchymal transition and epithelial-mesenchymal transition respectively ^{16,17}, migration of hematopoietic bone marrow-derived cells and perivascular cells ¹⁸. Another model proposes that tissue resident progenitor populations activate in response to stress and become a major cellular source of organ fibrosis, including in the heart. In a recent study, we have identified a novel population of cardiac cells that reside in the myocardium and have a fibrogenic behavior in response to cardiac ischemic injury ¹⁹. This population was identified based upon the expression

of the pan-stem cell marker, Pw1/Peg3 (referred hereafter as PW1)^{20,21}, using a transgenic Pw1-beta galactosidase reporter mouse model. Taking advantage of the strong and produrant expression of the β -gal reporter enzyme, we found that a significant proportion (~22%) of fibroblasts were derived from PW1 expressing cells in ischemic hearts, therefore suggesting that cardiac PW1⁺ cells can contribute to cardiac fibrosis by directly giving rise to fibroblasts thus representing a source of additional ECM.

PW1 is a transcription factor and the identification of PW1⁺ cells is currently restricted to the use of transgenic reporter mouse models as no specific cell surface markers have been reported thus far. In this study, we used a combination of transcriptomics and proteomics approaches to identify specific cell surface markers expressed in cardiac PW1⁺ cells under physiological and pathological situations. Using this strategy, we identified CD51 (*Itgav*, or α V-integrin) as present in >90% of cardiac PW1⁺ cells. We further demonstrated that CD51 predominantly tags PW1⁺ cells in the myocardium and can be used as a cell surface marker to efficiently identify and sort PW1⁺ cells. However, CD51 is an α V-integrin subunit, a subset of integrin family cell adhesion receptors that were recently suggested as central mediators of organ fibrosis through TGF-beta activation^{22,23}. We further found that CD51 participate in the cardiac PW1⁺ fibrogenic behavior through the expression of an α V β 1 complex. Blockade of α V-integrin results in a significant reduction in cardiac PW1⁺ fibrotic activation as well as in cardiac fibrosis post-MI in vivo.

METHODS

All procedures and animal care were approved by our institutional research committee and conformed the animal care guideline in Directive 2010/63/EU European Parliament.

Myocardial infarction by LAD ligation

Male 8 weeks-old C57BL/6 or PW1-reporter (PW1^{nLacZ}) mice were anesthetized in an induction chamber with 2% isoflurane mixed with 1.0 L/min 100% O₂ and placed on a supine position on a heating pad to maintain body temperature. The mice were intubated with endotracheal tube and then connected to a rodent ventilator (180 breaths/min and a tidal volume of 200 µl). During surgical procedure anesthesia is maintained at 1.5-2% isoflurane with O₂. The chest was accessed from the left side through the intercostal space and the pericardium incised. The left anterior descending coronary artery (LAD) was exposed and encircled with a 8.0 prolene suture at the apex of the left ventricle. The suture was briefly snared to confirm the ligation by blanching the arterial region. Mice were analyzed 7 days after LAD permanent ligation.

Male C57BL/6J mice (Janvier labs) or PW1-reporter (PW1^{nLacZ}) mice received Cilengitide at 10mg/kg/day (Adooq bioscience, ref: A12372) or vehicle for 14 days. LAD surgery has been performed at day 7 (figure 6). Mice were divided in 4 groups: MI-CIL (Cilengitide), MI-Veh (vehicle), Ctrl-CIL and Ctrl-Veh. At Day 14, animals were euthanatized and hearts were carefully collected, incubated for 2h at 4°C in 4% Formaldehyde solution (Ted Pella) then 24h in 30% sucrose/PBS solution before OCT embedding and frozen in liquid nitrogen vapours. Echocardiographic measurements were taken at days 0 and 7 to assess cardiac function.

Cell isolation and fluorescence-activated cell sorting

Animals were injected with heparin (100 UI/25 g) before euthanasia. The right atrium was carefully nicked with surgical scissors and the heart was perfused with 10 mL of PBS (Gibco) through the right ventricle to remove the blood. After collecting the heart, the atria were

trimmed away and the ventricles were finely sliced (0,5-1mm³). Cardiac cells were dissociated at 37°C for 30 min by enzymatic digestion with 480U/mL collagenase II (Worthington) in DPBS (GIBCO). The digestion was stopped with DMEM (Life Technologies) supplemented into 10% FBS (Sigma) and 1% penicillin/streptomycin (P/S; Life Technologies) and the cell suspension was filtered through 100 µm Falcon cell strainer before centrifugation at 416 g for 10 min at 4°C. The cell pellet was re-suspended in 500 µL of Red Blood Cell Lysing (RBCL) Buffer to lyse red blood cells at RT for 30 sec. DPBS was added before 10 min centrifugation in same conditions as above. The cell pellet was then re-suspended in 300 µL of HBSS (Gibco) containing 1% FBS (HBSS-1% FBS) to perform immunostaining for 45 min on ice in dark (see on table 1 the list of antibodies used for immunostaining). After incubation, HBSS-1% FBS was added and cells centrifuged at 416 g for 10 min at 4°C to perform PW1⁺ cells staining. For this, 300 µL of HBSS-1% FBS containing 60µM of 5-Dodecanoylaminofluorescein Di-β-D-Galactopyranoside (C₁₂FDG, ThermoFisher Scientific) a substrate for β-gal detection by flow cytometry was added on cells then incubated in dark at 37°C for 1h under constant agitation. Reaction was stopped by the addition of HBSS-1% FBS. After cell centrifugation, the pellet was re-suspended in 200 µL of HBSS-1% FBS, the viability dye propidium iodide (Sigma) was added and the samples were filtered through a 50 µm Filcon (BD bioscience) just before the analysis.

Viability threshold was determined by comparing conditions with and without viability dye. All immunostained populations were obtained by comparing signals from unstained cells and Fluorescence minus one conditions. B-Gal activity threshold was obtained by comparing B-Gal negative and positive cells.

RNA-seq

300 ng of total RNA extracted from freshly isolated cells were used to perform library preparation with SureSelect Strand-Specific RNA kit (Agilent), according to the manufacturer's instructions. The resulting library was quality checked and quantified by peak integration on Bioanalyzer High sensitivity DNA labchip (Agilent). A pool of equal quantity of 12 purified libraries was done, each library being tagged with a different index. miRNAs pool libraries were finally sequenced on Illumina HiSeq 1500 instrument using a rapid flowcell. The pool was loading on 2 lanes of the flowcell. A paired End sequencing of 2x100bp was performed.

After discarding reads that did not pass the Illumina filters and trimming sequenced bases with low quality ($q < 28$) using the Cutadapt program²⁴, we restricted our downstream analyses to reads with length greater than 90bp. Selected reads were mapped to a murine reference transcriptome that was generated by the RSEM package²⁵ from the full mouse reference genome and the gtf transcript annotations file from ENSEMBL²⁶. Alignment and estimation of transcripts abundance in each of the 12 processed samples were performed using the RSEM program. Transcripts with abundance counts higher than 10 in more than 2 samples ($N = 36,948$) were considered as expressed and kept for further analysis. Abundances of transcripts assigned to the same gene were combined together leading to the profiling of 16,403 gene expressions. A principal component analysis was then performed on the 12 expression profiles and revealed that the first three principal components explained ~84% of the total variability of gene expression profiling. The percentage of variability explained by the first, second and third component were 39.4%, 28.5% and 15.7%, respectively. Analyses were conducted under the R environment (version 3.2.2).

A Galaxy 15.10 instance was locally installed on a server machine. WolfPsort, TMHMM, and SignalP were obtained from CBS prediction servers (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>). As NetNEs was not implemented in Galaxy, NLStradamus and PredictNLS were used in

replacement. Each population RNASeq was then processed through a pipeline designed to select sequences containing a signal peptide, at least 1 transmembrane segment, no nuclear export signal and a theoretical presence at the plasma membrane. Intentionally loose filters were chosen as putative membranome were manually quality checked for false positive sequences and compared to several databases (Qiagen's Ingenuity Pathway Analysis, Uniprot, Ensembl). Finally, all samples were compared and only sequences found only in PW1⁺ cells but insensitive to myocardial infarction.

Proteomics

PW1⁺ FACS sorted cells samples were prepared for MS analysis with an adapted protocol from [3] as too few cells were recovered to perform the complete protocol. Ca. 300 000 PW1⁺ sorted cells were centrifuged at 500 g for 10 min at 4°C. Pellet was lysed in 100 µL of lysis buffer (ref ou composition) and incubated for 15 min on ice. A mechanical cell disruption was then performed with 20 up and downs with a dounce potter. Samples were then centrifuged at 4°C, 10 min at 600 g. Supernatant was then centrifuged at 100 000 g for 25 min at 4°C. Pellet was rinsed with 150 µL of rinse buffer and centrifuged in the same conditions as above. The final pellet was resuspended with 150 µL of NH₄HCO₃ 50 mM and homogenized. Membranous proteins were analysed on SDS-PAGE gels (4% stacking and a 12% running gel) stained with a MS-compliant silver nitrate staining protocol. All proteins were excised in one large strip which was minced in 1 mm³ cubes just before protein reduction, alkylation (DTT, Iodoacetamide) and trypsin digestion (500 ng in AMBIC 50 mM, ACN 5%). Finally, peptides were extracted with 20 µL of ACN 30% FA 0,1%. Mass spectrometry analysis was performed with 4 µL injections on an online LC-MS composed by a nanoHPLC Dionex Ultimate 3000 and a Thermofisher QExactive + with a 2h gradient. All the proteomic steps were done under the supervision of the proteomic facility from La Pitié-Salpêtrière (P3S, UPMC), the LC-MS

analysis has been performed on the proteomic facility of Paris-Descartes university 53P5, Paris Descartes).

The software used was X!Tandem (Ver: 2015.04.01.1), using X!Tandem pipeline (Ver: 3.4.3) and the Uniprot reference proteome used was downloaded on Dec. 12, 2016. Standard contaminants were removed. Filter applied: Proteins with at least 1 peptide with e value <0,05; FDR peptide = 0,128; FDR protein = 0,95. Final protein score $\text{Log}(e \text{ value}) < -2$. Final results gave 1679 groups with 1831 subgroups.

The protein list obtained from LC-MS analysis has been manually filtered to keep only plasma membrane proteins. This observed PW1⁺ membranome has been confronted with the putative PW1⁺ membranome. Only proteins found in both lists were treated. Potential candidates were then selected according to literature and antibodies validated for flow cytometry & immunofluorescence staining availability.

Western blot analysis

Proteins from mouse heart were extracted from frozen tissues with Dounce-Potter homogenization into ice-cold RIPA buffer (50 mM Tris pH7.4, 150 mM NaCl, 1% Igepal CA-630, 50 mM deoxycholate, and 0.1% SDS) containing antiproteases (Sigma-Aldrich), serine/threonine and tyrosine protein phosphatase inhibitors (Phosphatase inhibitor Cocktail 2 and 3, Sigma-Aldrich) and 1 mM Na_3VO_4 or with urea-thiourea buffer (5 M urea, 2 M thiourea, 50 mM DTT, 0.1% [w/v] SDS in PBS pH 7.4). After 1h incubation at 4°C, the homogenate was centrifuged at 15 300 g for 15 min at 4°C and the supernatant containing proteins was collected. Protein concentrations for all samples were determined with a Bradford-based method protein assay (Biorad).

After sorting, the heart PW1⁺ cells of 22 mice and the heart PW1⁻ cells of 16 mice were pooled and centrifuged at 500 g for 15 min at 4°C and lysed in urea-thiourea buffer. Proteins were extracted as describe above.

Cardiac myocytes (CM) and non-cardiomyocyte (non-CM) cells were isolated from the adult mouse heart as previously described with minor modifications (Ackers-Johnson *et al*, 2016). After cell collection, CM were lysed in RIPA and urea-thiourea buffer for protein extraction as describe above and non-CM were plated in growth medium (DMEM 10% FBS 1% P/S). Proteins were extracted in RIPA and urea-thiourea buffer when cells reached 80% confluence. Proteins (10-30 µg) were mixed with NuPAGE™ LDS sample buffer, NuPAGE™ Sample Reducing Agent and extraction buffer, incubated at 70°C for 10 min and then loaded onto a gel lane of a NuPAGE™ Novex® 4-12% Bis-Tris gel (Life Technologies). After 3h running at 90 V with NuPAGE™ MES SDS running buffer (Life Technologies), proteins were transferred to nitrocellulose membranes and blocked for 1h in Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20 (TBS-Tween) containing 5% skim milk with constant shaking. Membranes were then incubated with primary antibodies specific for CD51 (Bioss), Integrin beta 1 (Abcam), Integrin beta 3 (Cell Signaling), Integrin beta 5 (Cell Signaling) and Integrin beta 8 (Sigma-Aldrich) diluted in 5% BSA/TBS-Tween overnight at 4°C with constant shaking. Membranes were then washed with TBS-Tween and incubated for 1h at room temperature (RT) with horseradish peroxidase labelled secondary antibodies diluted in 5% skim milk or BSA/TBS-Tween for 1h. Membranes were then washed again with TBS-Tween and then incubated for 5 min SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Life Tecnologies) before imaging with the Chemidoc® XRS+ camera (Biorad) and the Image Lab™ software.

Pharmacological inhibition of Pw1⁺ cells *in vitro*

FACS sorted PW1⁺ or PW1⁻ cells were plated at the density of 25 000 cell per cm² in culture plates coated with attachment factor (ThermoFisher Scientific). Cells were left to adhere overnight with 0.5 mL of growth medium (DMEM 10% FBS 1% P/S). The culture medium was changed the day after. At day 5, cells were incubated with 0, 30 nM, 300 nM, 1 μM or 10μM of cilengitide or 2 μg/mL of CD51 blocking antibody (clone RMV7, Ebioscience). At day 6, medium was removed, and cells were washed twice with PBS. Cells were then lysed and RNA extracted followed by an RT-PCR. A Q-PCR was finally performed on selected fibrosis markers.

Statistical analysis

The data of this manuscript were expressed as mean±SEM. When comparing more than 2 groups, quantitative data were analyzed using one-way ANOVA and pair wise comparisons with Tukey's test for multiple comparisons. The Mann Whitney U test was used for comparing continuous variables between 2 groups. A log rank (Mantel-Cox) test was used to compare survival between groups. P-values <0.05 were considered significant.

RESULTS

Bioinformatic analysis defines cardiac PW1⁺ cells putative membranome

We first characterized the transcriptome profile of cardiac PW1⁺ cells by RNA-sequencing. For this purpose, cardiac PW1⁺ were FACS-isolated from fresh cardiac tissues using our PW1^{nLacZ} reporter mouse model using C₁₂FDG, a fluorescent substrate for β-galactosidase activity. We obtained cardiac PW1⁺ from normal hearts as well as from ischemic hearts (i.e., seven days after MI). We then used filtered, aligned, quality-controlled RNA-seq output files to predict

amino acid sequences of the corresponding genes and we then used a series of bioinformatics algorithms to identify putative membrane proteins (Fig 1a). Briefly, we considered proteins with a predicted N-terminal endoplasmic reticulum targeting signal peptide and predicted transmembrane domains but with no intracellular localization signals (i.e., no ER retention signal motif and no mitochondrial targeting peptide nor Nuclear export signal). By progressive filtering, we thus generated a list of 2040 candidate expressed in cardiac PW1⁺ cell membranes in both normal and ischemic conditions (Fig 1b). The characteristics of these 2040 candidates were further screened in available databases to identify 913 candidates as more likely expressed in the plasma membrane of cardiac PW1⁺ cells (Fig 1c). We then performed the same strategy to define the putative surface membranome of other cell types (i.e., cardiomyocytes, non-myocytes heart fractions and embryonic stem cells) and performed a last screen to limit our list to 378 candidates that were only observed in the datasets obtained in cardiac PW1⁺ cells (Fig 1c). Functional enrichment analysis of this short list of cardiac PW1⁺-specific and condition-insensitive cell surface markers identified an important number of transmembrane receptors, transporters, and a smaller proportion of ion channels and enzymes (Fig 1d). However, the molecular function was not described for the majority of the identified candidates.

Proteomic analysis cross-validates the expression of 9 cell surface proteins in cardiac PW1⁺ cells

In parallel of the transcriptomics approach, we also performed a proteomic analysis of FACS-isolated cardiac PW1⁺ cells using mass spectrometry (Fig 2a). We identified the expression of 1885 proteins which were further analyzed in available databases in order to restrict the dataset to 230 proteins with plasma membrane location. We then made a direct comparison of the transcriptomics and proteomics datasets and confirmed the cross-identification of 9 candidates with both approaches (Fig 2b). Among these 9 cell surface proteins, we found 3 transporters, 4

receptors and 2 enzymes and most of these candidates were involved in cell motility, adhesion to the matrix and response to wounding (Fig 2c,d). Five of these candidates were already described in non-cardiac cells as plasma membrane clusters of differentiation (i.e., CD51-*Itgav*, CD140a-*Pdgfra*, CD172a-*Sirpa*, CD39-*Entpd1* and CD163) and were further considered for the remainder of our study.

Itgav (CD51) is highly expressed in cardiac PW1⁺ cells

The expression of these 5 new cell surface markers was analyzed by cytometry in C₁₂FDG⁺ cells isolated from PW1^{nLacZ} reporter mouse hearts. We strikingly observed that >92% of cardiac PW1⁺ cells express CD51 (Fig 3a). The four other new markers as well as typical adult stem cell markers (i.e., CD44, CD34, CD166) were expressed in a lower proportion (i.e., around 50%) of cardiac PW1⁺ cells (Fig 3b), thus indicating CD51 as a potent marker to discriminate cardiac PW1⁺ cells. Further analyses in sorted CD45⁻ Ter119⁻ cardiac cells showed the high clustering of FDG and CD51 expression, further confirming that resident cardiac PW1⁺ cells display a high expression level of CD51 (Fig 3c,d). Reciprocally, CD51 expression was observed in the majority of FDG⁺ CD45⁺ Ter119⁻ cardiac cells.

In order to develop and validate a new sorting strategy for cardiac PW1⁺ cells based on CD51 expression, we first analyzed the expression of the four other studied candidates in CD51 sorted from Pw1-reporter mice hearts and found that FDG⁺ CD51⁺ CD45⁻ exclusively express CD140a (i.e, PDGF receptor alpha) while FDG⁺ CD51⁺ CD45⁺ express CD172a (Supplemental figure 1a-c). Using our PW1^{nLacZ} reporter mouse, we then started cell selection using CD51, CD45, CD140a and CD172 in order to propose a new sorting strategy of cardiac PW1⁺ cells. Briefly, the cardiac CD51⁺ populations can be easily segregated according to CD45, CD140a and CD172 expression (Fig 4a-c). We then assessed beta-galactosidase activity in each of these sub-populations and found that the new strategy allows to recover 86% of PW1⁺ cells among the

CD51+CD45-CD140a+CD172- population and 92% among the CD51+CD45+CD140a-CD172+ population.

Cardiac PW1⁺ cells express different α V-containing integrins

CD51 (*Itgav*) belongs to the family of integrins that are transmembrane receptors which act as bridges for cell-ECM connections and cell-cell interactions. We thus first analyzed CD51 expression in cardiomyocytes and non-myocytes fractions freshly isolated from mouse normal hearts. Huvec cells were used as positive controls. We found that CD51 was exclusively expressed in the non-myocytes fractions (Fig 5A). We then FACS-sorted cardiac PW1⁺ and PW1⁻ fractions and found that CD51 expression was only observed in cardiac PW1⁺ cells (Fig 5B), thus further corroborating the transcriptomics, proteomics and cytometry data.

Integrin α V subunits can combine to beta subunits to form different integrin combinations that can be more abundantly observed in some particular cell types. We thus sought for a peculiar integrin signature in cardiac PW1⁺ cells. We firstly assessed the expression of ITGAV and beta subunits (including ITGB1, ITGB3, ITGB5, and ITGB8) using our transcriptomic data sets. In line with our data, ITGAV was more abundant in cardiac PW1⁺ cells than in other studied cell types. We then found that the expression of ITGB1 was higher as compared to other integrin beta subunits in cardiac PW1⁺ cells as well as in other studied cell types (Fig 5c), suggesting a predominant α V β 1 complex in cardiac PW1⁺ cells. This was confirmed by assessing the expression of ITGB1, ITGB3, ITGB5, and ITGB8 by western blotting in cardiac cell fractions (supp figure 2) and in cardiac PW1⁺ cells (Fig 5d). These results confirm the predominant expression of CD51 (i.e., ITGAV) in PW1⁺ cells in the myocardium and suggest the principal presence of α V β 1 heterodimers in cardiac PW1⁺ cells.

Targeting PW1⁺ α V integrins reduce cardiac fibrosis after MI

Recent evidence have shown α V integrins as central mediators of organ fibrosis through TGF-beta activation^{22,23} with a key role of α V β 1 integrin among others. Our results showed that CD51 can be used as a cell surface marker to identify PW1⁺ cells but we then wondered whether CD51 can also directly participate in the cardiac PW1⁺ fibrogenic behavior as previously described. CD51 (α V integrin) recognizes and binds the tripeptide sequence RGD (arginine, glycine, aspartic acid) which is a key motif for cell-cell and cell-ECM interactions. Based on this motif, a cyclic RGD pentapeptide was developed (called cilengitide) and was shown to exert strong inhibiting activity against the integrin α V, including α V β 1, α V β 3 and α V β 5.

To further assess the potential contribution of α V integrin as found in cardiac PW1⁺ cells, we examined the potential of α V integrins pharmacological blockade to prevent cardiac fibrosis in response to an ischemic injury. Mice were pre-treated for 7 days with cilengitide or vehicle and were then subjected to MI via a complete LAD ligation. The mice were further daily treated with cilengitide or vehicle for additional 7 days before final evaluation of cardiac function and remodeling (Fig 6a). We found that cilengitide treatment was associated 7 days after MI with a significant improvement in survival (Fig 6b) that correlated with a significant increase in cardiac function as measured by left ventricular ejection fraction (Fig 6c). Collagen (picrosirius red) staining was then performed on 8 sequential cardiac sections (Fig 6d) and digital image quantification demonstrated a significant reduction in cardiac fibrosis with cilengitide treatment ($22.62 \pm 1.40\%$ vs. $29.31 \pm 1.45\%$ in cilengitide vs. vehicle respectively, $p=0.002$, Fig 6e). Cilengitide treatment was not associated with any changes in survival, cardiac function or cardiac fibrosis in sham animals (supplemental figure 3).

We then performed *in vitro* experiments on freshly isolated cardiac PW1⁺ cells and integrin pharmacological blockade with cilengitide. We assessed whether CD51 pharmacological inhibition influenced the expression of profibrotic genes. Isolated cardiac PW1⁺ cells were seeded and cultured for 4 days and then treated for 48h with cilengitide. mRNA was extracted

and the expression of typical profibrotic genes (*coll1a1*, *col3a1*, *s100a4* (or FSP1), *Acta2*, *Fn1*, *mmp2*, *tgfrb1*) was measured by quantitative PCR. We found trend for a concentration-dependent reduction in *Acta2*, *mmp2* and *tgfrb1* genes expression in response to cilengitide (Fig 6f) but not for other studied genes (data not shown).

DISCUSSION

To the best of our knowledge, we provide here the first description of proteins expressed at the cell surface of PW1⁺ cardiac adult stem cells. The identification of cell-surface markers signature is critical for the isolation, characterization and understanding of resident adult stem cells as these cells typically represent a small proportion of the living cells in an organ. In addition, there is a diversity of markers that have been proposed but with a significant overlap between markers and a limited discriminatory power. For instance, we here found that typical stem cells markers (e.g., CD140a, CD44, CD166) are indeed found at the surface of cardiac PW1⁺ cells but in only ~50% of these cells. So far, the identification of PW1⁺ cells has been made possible through the use of a transgenic PW1-reporter mouse model that revealed extremely potent to demonstrate PW1 as a pan-tissue stem cell marker^{20,27-29}. We here used this model to specifically isolate cardiac PW1⁺ cells and then performed a multi-omics unbiased approach to further decipher the cell-surface membranome of these cells. The transcriptomics predictions helped us to strikingly filter down the large number of membrane proteins identified through a mass spectrometry technique and therefore increased the likelihood to identify a more specific cell surface marker among the limited number of remaining candidates. A similar approach was recently proposed to define the secretome of bone marrow stem cells³⁰. We then found CD51 as being expressed in the very large majority of cardiac PW1⁺ cells, a result that was not reported nor anticipated. Reciprocally, CD51 is predominantly found in cells expressing PW1⁺ in the myocardium thus highlighting the discriminative value of this new

marker that could now serve for PW1⁺ cells sorting. Whether CD51 specifically tags PW1⁺ cells in non-cardiac organs however remains to be determined.

The identification of this new cell surface marker then provided important information on the pathophysiological role of cardiac PW1⁺ cells. CD51 is an α V-integrin subunit, a subset of integrin family cell adhesion receptors that were recently suggested as central mediators of organ fibrosis through TGF-beta activation^{22,23}. Strikingly, we recently reported that cardiac PW1⁺ cells display a fibrogenic behavior in response to ischemic injury, notably by directly giving rise to fibroblasts¹⁹. Our new results indicate that CD51 (or ITGAV) play a direct role in controlling the fibrogenic fate of cardiac PW1⁺ cells. We indeed found that blockade of α V-integrin limits the expression of fibrotic genes in isolated PW1⁺ cells and could therefore reduce the ability of cardiac PW1⁺ cells to differentiate into fibroblasts *in vivo*. Concordantly, pharmacological blockade of α V-integrin with cilengitide in a MI murine model significantly reduced the post-MI fibrotic remodeling, probably through a reduction in interstitial fibrosis.

The survival and cardiac function of cilengitide treated animals were consequently improved. As some integrins are expressed in endothelial cells, it has been suggested that cilengitide has some anti-angiogenic effects. However, this mechanism could not explain our current results as an anti-angiogenic effect should have adversely deteriorated cardiac function post-MI, which is not supported by our data. As α V-integrin are predominantly expressed in PW1⁺ cells within the cardiac cells, our data suggest that the observed benefit is primarily carried out by reducing the fibrogenic behavior of these cells. A contribution of circulating cells (such as inflammatory cells in response to cardiomyocyte necrosis) can however not be ruled out.

The role of integrins in non-cardiac organ fibrosis (i.e., lung and liver) is becoming increasingly recognized and genetic deletion or pharmacological inhibition of integrins have been associated with reduced fibrotic remodeling^{23,31,32}. Interestingly, these recent studies indicate a critical role of α V β 1 in organ fibrosis^{23,31}. The role of α V β 1 in cardiac fibrosis however remains unclear²³,

and our present data suggest that $\alpha V\beta 1$ is predominantly expressed in cardiac PW1⁺ cells. Our results are compatible with the hypothesis that cardiac PW1⁺ cells represent a cellular source of fibroblasts and orchestrate a microenvironment that further favors resident fibroblasts activation.

Lastly, our study indicates that a new anti-fibrotic therapy could be developed by targeting αV -integrins as expressed in the fibrogenic cardiac PW1⁺ cells. So far, heart failure therapies are used to alleviate cardiac workload and indirectly reduce cardiac remodeling but there is currently no effective anti-fibrotic therapeutic strategy that could complement the current therapies for HF^{9,11,12}. To achieve an antifibrotic therapy, a better understanding of the mechanisms contributing to cardiac fibrosis is needed and our data reports on a new cellular source of cardiac fibrosis. Importantly, pharmacological blockade of αV -integrin was associated with favorable outcomes in a murine MI model. Anti-fibrotic strategies in MI often exposed to the risk of cardiac rupture by limiting the development of replacement fibrosis which restores the region devoid of viable cardiomyocytes and prevents cardiac rupture³³. For instance, it was recently shown that strategies that limits inflammatory cells recruitment to the site of infarction delayed the removal of dead cardiomyocytes and their replacement by a scar tissue, therefore increasing susceptibility to cardiac rupture³⁴. We did not observe such an adverse outcome but rather found a significant improvement in survival under cilengitide treatment. Combined with the significant reduction in fibrotic area in cilengitide treated animals, this suggests that blockade of αV -integrin does not directly affect the replacement fibrotic remodeling but rather limits the development of reactive interstitial fibrosis in the viable myocardium¹².

Overall, these data identify cardiac PW1⁺ cells as a source of cardiac fibrosis in response to an ischemic injury via αV -integrin and suggest that pharmacological targeting of αV -integrin may provide clinical benefit in the treatment of cardiac ischemia.

Acknowledgements:

We thank Fondation pour la Recherche Médicale and the GENMED Laboratory of Excellence on Medical Genomics (ANR-10-LABX-0013) for their support to M.R. RNA sequencing was performed with the help of Plateforme P3S at Sorbonne Universités, Paris, France.

Figure Legends

Figure 1

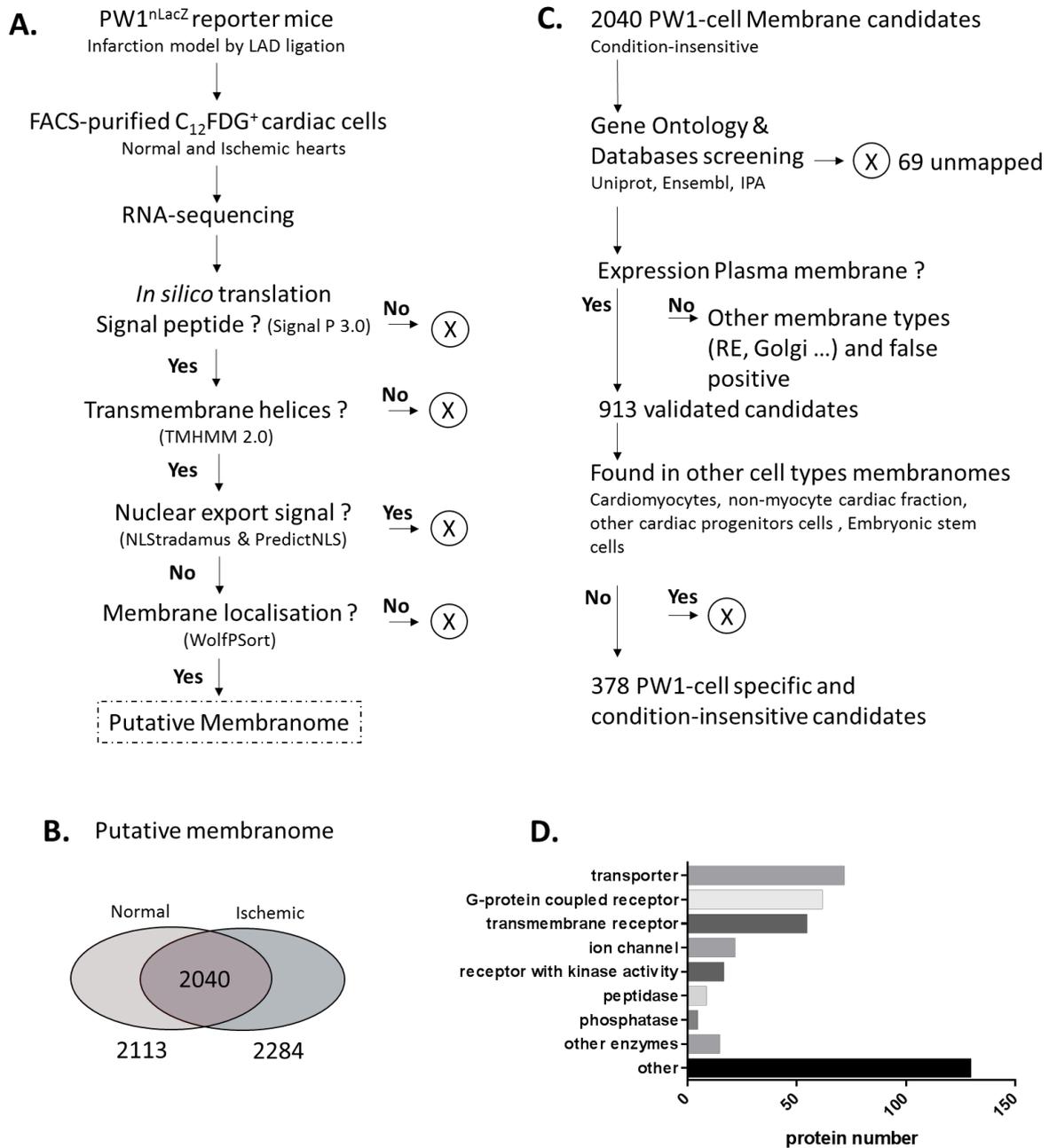


Figure 1. Bioinformatic membranome analysis (A) Experimental strategy and bioinformatics algorithm to identify putative membrane proteins in FACS-purified PW1⁺ cardiac cells (B) PW1⁺ cells putative membranome : 2113 sequences were identified in cells from normal hearts and 2284 in ischemic hearts. 2040 sequences were identified in both conditions. (C) Experimental strategy to validate the newly identified candidates as specifically expressed in

the plasma membrane of PW1⁺ cardiac cells (D) Molecular function of the 378 PW1⁺ cells specific membrane proteins.

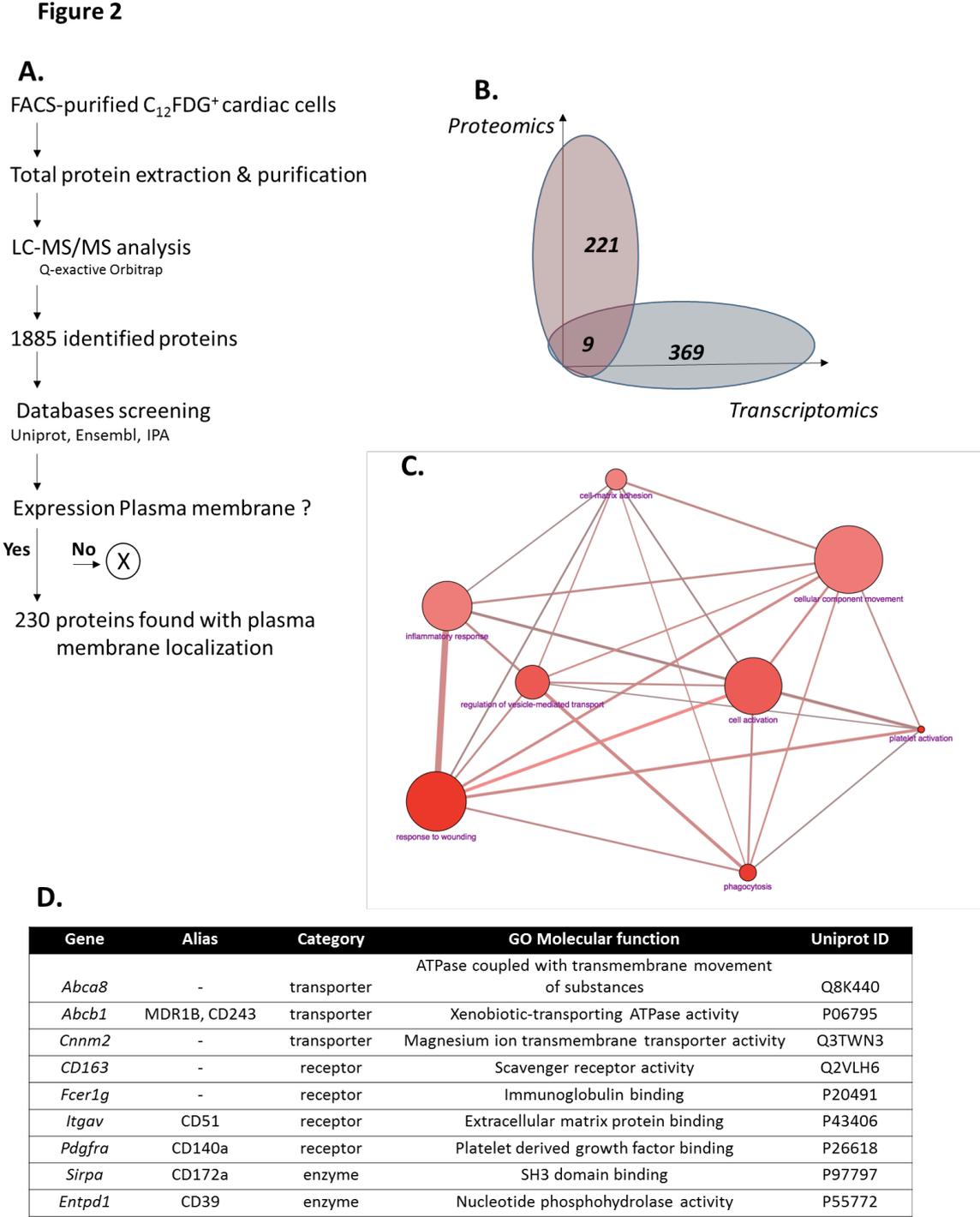


Figure 2. Proteomic cross-validation of cardiac PW1⁺ new cell surface markers (A)

Experimental strategy to identify the membrane proteins observed in the full proteome of

FACS-purified PW1⁺ cardiac cells. (B) Comparison between the two strategies cross-validates the expression of 9 candidates (C) Overlap between gene ontology categories of newly identified cell surface markers for cardiac PW1+ cells obtained with ConsensusDB. (D) List of genes, IDs, aliases, categories and molecular functions of the 9 candidates.

Figure 3

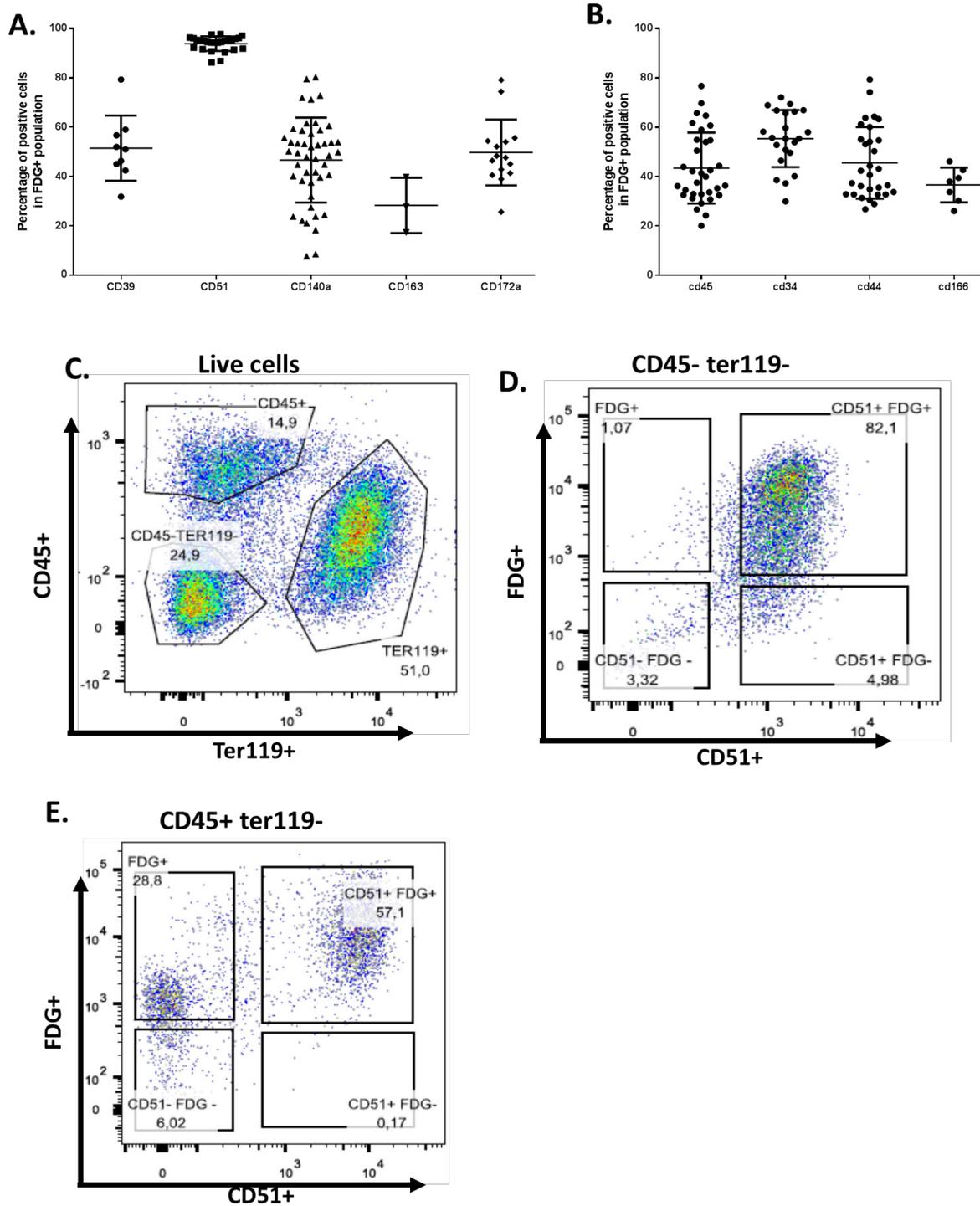


Figure 3. Itgav (CD51) is identified as a sensitive cell surface marker of cardiac PW1⁺ cells (A, B) Analysis of the expression of the newly identified cell surface markers (A) or typical cell surface markers (B) in PW1⁺ cardiac cells by flow cytometry. N>10. (C) Analysis strategy

to isolate Ter119- cells (D, E) CD51 and FDG expression in CD45- Ter119- cells (D) and in CD45+ Ter119- cells (E).

Figure 4

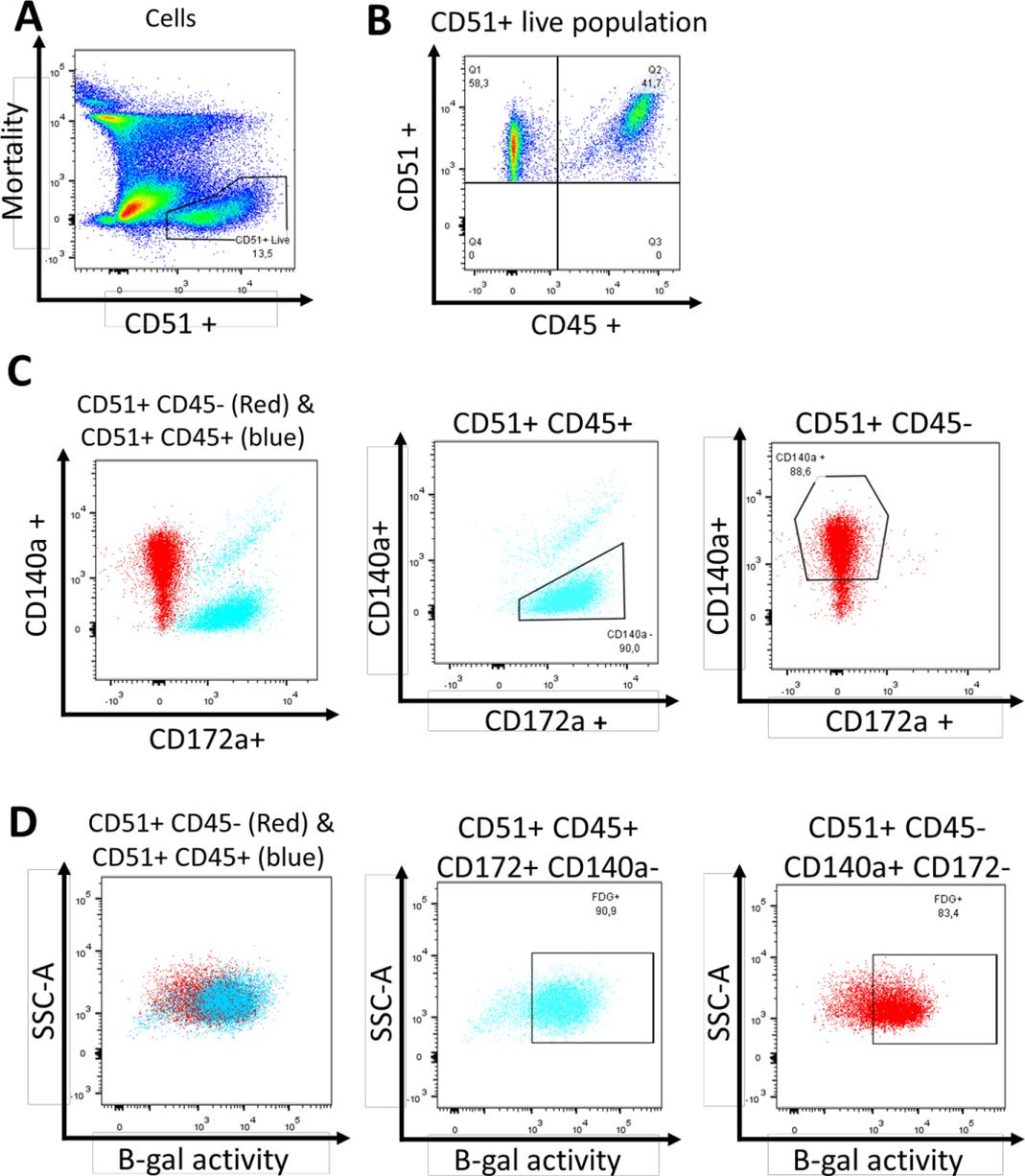


Figure 4. CD51-based Cell sorting strategy efficiently recovers cardiac PW1+ cells

(A) Fluorescence-activated cell sorting of single-cell suspensions from PW1nLAcz reporter mice heart extracts; sorting is based on CD51 expression (B) Segregation of two sub-population

among the cardiac CD51+ population according to CD45 expression (C) Differential expression of CD140a and CD172a in CD51+ CD45- (red) and CD51+ CD45+ (blue) populations. The CD51+ CD45- exclusively expressed CD140a but not CD 172a, whereas the CD51+ CD45+ exclusively expressed CD172a but not CD140a. (D) Beta-galactosidase expression (as a marker of PW1 expression) in cells gated for CD51 and CD45: The fractions CD51+Cd45-CD140a+ (red) showed beta-gal activity in >83% of cells and (the CD51+CD45+CD140a- (blue) in >90% of cells. Both fractions (i.e., CD51+Cd45-CD140a- and CD51+CD45+CD140a+) include a low number of PW1- cells.

Figure 5

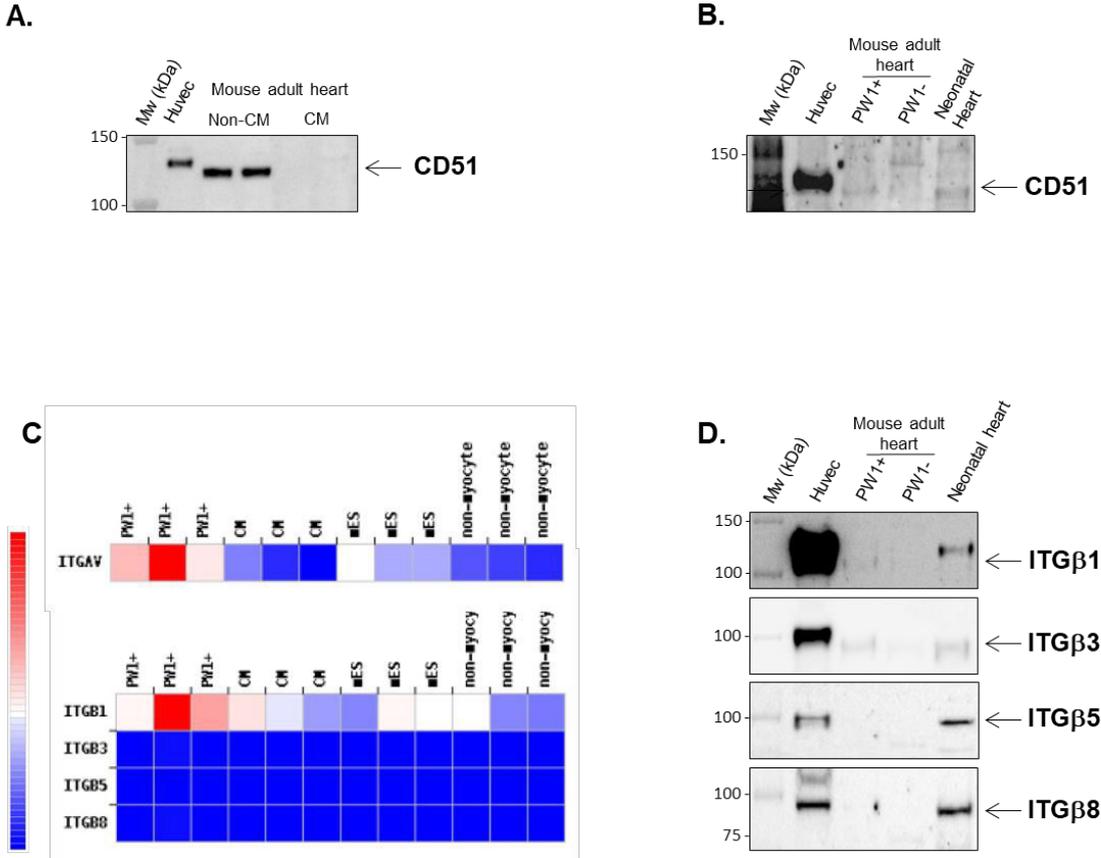


Figure 5. Pw1+ sorted cells express CD51 as well as ITGβ1. (A) Cardiomyocytes (CM) and non-CM cells were isolated from wild type adult mouse hearts and analyzed by

western blotting for the expression of CD51. Proteins from HUVEC were used as positive controls. (B) Pw1⁺ cells were sorted from the heart of 22 adult PW1^{nLacZ} mice by FACS using the fluorescent substrate C₁₂FDG of β -gal and pooled to analyze by western blot the expression of CD51. (C) mRNA abundances for ITGAV and for ITG β 1, ITG β 3, ITG β 5 and ITG β 8 from the RNA-sequencing data. (D) Western blots for ITG β 1, ITG β 3, ITG β 5 and ITG β 8 in PW1⁺ vs. PW1⁻ cardiac fractions. Proteins from HUVEC and neonatal mouse heart were used as positive controls.

Figure 6

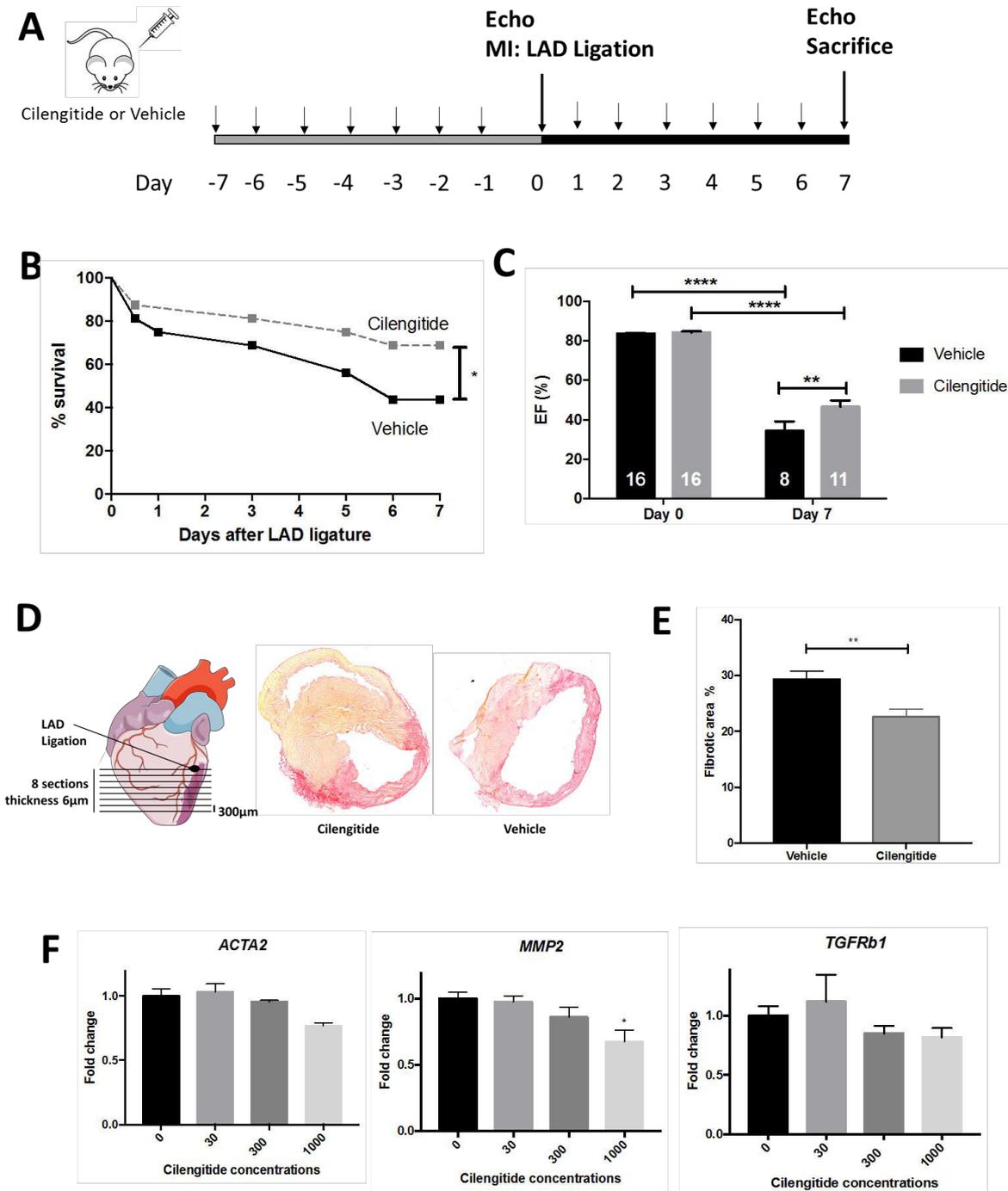
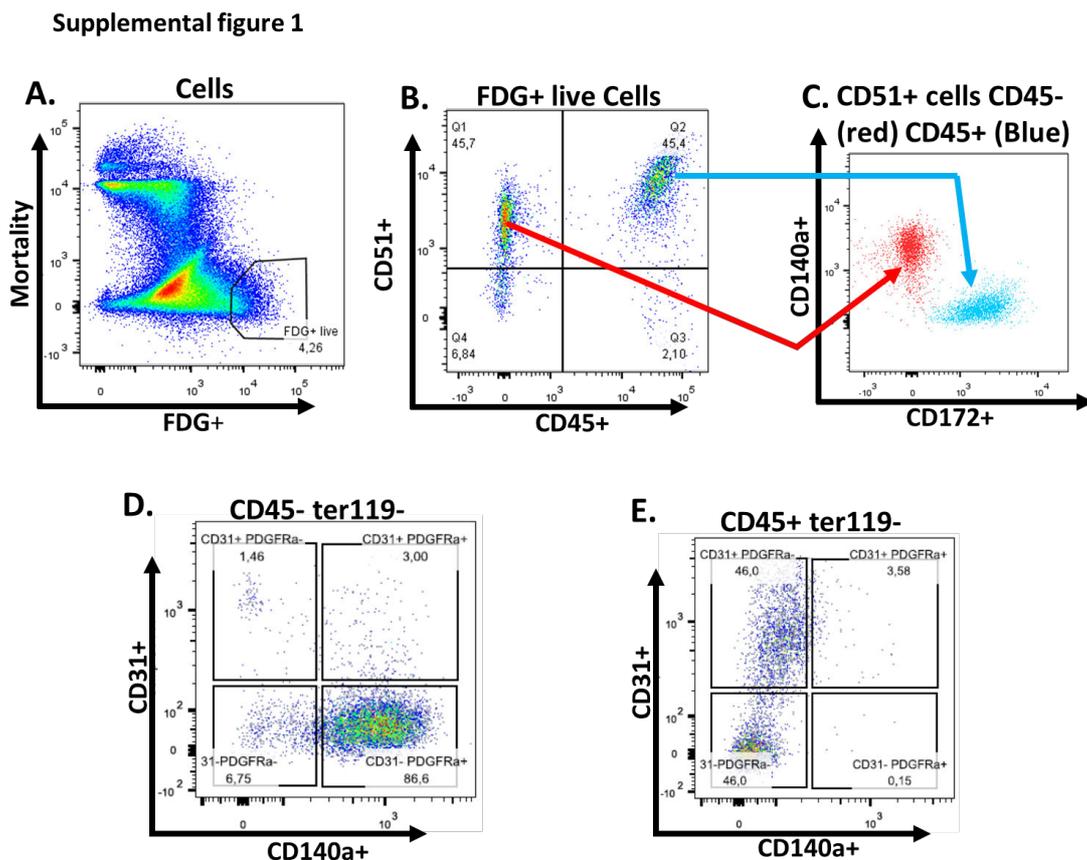


Figure 6. Cilengitide reduces cardiac fibrosis and improves cardiac function after MI. (A) Experimental design. Mice were pre-treated for 7 days with cilengitide or vehicle (n=16 per group) before surgery and complete LAD ligation as an MI model (defined as Day 0). The mice were then followed and treated with cilengitide or vehicle for seven additional days. Final

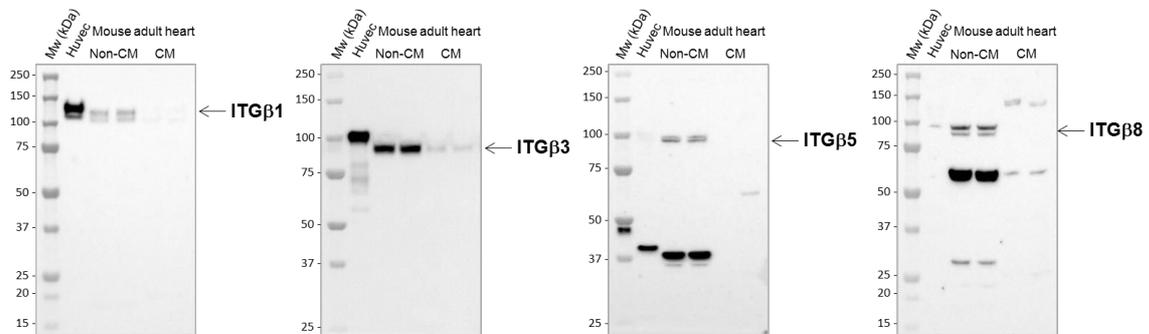
non-invasive and invasive evaluations were performed 7 days after surgery. (B). Survival curves in cilengitide vs vehicle treated mice in the seven days after MI. * $p < 0.05$, log-rank test. (C). Left ventricular ejection fractions in cilengitide vs vehicle treated mice immediately before surgery and 7 days later. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. (D) Comparison of cardiac fibrosis between cilengitide vs vehicle treated animals 7 days after LAD ligation. Fibrosis was evaluated at 8 levels below the LAD ligation site by picosirius red staining 7 days post-MI. (E). Quantification of fibrotic area between both groups, ** $p < 0.01$, $n = 4$ per groups. (F) Quantitative PCR evaluation of *acta2*, *mmp2* and *tgfb1* expression in isolated cardiac PW1+ cells cultured in presence of escalating concentrations of cilengitide (0 for vehicle only, 30nM, 300nM, 1000nM) * $p < 0.05$, $n = 2$.



Supplemental Figure 1. Co-expression of cell surface markers in cardiac PW1+ cells (A) Gating strategy for cardiac PW1+ cell sorting (B) Expression of CD51 and CD45 in cardiac

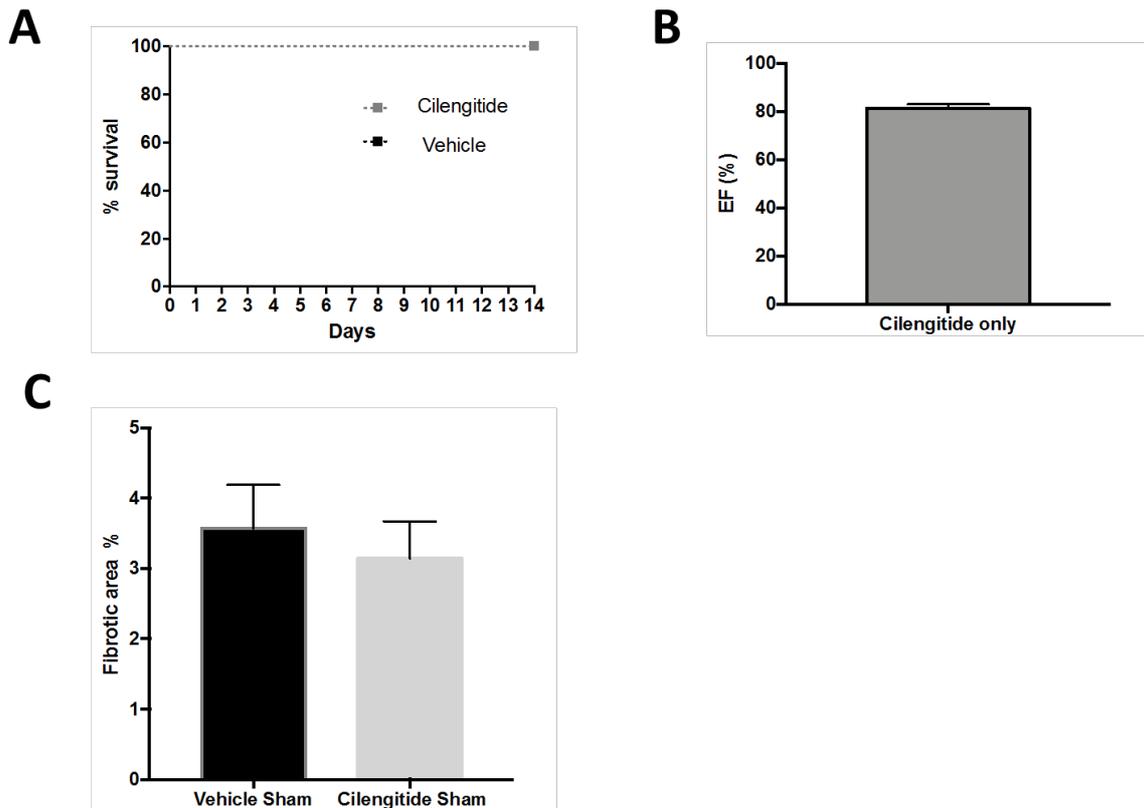
FGG+ cells (C) Segregation of CD140a and CD172a expression in FDG+CD51+CD45- (red) and in FDG+CD51+CD45- respectively

Supplemental figure 2



Supplemental Figure 2. Expression of ITGβ1, ITGβ3, ITGβ5 and ITGβ8 in freshly isolated Cardiomyocytes (CM) and non-CM cells. Fractions were isolated from wild type adult mouse hearts and analyzed by western blotting for the expression of ITGβ1, ITGβ3, ITGβ5 and ITGβ8. Proteins from HUVEC were used as positive controls.

Supplemental figure 3



Supplemental Figure 3. No cardiac effect after cilengitide treatment in control groups.

(A) Survival curves in cilengitide vs vehicle treated mice and with a sham procedure. No animal died during the 14 days of survey. (B) Cardiac function after 14 days of cilengitide treatment is normal in treated mice. (C) Comparison of cardiac fibrosis in vehicle vs cilengitide treated mice, showing physiological levels in both groups.

Table 1: List of antibodies used in this study for flow cytometry analysis and FACS.

target	Fluorophore	Clone	Supplier	reference
CD31	BUV737	MEC13.3	BD Biosciences	565097
CD34	Bv421	MEC14.7	Biologend	119321
CD39	PerCp-Ef710	24MDS1	eBiosciences	46-0391-82
CD44	AF700	IM7	eBiosciences	56-0441-82
CD45	PE-Cy7	30-F11	eBiosciences	25-0451-82
CD45	Biotin/PacBlue	30-F11	eBiosciences	13-0451-85
CD51	PE	RMV-7	eBiosciences	12-0512-83
CD117	APC	ACK2	eBiosciences	17-1172-83
CD140a	APC	APA5	eBiosciences	17-1401-81
CD163	PE/AF555	x	Bioss	bs-2527R-A555
CD166	PE	eBioALC48	eBiosciences	12-1661-82
CD172a	AF700	P84	biologend	144021
TER119	BUV395	Ter-119	BD Biosciences	563827

References

1. Maggioni, A.P., *et al.* EURObservational Research Programme: regional differences and 1-year follow-up results of the Heart Failure Pilot Survey (ESC-HF Pilot). *Eur J Heart Fail* **15**, 808-817 (2013).
2. Roger, V.L., *et al.* Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **125**, e2-e220 (2012).
3. Seferovic, P.M., *et al.* Organization of heart failure management in European Society of Cardiology member countries: survey of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology in collaboration with the Heart Failure National Societies/Working Groups. *Eur J Heart Fail* **15**, 947-959 (2013).
4. Ponikowski, P., *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* **37**, 2129-2200 (2016).
5. Savarese, G. & Lund, L.H. Global Public Health Burden of Heart Failure. *Card Fail Rev* **3**, 7-11 (2017).
6. Dunlay, S.M., Roger, V.L. & Redfield, M.M. Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol* **14**, 591-602 (2017).
7. Lewis, G.A., *et al.* Biological Phenotypes of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol* **70**, 2186-2200 (2017).
8. Gyongyosi, M., *et al.* Myocardial fibrosis: biomedical research from bench to bedside. *Eur J Heart Fail* **19**, 177-191 (2017).

9. Schelbert, E.B., Fonarow, G.C., Bonow, R.O., Butler, J. & Gheorghiuade, M. Therapeutic targets in heart failure: refocusing on the myocardial interstitium. *J Am Coll Cardiol* **63**, 2188-2198 (2014).
10. Li, A.H., Liu, P.P., Villarreal, F.J. & Garcia, R.A. Dynamic changes in myocardial matrix and relevance to disease: translational perspectives. *Circ Res* **114**, 916-927 (2014).
11. Gourdie, R.G., Dimmeler, S. & Kohl, P. Novel therapeutic strategies targeting fibroblasts and fibrosis in heart disease. *Nat Rev Drug Discov* **15**, 620-638 (2016).
12. Travers, J.G., Kamal, F.A., Robbins, J., Yutzey, K.E. & Blaxall, B.C. Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circ Res* **118**, 1021-1040 (2016).
13. Kramann, R., *et al.* Perivascular Gli1+ progenitors are key contributors to injury-induced organ fibrosis. *Cell Stem Cell* **16**, 51-66 (2015).
14. Kalluri, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* **16**, 582-598 (2016).
15. Teekakirikul, P., *et al.* Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf-beta. *J Clin Invest* **120**, 3520-3529 (2010).
16. Olivey, H.E., Mundell, N.A., Austin, A.F. & Barnett, J.V. Transforming growth factor-beta stimulates epithelial-mesenchymal transformation in the proepicardium. *Dev Dyn* **235**, 50-59 (2006).
17. Duan, J., *et al.* Wnt1/betacatenin injury response activates the epicardium and cardiac fibroblasts to promote cardiac repair. *EMBO J* **31**, 429-442 (2012).
18. Humphreys, B.D., *et al.* Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol* **176**, 85-97 (2010).
19. Yaniz-Galende, E., *et al.* Fibrogenic Potential of PW1/Peg3 Expressing Cardiac Stem Cells. *J Am Coll Cardiol* **70**, 728-741 (2017).
20. Besson, V., *et al.* PW1 gene/paternally expressed gene 3 (PW1/Peg3) identifies multiple adult stem and progenitor cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 11470-11475 (2011).
21. Mitchell, K.J., *et al.* Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nat Cell Biol* **12**, 257-266 (2010).
22. Henderson, N.C., *et al.* Targeting of alphav integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. *Nat Med* **19**, 1617-1624 (2013).
23. Chen, C., Li, R., Ross, R.S. & Manso, A.M. Integrins and integrin-related proteins in cardiac fibrosis. *J Mol Cell Cardiol* **93**, 162-174 (2016).
24. Chen, C., Khaleel, S.S., Huang, H. & Wu, C.H. Software for pre-processing Illumina next-generation sequencing short read sequences. *Source Code Biol Med* **9**, 8 (2014).
25. Li, B. & Dewey, C.N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* **12**, 323 (2011).
26. Yates, A., *et al.* Ensembl 2016. *Nucleic Acids Res* **44**, D710-716 (2016).
27. Dierick, F., *et al.* Resident PW1+ Progenitor Cells Participate in Vascular Remodeling During Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Res* **118**, 822-833 (2016).
28. Sojoodi, M., *et al.* The zinc finger transcription factor PW1/PEG3 restrains murine beta cell cycling. *Diabetologia* **59**, 1474-1479 (2016).
29. Besson, V., *et al.* Expression Analysis of the Stem Cell Marker Pw1/Peg3 Reveals a CD34 Negative Progenitor Population in the Hair Follicle. *Stem Cells* **35**, 1015-1027 (2017).
30. Korf-Klingebiel, M., *et al.* Myeloid-derived growth factor (C19orf10) mediates cardiac repair following myocardial infarction. *Nat Med* **21**, 140-149 (2015).

31. Reed, N.I., *et al.* The alphavbeta1 integrin plays a critical in vivo role in tissue fibrosis. *Sci Transl Med* **7**, 288ra279 (2015).
32. Conroy, K.P., Kitto, L.J. & Henderson, N.C. alphav integrins: key regulators of tissue fibrosis. *Cell Tissue Res* **365**, 511-519 (2016).
33. Sun, Y. & Weber, K.T. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res* **46**, 250-256 (2000).
34. Lorchner, H., *et al.* Myocardial healing requires Reg3beta-dependent accumulation of macrophages in the ischemic heart. *Nat Med* **21**, 353-362 (2015).

Partie 6 : Etude du secrétome des progéniteurs cardiaques

Prédiction du secrétome

Un des objectifs initiaux de ce projet est d'obtenir les protéines secrétées par les progéniteurs cardiaques car ils sont suspectés d'avoir un mode de communication paracrine pouvant avoir un effet à la survenue de l'évènement ischémique. De plus les différentes populations de progéniteurs cardiaques étudiés dans notre étude précédente ont montré des comportements et des capacités différentes. La flexibilité du modèle informatique permet également d'obtenir le secrétome de manière simple. En effet, en appliquant la même stratégie (annexe 1) et en modifiant légèrement les paramètres (annexe 7) nous accédons au secrétome prédit. Il nous faut rechercher des séquences n'ayant pas de segment transmembranaire (résultat négatif pour TMHMM) et une localisation théorique extracellulaire (résultat « extr » pour WoLF PSort).

Observations des variations d'expression

Le RNAseq permet également d'obtenir des informations sur la quantité de chaque ARNm listé. Cette information est concaténée avec la liste de protéines secrétées prédites et l'identifiant unique Ensembl est également rajouté. Un ratio d'abondance est calculé pour toutes les séquences entre les mêmes populations (FDG, DP et C-kit) en condition saine comparée à la condition MI. Les séquences ayant une variation supérieure à 1,5 fois l'expression de l'autre condition sont conservées et concaténées pour les trois populations. Ces comparaisons n'ont pu être automatisées du fait de l'adjonction de l'abondance (figure 66) (annexe 8). De la même manière que pour le membranome, les fichiers de sortie sont vérifiés automatiquement par IPA puis filtrés manuellement. Finalement 118 candidats surexprimés dans différentes populations ont été sélectionnés.

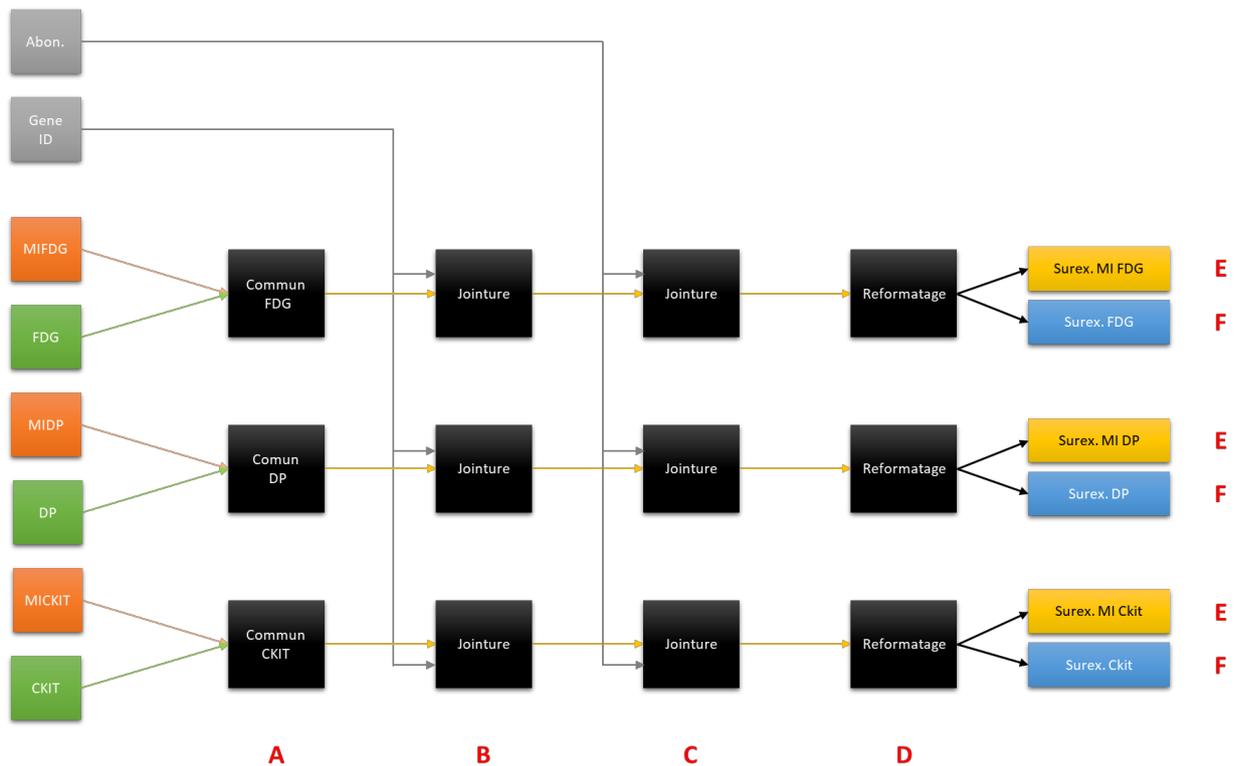


Figure 66 : Schéma récapitulatif de la stratégie utilisée pour accéder aux protéines secrétées et surexprimées par les progéniteurs selon qu'ils aient été obtenus de cœurs sains ou infarctés. Abond : abondance ; Gene ID : identifiant unique de gènes.

Vérifications des résultats et suite du projet

Ce projet représentant une charge de travail considérable, il fait actuellement l'objet d'un projet de stage postdoctoral. Il est très difficile d'évaluer par spectrométrie de masse le secrétome et de réaliser une quantification compte-tenu de la teneur très faible des composés sécrétés. Plusieurs tentatives ont été réalisées sur les cellules PW1⁺ et/ou C-kit⁺, mais celles-ci n'ont pas fonctionné. Il a été décidé de confirmer les résultats du RNAseq par RT-qPCR. Des amorces spécifiques des séquences ont été dessinées pour les 118 candidats sélectionnés. La variation d'expression de 29 candidats a été retrouvée par RT-qPCR dans des échantillons de cœurs entiers normaux et MI. L'expression de ces protéines a été réalisée dans des cellules eucaryotes et le milieu de culture (milieu conditionné) analysé afin de vérifier une expression correcte de ces protéines. Ces milieux conditionnés ont ensuite été appliqués sur différents types cellulaires afin d'en évaluer le potentiel pro- et anti-fibrogénique.

Perspectives

Mon travail de thèse a permis plusieurs avancées. Tout d'abord j'ai pu mettre en place un système informatique qui permet d'accéder à partir d'un grand volume de données à des informations manipulables plus facilement. Concrètement, j'ai pu obtenir des cibles membranaires permettant de décrire une population encore mal caractérisée mais également j'ai pu identifier un ensemble de protéines secrétées différemment entre la condition basale et la condition pathologique. Ensuite, la comparaison avec l'étude du membranome des cellules PW1⁺ par spectrométrie de masse a permis de restreindre cette liste à neuf protéines membranaires candidates. Parmi les cibles sélectionnées, une seule permet de décrire de manière efficace l'ensemble de la population exprimant PW1. La caractérisation du membranome a rendu possible la visualisation de deux populations majoritaires des cellules exprimant PW1 dans le cœur, définies par l'expression de CD45 ou de CD140a, attestant d'une origine sans doute différente. Enfin la découverte du CD51 comme marqueur consensuel des cellules PW1⁺ cardiaques a ouvert la voie au ciblage spécifique de ces cellules. Les essais d'inhibition des progéniteurs cardiaques CD51⁺/PW1⁺ par le Cilengitide ont montré une réduction significative de la fibrose cardiaque post-IDM. Cette dernière avancée confirme l'hypothèse d'une participation active des cellules PW1⁺ dans la fibrose post-IDM. Il semblerait que ce soit dans le processus fibrotique interstitiel (délétère) que les cellules PW1⁺ interviennent majoritairement. Au cours de cette discussion, seront abordés tout d'abord des aspects techniques de la partie bio-informatique et de spectrométrie de masse. Puis une seconde partie sera consacrée à une réflexion sur les marqueurs cellulaires. Enfin, une réflexion centrée sur les intégrines, leurs rôles probables dans la fibrose cardiaque ainsi que le moyen de les inhiber conclura ce travail.

L'approche reposant sur l'utilisation d'un RNAseq est une alternative efficace à la stratégie utilisant le microarray de l'article qui nous a inspiré (Korf-Klingebiel et al., 2015). En effet, nous pouvons ainsi comparer plusieurs populations et en extraire un jeu de données répondant à des critères comme la localisation, information indispensable pour la détermination de biomarqueurs membranaires. Néanmoins ce système pourrait être

amélioré. Plusieurs axes de progressions ont été identifiés, qu'ils soient matériels (amélioration des performances de calcul) ou structurels (insertion d'un seuillage quantitatif, simplification de l'enchaînement des algorithmes).

Un des soucis majeur et commun aux deux stratégies repose sur les bases de données. Il en existe un grand nombre, généralement différentes, toutes ne sont pas toujours très bien référencées, la plupart sont incomplètes et certaines contiennent des erreurs. Il est certain que la connaissance de l'ensemble des informations, de l'ADN aux protéines, rendrait obsolète des approches prédictives comme celle que nous avons mis en place mais une meilleure interconnexion ainsi qu'un processus de mise à jour des bases de données est nécessaire pour gagner en temps, en efficacité et en fiabilité des résultats. Des solutions logicielles comme *Ingenuity Pathway Analysis* sont une avancée notable pour une analyse rapide. Le prix de leur licence reste pour le moment prohibitif, mais justifié à la vue des efforts entrepris pour compiler les informations de la littérature et des différentes bases de données. Il restera tout de même une étape de vérification manuelle, les outils aussi bien développés qu'ils soient ne sont pas encore capables de croiser des flux d'informations de façon intelligente. Cette dernière étape est critique car elle fait appel à la sensibilité du manipulateur induisant ainsi de la variabilité dans le traitement de l'information.

Enfin, de nouvelles solutions prédictives ont vu le jour pour permettre l'analyse de l'activation de voies de signalisation (Schwab, Burkovski, Siegle, Müssel, & Kestler, 2017; Siegle et al., 2018). On peut imaginer que l'on puisse obtenir encore d'avantage d'informations d'une analyse RNAseq. Au sein de ce nouveau type d'outils, à l'aide d'une prédiction de membranome et de secrétome, il serait possible de prédire l'activation des différents composants des voies de signalisation jusqu'à l'activation de gènes cibles. Il suffirait alors de quelques points de contrôles pour vérifier l'exactitude de la prédiction dans un modèle adapté.

L'avancée majeure par rapport à la stratégie dont nous nous sommes inspirés est l'utilisation de la spectrométrie de masse pour cribler les résultats prédits. En effet, la spectrométrie de masse est une technique difficilement applicable aux cellules souches ce qui explique qu'elle ne soit pas utilisée de façon systématique. Le membranome prédit comprend tout de même de très nombreuses cibles qu'il eût été fastidieux de tester une

à une. La spectrométrie de masse s'est révélée très efficace comme filtre, nous permettant ainsi de garder un nombre limité de cibles. La spectrométrie de masse ne peut cependant pas être utilisée seule. Des expériences pour déterminer le membranome de cellules souches cardiaques ont déjà eu lieu (Gomes-Alves et al., 2015) montrant un grand nombre de protéines que nous avons également retrouvées (CD51, CD166, CD163 et CD140a par exemple). Cependant, le croisement de la bio-informatique et des résultats de masse ont permis de déterminer un membranome spécifique à une population particulière. De nombreux axes de progression sont également présents sur la préparation des échantillons. En effet, la technique que j'ai utilisée a été développée en premier lieu pour l'analyse de millions de cellules en culture. Elle a montré ses limites pour des quantités très limitées de cellules. Si le temps m'était donné, je tenterais de réaliser de nouveau la dérivatisation à l'aide du Sulfo-NHS-SS-biotine, solution élégante et permettant de s'affranchir de nombreuses protéines intracellulaires contaminantes (Hörmann et al., 2016).

L'identification de marqueurs membranaires spécifiques est une étape critique dans l'étude des cellules souches cardiaques. En effet, ces populations représentent un nombre très limité de cellules mais leurs capacités et leurs rôles sont très nombreux. La définition d'une signature spécifique de chaque population est une étape nécessaire pour les isoler et les caractériser. Depuis la découverte des cellules souches, de nombreux marqueurs ont été proposés comme définissant des populations de cellules aux caractéristiques souches. Cependant, la plupart de ces marqueurs décrivent de nombreux types cellulaires différents, par exemple les marqueurs CD140a, CD166 et CD44 que nous avons retrouvés exprimés par 50 % de la population de cellules PW1⁺. Ces marqueurs définissent des populations qui se chevauchent mais ne permettent pas de recouvrir l'ensemble des cellules souches. Les différentes études réalisées à l'aide de la souris reportrice PW1^{nLacZ} ont cependant permis de montrer que PW1 est un marqueur de cellules souches dans tout l'organisme (Besson et al., 2011, 2017; Dierick et al., 2016; Sojoodi et al., 2016). La détermination du marqueur CD51 comme étant associé à la présence de PW1 dans les cellules souches cardiaques pourrait être une avancée. En effet ce marqueur a déjà pu être associé à des cellules souches mésenchymateuses (Pinho et al., 2013) mais également de nombreuses études font part de l'implication de CD51 dans des cellules cancéreuses

(Donnenberg et al., 2018; Gvozdenovic et al., 2016; Horioka et al., 2016; MacDonald et al., 2008; Stupp et al., 2010) ou bien dans des processus fibrotiques (Henderson et al., 2013; Murray et al., 2017; Noiri et al., 1994; Reed et al., 2015).

Les analyses en cytométrie en flux en utilisant CD51 comme marqueur de la présence de PW1 a également permis de déterminer que le cœur héberge au moins deux populations à caractère souche. Elles se différencient par l'expression exclusive soit de CD140a, soit de CD45 témoignant d'une origine différente. La majorité des marqueurs que nous avons retrouvés par l'analyse bio-informatique et la spectrométrie de masse fait apparaître un déséquilibre de connaissance vers des marqueurs membranaires présent majoritairement dans la lignée myéloïde. Une interrogation demeure néanmoins, quelle est l'origine des cellules exprimant PW1 et CD45 ? En effet, lors de la préparation de l'échantillon, une perfusion est réalisée jusqu'à décoloration du cœur suivi d'une lyse des cellules rouges. Il reste cependant une proportion non négligeable de cellules que l'on peut penser issues de la moelle osseuse permettant ainsi de formuler l'hypothèse d'une migration et d'une infiltration du tissu myocardique par des cellules souches. Cet événement aurait lieu très tôt au cours de la vie, permettant une présence de cellules souches dans le tissu myocardique adulte. L'observation de deux populations souches CD51⁺/PW1⁺ exprimant soit CD45 soit CD140a questionne sur la responsabilité de chacune dans la fibrose post-infarctus.

Durant les trente dernières années, l'étude des intégrines a permis l'identification de nombreux partenaires des intégrines, en amont et en aval. Ces nombreux partenaires ont permis de mettre en lumière de nombreux processus régulés par les intégrines et en particulier l'intégrine αV .

L'intégrine αV est toujours associée en hétérodimère avec une intégrine β . L'échec de nombreuses thérapies anticancéreuses ont placé ces intégrines β au centre de nombreuses recherches ces dernières années. En effet l'intégrine αV peut être associée à 5 intégrines β ce qui confère au dimère une spécificité de liaison à certains ligands. Cette spécificité peut également être tissulaire dans le cas du couple $\alpha V\beta 6$ (Breuss et al., 1995).

Nous avons pu montrer ici que les cellules CD51⁺/PW1⁺ expriment les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$. Ces deux sous-unités ont été étudiées et il apparait un partage de fonctions entre ces deux intégrines.

L'intégrine $\beta 3$ semble associée à un processus vasculaire par plusieurs aspects : sa répartition bien que relativement ubiquitaire au sein des différentes populations de l'organisme, et sa modulation qui pourrait réguler une néo-vascularisation (Bader et al., 1998; Skuli et al., 2009). D'ailleurs $\alpha V\beta 3$ est capable de s'associer au VEGFR2 créant une synergie favorisant l'angiogenèse, la migration cellulaire et la formation de tubes (Somanath et al., 2009). Enfin, les cellules endothéliales n'expriment que le dimère $\alpha V\beta 3$ parmi les 5 possibilités avec αV .

D'un autre côté, $\beta 1$ est plus souvent associée à un processus fibrotique dans de nombreux organes lorsqu'il est en association avec αV (Chang et al., 2017; Henderson et al., 2013; Reed et al., 2015; Song et al., 2016). Ce processus fibrotique serait lié à la possibilité des intégrines formées par des hétérodimères contenant αV de fixer une forme latente du TGF- β . Ce dernier est formé par le TGF- β et un peptide LAP, maintenant la cytokine sous forme inactive. Ce TGF- β latent est retrouvé séquestré dans la matrice extracellulaire où il peut être activé de deux manières : soit la forme latente du TGF- β est reconnue par les intégrines via un domaine RGD contenue dans le LAP provoquant sa libération, soit des protéases (MMP2, MMP9, gélatinase A) libèrent le TGF- β par protéolyse du LAP, menant également à son activation (Song et al., 2016).

Des tests d'inhibition de $\alpha V\beta 1$ ont permis de réduire la taille de la fibrose dans le poumon et le foie (Reed et al., 2015) et dans le rein (Chang et al., 2017), montrant à nouveau son implication dans le processus fibrotique.

Certains auteurs ont néanmoins rencontré de nombreux problèmes en essayant de cibler le dimère $\alpha V\beta 1$ ou le dimère $\alpha V\beta 3$. Ces deux formes partagent beaucoup de ligands avançant l'hypothèse d'une redondance d'action ou tout du moins d'une possibilité de compensation de l'une par la seconde (Henderson et al., 2013; Margadant et al., 2010; Reed et al., 2015).

L'identification de CD51 nous offre de nouvelles perspectives sur le rôle pathologique des cellules PW1⁺. Notre publication précédente faisait part de la découverte d'une

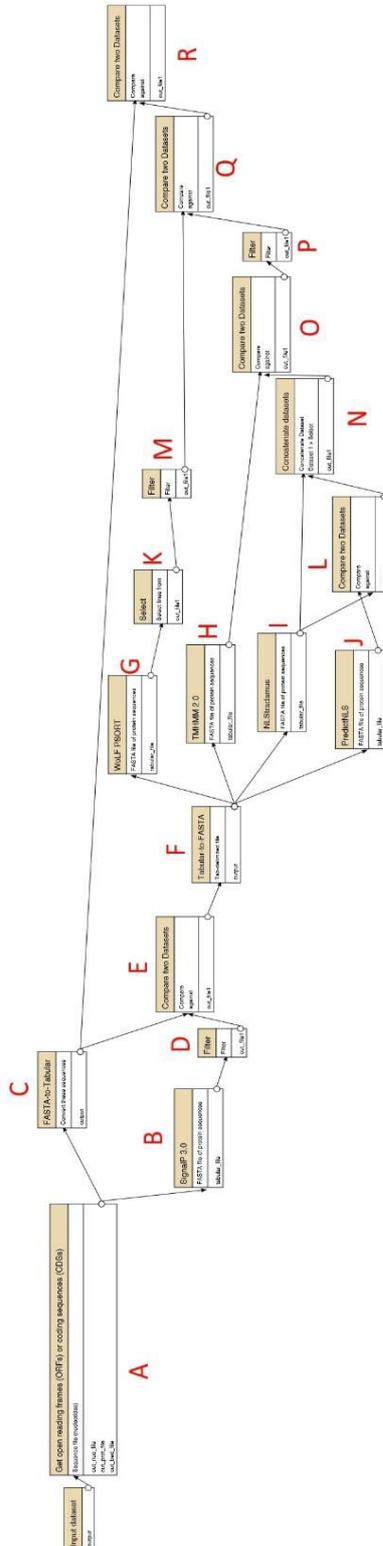
population cardiaque exprimant PW1 avec un comportement pro-fibrotique et donnant naissance à une population de fibroblastes. Les résultats qui sont présentés ici montrent que CD51 joue un rôle important dans ce comportement pro-fibrotique et qu'en ciblant directement CD51 avec le Cilengitide nous pouvons atténuer le remodelage fibrotique délétère post-IDM dans un modèle murin. Il est d'ailleurs intéressant de noter que le traitement permettant de réduire le remodelage fibrotique post-IDM a permis d'améliorer la survie des souris infarctées. En effet, une étude (Lörchner et al., 2015) rapportait des ruptures du cœur de souris infarctées dont le remodelage avait été modifié par l'inactivation du gène *Reg3β*. Ce remodelage présentait une réduction très nette des dépôts de collagène. Ces données suggèrent que le remodelage cardiaque est nécessaire dans un premier temps et qu'un dépôt de MEC est nécessaire pour éviter la rupture cardiaque. Nos données suggèrent cependant que nous ciblons un processus différent. En effet, le traitement que nous avons administré, pendant 7 jours avant et 7 jours après l'IDM, donne des résultats significatifs en termes de baisse de mortalité et de fibrose, ce qui suggère que nous ne modifions pas ou peu la phase de fibrose cicatricielle (fibrose de remplacement).

Le nombre de molécules identifiées ciblant CD51 est en croissance constante. La découverte de la surexpression de CD51 dans le cancer a poussé les équipes de recherche et les industriels à développer des outils de diagnostic, d'imagerie (Groult et al., 2015) ainsi que des molécules permettant la limitation de l'expansion de tumeurs (Cirkel et al., 2016; Dechantsreiter et al., 1999; Stupp et al., 2010) spécifiques aux intégrines contenant CD51. Depuis ces outils ont été transposés à d'autres maladies dont l'imagerie PET d'IDM chez le rat (Laitinen et al., 2013) et chez l'humain (Sun et al., 2014). Le traitement de fibrose est encore en phase exploratoire, bien que de solides avancées semblent avoir été réalisées (Henderson et al., 2013; Reed et al., 2015; Ulmasov et al., 2016).

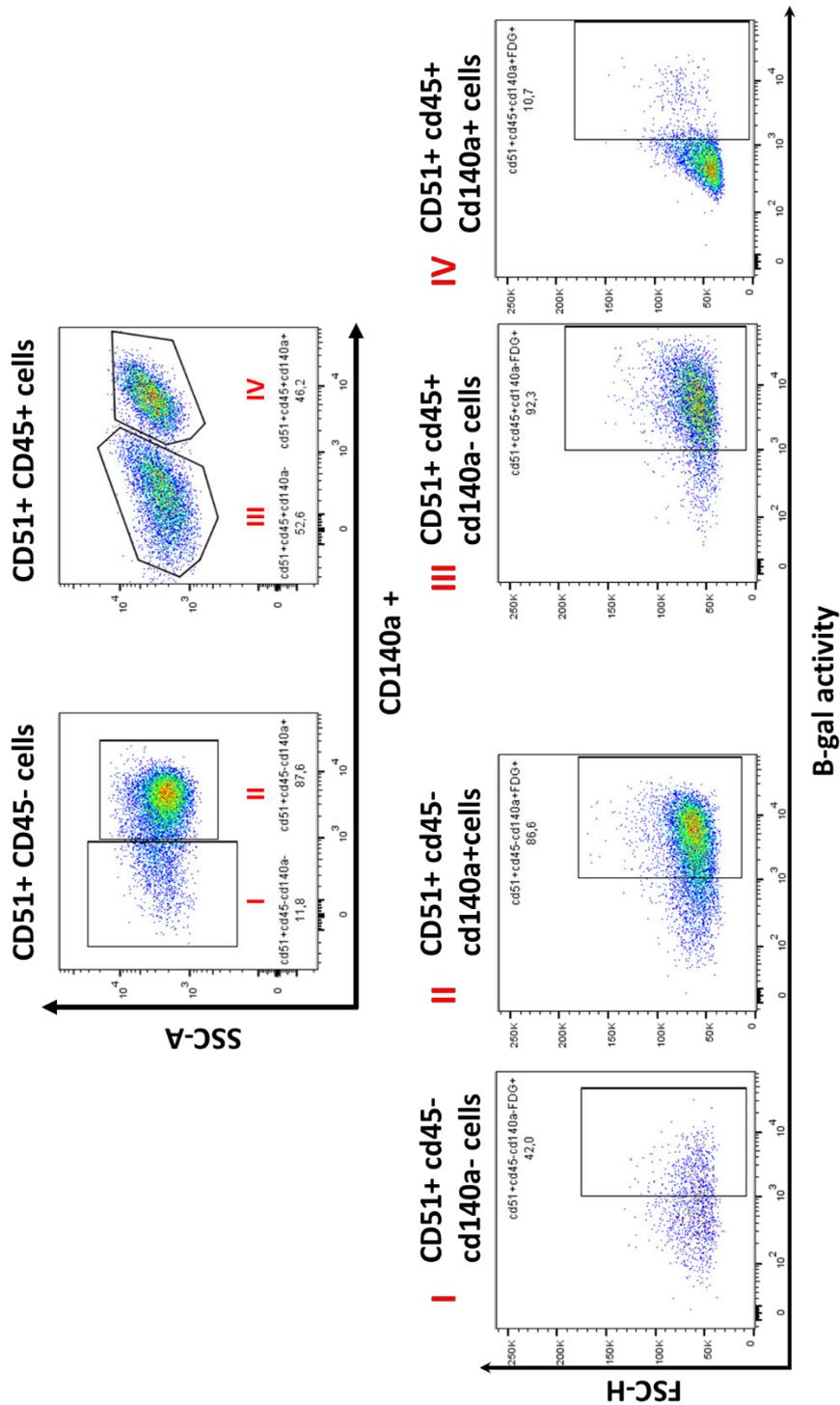
Le Cilengitide est le premier candidat médicament ciblant les intégrines à avoir été testé cliniquement jusqu'en phase 3 contre le cancer, où son bénéfice n'a pas été prouvé. Ainsi de nouvelles molécules ont été recherchées menant à la synthèse d'un grand nombre. Ces nouvelles molécules ont été compilées dans une revue très complète (Hatley et al., 2018), dans laquelle figure le Cilengitide, mais également les molécules utilisées par Henderson et al. (CWHM12) ainsi que Reed et al. (Compound 8), qu'ils ont utilisé comme anti-

fibrotique. Nous avons cherché dans un premier temps à utiliser le CWHM12 mais de nombreuses informations contradictoires sont disponibles. En effet le distributeur Français propose une solubilité maximale de 0,33mg/mL dans un mélange DMSO/PBS, mais il semblerait que sa solubilité réelle soit bien supérieure. Néanmoins il serait utile de tester cette molécule car elle permet une inhibition de l'ensemble des intégrines αV dans une gamme de l'ordre du nanomolaire (sauf $\alpha V\beta 5$, de l'ordre de 60nM). Le second composé, « compound 8 » n'est pas commercialisé pour le moment et permet une inhibition de $\alpha V\beta 1$ seulement avec une affinité inférieure au nanomolaire. Le test de cette dernière molécule pourrait permettre de déterminer finalement si les cellules exprimant PW1 expriment préférentiellement la sous unité $\beta 1$ ou la sous unité $\beta 3$.

Annexes



Annexe 1 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de la stratégie utilisée pour obtenir les membranomes des différentes populations analysées par RNAseq



Annexe 2: Cytogrammes représentatifs de l'analyse de l'expression des marqueurs CD140a (PDGFR α) et de l'activité β -Gal de populations de cellules vivantes exprimant CD51 et/ou CD45. Le Panneau du haut reflète la ségrégation selon CD140a, les panneaux du bas, l'activité β -Gal dans les populations définies en fonction de l'expression de CD140a. De manière intrigante, la population CD51⁺CD45⁻ est majoritairement positive pour β -Gal dans le sous-groupe exprimant PDGFR α , alors que l'inverse est visible dans la population CD51⁺ CD45⁺, dans laquelle l'expression de PDGFR α exclut totalement l'expression de la β -Gal.

Annexe 3 : Paramètres utilisés en référence à l'annexe 1 pour obtenir le membranome prédit (en rouge sont signalés les paramètres modifiés pour obtenir le secrétome).

Etape	Nom de l'outil	Paramètres appliqués
A	Get ORF or CDS :	Genetic code: standard
		Look for ORF or CDS : CDS (with start and stop codon)
		Selection criteria: All ORF/CDS from each sequence with the maximum length
		Minimum length for CDS (in AA): 70
		Strand to search: Search both forward and reverse strand.
B	SignalP v3.0	Organism : eukaryote
		Truncate sequence to : 70AA
C	Fasta to tabular	Divided in 2columns
		No title character to keep
		(C1 : Ensembl transcript ID – C2 : Sequence informations – C3 : sequence)
D	Filter	c14='Y' or c15='S' or c15='A'
E	Compare two datasets	Using column 1
		Against column 1
		To find: matching rows of first dataset
F	tabular to fasta	Title column 1
		Sequence column 3
G	wolfpsort	Organism: animal
H	TMHMM	
I	NLStradamus	Model: two state
		Algorithm: both (Viterbi & posterior with threshold)
		Threshold: 0, 65
J	PredictNLS	
K	select	That: matching
		The pattern: plas
L	compare two datasets	Using column 1
		Against column 1

		To find: non matching rows of first dataset
M	Filter	With following conditions: $c4==1$
		Number of header lines to skip: 0
N	concatenate datasets	
O	compare two datasets	Using column 1
		Against column 1
		To find: non matching rows of first dataset
P	Filter	With following conditions: $c5>0$
		Number of header lines to skip: 0
Q	Compare two datasets	Using column 1
		Against column 1
		To find: matching rows of first dataset
R	Compare two datasets	Using column 1
		Against column 1
		To find: matching rows of first dataset

Annexe 4 : Liste des 378 transcrits retrouvés comme spécifiques à la membrane des cellules PW1+.

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST00000132517	ABCA7	ATP binding cassette subfamily A member 7	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000106669	ABCA8	ATP binding cassette subfamily A member 8	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000126846	ABCB1	ATP binding cassette subfamily B member 1	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000130671	ABCC1	ATP binding cassette subfamily C member 1	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000201125	Abhd1	abhydrolase domain containing 1	Other	other
ENSMUST00000090935	ACVR1	activin A receptor type 1	Plasma Membrane	kinase
ENSMUST00000087374	ADAM23	ADAM metallopeptidase domain 23	Plasma Membrane	peptidase
ENSMUST00000050342	ADAM30	ADAM metallopeptidase domain 30	Plasma Membrane	peptidase
ENSMUST00000085319	Adam4/Gm4787	a disintegrin and metallopeptidase domain 4	Other	peptidase
ENSMUST00000165786	ADCYAP1R1	ADCYAP receptor type I	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000026548	ADGRA1	adhesion G protein-coupled receptor A1	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000106018	ADGRB2	adhesion G protein-coupled receptor B2	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000156437	ADGRD1	adhesion G protein-coupled receptor D1	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000112398	ADGRG2	adhesion G protein-coupled receptor G2	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST00000051259	ADGRG3	adhesion G protein-coupled receptor G3	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000023437	ADGRG7	adhesion G protein-coupled receptor G7	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000195988	ADGRL2	adhesion G protein-coupled receptor L2	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000072521	ADGRL3	adhesion G protein-coupled receptor L3	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000046977	ADGRL4	adhesion G protein-coupled receptor L4	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000054661	ADRA1A	adrenoceptor alpha 1A	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000071902	ADRA2B	adrenoceptor alpha 2B	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000164728	ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000023809	AMHR2	anti-Mullerian hormone receptor type 2	Plasma Membrane	kinase
ENSMUST00000106656	AMIGO1	adhesion molecule with Ig like domain 1	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000168309	APH1B	aph-1 homolog B, gamma-secretase subunit	Other	peptidase
ENSMUST00000055327	AQP3	aquaporin 3 (Gill blood group)	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000074465	AQP9	aquaporin 9	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000041229	BDKRB1	bradykinin receptor B1	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST00000114634	BOC	BOC cell adhesion associated, oncogene regulated	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000101237	BST1	bone marrow stromal cell antigen 1	Plasma Membrane	enzyme
ENSMUST00000025198	BTNL2	butyrophilin like 2	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000036181	CA14	carbonic anhydrase 14	Plasma Membrane	enzyme
ENSMUST00000112825	CACNA1C	calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C	Plasma Membrane	ion channel
ENSMUST00000021066	CACNG4	calcium voltage-gated channel auxiliary subunit gamma 4	Plasma Membrane	ion channel
ENSMUST00000034581	CADM1	cell adhesion molecule 1	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000099944	CALCRL	calcitonin receptor like receptor	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000039171	CCR3	C-C motif chemokine receptor 3	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000103134	CCR7	C-C motif chemokine receptor 7	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000147399	CD101	CD101 molecule	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000032234	CD163	CD163 molecule	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000105910	CD164L2	CD164 molecule like 2	Other	other
ENSMUST00000057488	CD200R1	CD200 receptor 1	Plasma Membrane	other

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST00000102805	CD200R1L	CD200 receptor 1 like	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000037882	CD207	CD207 molecule	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000145007	Cd209f	CD209f antigen	Other	other
ENSMUST00000004829	CD244	CD244 molecule	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000027849	CD247	CD247 molecule	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000165365	CD276	CD276 molecule	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000062787	CD300E	CD300e molecule	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000051264	CD300LF	CD300 molecule like family member f	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000028356	CD302	CD302 molecule	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000004728	Cd33	CD33 antigen	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000033063	CD37	CD37 molecule	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000111198	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000025571	CD5	CD5 molecule	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000032259	CD69	CD69 molecule	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000026159	CD7	CD7 molecule	Plasma Membrane	other

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST00000028644	CD82	CD82 molecule	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000042302	CD84	CD84 molecule	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000039229	CDCP1	CUB domain containing protein 1	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000105462	CDH23	cadherin related 23	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000119129	CDON	cell adhesion associated, oncogene regulated	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000028515	CHRNA1	cholinergic receptor nicotinic alpha 1 subunit	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000032738	CHRNA7	cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000200558	CHRNA2	cholinergic receptor nicotinic beta 2 subunit	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000114684	CLCN1	chloride voltage-gated channel 1	Plasma Membrane	ion channel
ENSMUST00000007207	CLCN2	chloride voltage-gated channel 2	Plasma Membrane	ion channel
ENSMUST00000023154	CLDN1	claudin 1	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000047761	CLDN10	claudin 10	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000046174	CLDN11	claudin 11	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000060947	CLDN12	claudin 12	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000111093	CLDN15	claudin 15	Plasma Membrane	other

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST00000094245	CLDN3	claudin 3	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000051401	CLDN4	claudin 4	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000018713	CLDN7	claudin 7	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000159944	CLDND1	claudin domain containing 1	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000133756	CLEC12A	C-type lectin domain family 12 member A	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000032261	CLEC12B	C-type lectin domain family 12 member B	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000032262	CLEC1B	C-type lectin domain family 1 member B	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000032258	Clec2e/Clec2h	C-type lectin domain family 2, member h	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000117173	Clec4a3	C-type lectin domain family 4, member a3	Other	other
ENSMUST00000012847	CLEC4M	C-type lectin domain family 4 member M	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000112076	CLEC7A	C-type lectin domain family 7 member A	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000058352	CLEC9A	C-type lectin domain family 9 member A	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000077666	CNNM2	cyclin and CBS domain divalent metal cation transport mediator 2	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000001166	CNNM3	cyclin and CBS domain divalent metal cation transport mediator 3	Other	other

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST0000003568	CRHR2	corticotropin releasing hormone receptor 2	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST0000106162	CSF3R	colony stimulating factor 3 receptor	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST0000082104	CSMD1	CUB and Sushi multiple domains 1	Plasma Membrane	other
ENSMUST0000064165	CX3CR1	C-X3-C motif chemokine receptor 1	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST0000169168	CYSLTR2	cysteinyl leukotriene receptor 2	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST0000039327	DAGLA	diacylglycerol lipase alpha	Plasma Membrane	enzyme
ENSMUST0000097333	DDR1	discoidin domain receptor tyrosine kinase 1	Plasma Membrane	kinase
ENSMUST0000027985	DDR2	discoidin domain receptor tyrosine kinase 2	Plasma Membrane	kinase
ENSMUST0000117082	DGCR2	DiGeorge syndrome critical region gene 2	Plasma Membrane	other
ENSMUST0000034373	DPEP2	dipeptidase 2	Plasma Membrane	peptidase
ENSMUST0000053734	DUOX2	dual oxidase 2	Plasma Membrane	enzyme
ENSMUST0000172237	EDNRB	endothelin receptor type B	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST0000029658	ENPEP	glutamyl aminopeptidase	Plasma Membrane	peptidase
ENSMUST0000112231	ENTPD1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	Plasma Membrane	enzyme

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST000 00047687	ENTPD3	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3	Plasma Membrane	enzyme
ENSMUST000 00035129	EPHB1	EPH receptor B1	Plasma Membrane	kinase
ENSMUST000 00059287	EPHB2	EPH receptor B2	Plasma Membrane	kinase
ENSMUST000 00022182	F2RL2	coagulation factor II thrombin receptor like 2	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST000 00147696	FAM189B	family with sequence similarity 189 member B	Other	other
ENSMUST000 00062784	FAM26F	family with sequence similarity 26 member F	Other	other
ENSMUST000 00169560	FAM57A	family with sequence similarity 57 member A	Plasma Membrane	other
ENSMUST000 00193973	FCER1G	Fc fragment of IgE receptor Ig	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST000 00072480	FCRL1	Fc receptor like 1	Other	other
ENSMUST000 00194102	FCRL5	Fc receptor like 5	Plasma Membrane	other
ENSMUST000 00067098	FFAR4	free fatty acid receptor 4	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST000 00117872	FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2	Plasma Membrane	kinase
ENSMUST000 00087820	FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3	Plasma Membrane	kinase
ENSMUST000 00064068	FPR2	formyl peptide receptor 2	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST0000054871	Fpr3	formyl peptide receptor 3	Other	other
ENSMUST0000167369	FXD3	FXD domain containing ion transport regulator 3	Plasma Membrane	other
ENSMUST0000161684	FXD5	FXD domain containing ion transport regulator 5	Plasma Membrane	ion channel
ENSMUST0000116133	FZD5	frizzled class receptor 5	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST0000062572	FZD9	frizzled class receptor 9	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST0000039697	GABRB3	gamma-aminobutyric acid type A receptor beta3 subunit	Plasma Membrane	ion channel
ENSMUST0000114553	GABRQ	gamma-aminobutyric acid type A receptor theta subunit	Plasma Membrane	ion channel
ENSMUST0000134503	GGT1	gamma-glutamyltransferase 1	Plasma Membrane	enzyme
ENSMUST0000094790	GIPR	gastric inhibitory polypeptide receptor	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST0000106091	GJB3	gap junction protein beta 3	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000046498	GJB5	gap junction protein beta 5	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000107075	GJC1	gap junction protein gamma 1	Plasma Membrane	ion channel
ENSMUST0000114574	GLP1R	glucagon like peptide 1 receptor	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST00000051765	GLP2R	glucagon like peptide 2 receptor	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000061190	GP5	glycoprotein V platelet	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000166860	GPA33	glycoprotein A33	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000060210	GPM6B	glycoprotein M6B	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000099776	GPR137	G protein-coupled receptor 137	Other	other
ENSMUST00000065335	GPR141	G protein-coupled receptor 141	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000100514	GPR146	G protein-coupled receptor 146	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000105650	GPR153	G protein-coupled receptor 153	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000061274	GPR156	G protein-coupled receptor 156	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000178700	GPR161	G protein-coupled receptor 161	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000085040	GPR171	G protein-coupled receptor 171	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000093942	GPR179	G protein-coupled receptor 179	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000055475	GPR18	G protein-coupled receptor 18	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000065441	GPR21	G protein-coupled receptor 21	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000105911	GPR3	G protein-coupled receptor 3	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST0000064480	GPR35	G protein-coupled receptor 35	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST0000027682	GPR37L1	G protein-coupled receptor 37 like 1	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST0000027581	GPR39	G protein-coupled receptor 39	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST0000109430	GPR75	G protein-coupled receptor 75	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST0000053659	GPR82	G protein-coupled receptor 82	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST0000079824	GPR84	G protein-coupled receptor 84	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST0000094179	GRIA1	glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1	Plasma Membrane	ion channel
ENSMUST0000076349	GRIA3	glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3	Plasma Membrane	ion channel
ENSMUST0000063508	GRIA4	glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4	Plasma Membrane	ion channel
ENSMUST0000079751	GRIK2	glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 2	Plasma Membrane	ion channel
ENSMUST0000003351	GRIN2C	glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2C	Plasma Membrane	ion channel
ENSMUST0000073935	GSG1L	GSG1 like	Plasma Membrane	other

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST00000003762	HAS1	hyaluronan synthase 1	Plasma Membrane	enzyme
ENSMUST00000176144	HAS3	hyaluronan synthase 3	Plasma Membrane	enzyme
ENSMUST00000020668	HAVCR2	hepatitis A virus cellular receptor 2	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000164267	HCAR1	hydroxycarboxylic acid receptor 1	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000041982	HLA-DMB	major histocompatibility complex, class II, DM beta	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000174751	HLA-DQA1	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000113742	HLA-F	major histocompatibility complex, class I, F	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000117699	HTR1D	5-hydroxytryptamine receptor 1D	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000117748	IFNAR1	interferon alpha and beta receptor subunit 1	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000034961	IGDCC3	immunoglobulin superfamily DCC subclass member 3	Other	other
ENSMUST00000195164	IGSF3	immunoglobulin superfamily member 3	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000039506	IGSF8	immunoglobulin superfamily member 8	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000034594	IL10RA	interleukin 10 receptor subunit alpha	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000112827	IL13RA2	interleukin 13 receptor subunit alpha 2	Plasma Membrane	transmembrane receptor

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST00000016110	IL17RB	interleukin 17 receptor B	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000027237	IL18RAP	interleukin 18 receptor accessory protein	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000027243	IL1R2	interleukin 1 receptor type 2	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000167925	IL5RA	interleukin 5 receptor subunit alpha	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000107582	INSRR	insulin receptor related receptor	Plasma Membrane	kinase
ENSMUST00000170421	ISLR2	immunoglobulin superfamily containing leucine rich repeat 2	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000029744	ITGA10	integrin subunit alpha 10	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000177111	ITGAD	integrin subunit alpha D	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000111740	ITGAV	integrin subunit alpha V	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000033053	ITGAX	integrin subunit alpha X	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000154021	ITPRIPL1	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor interacting protein-like 1	Other	other
ENSMUST00000020362	KCNMB1	potassium calcium-activated channel subfamily M regulatory beta subunit 1	Plasma Membrane	ion channel
ENSMUST00000000811	KCNN3	potassium calcium-activated channel subfamily N member 3	Plasma Membrane	ion channel

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST00000107618	KIRREL	kin of IRRE like (Drosophila)	Plasma Membrane	other
ENSMUST0000045529	KISS1R	KISS1 receptor	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST0000071554	Klra7 (includes other)	killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 4	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST0000032472	KLRB1	killer cell lectin like receptor B1	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST0000032257	Klrb1f	killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1F	Plasma Membrane	other
ENSMUST0000032207	KLRG1	killer cell lectin like receptor G1	Plasma Membrane	other
ENSMUST0000037552	LEPR	leptin receptor	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST0000054274	LHFPL2	lipoma HMGIC fusion partner-like 2	Other	enzyme
ENSMUST0000078778	LILRB4	leukocyte immunoglobulin like receptor B4	Plasma Membrane	other
ENSMUST0000114247	LINGO1	leucine rich repeat and Ig domain containing 1	Plasma Membrane	other
ENSMUST0000196321	LMBR1	limb development membrane protein 1	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST0000109127	LMBR1L	limb development membrane protein 1 like	Plasma Membrane	other
ENSMUST0000030356	LRP8	LDL receptor related protein 8	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST0000055211	LRRC3B	leucine rich repeat containing 3B	Other	other

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST000 00091636	LRRTM2	leucine rich repeat transmembrane neuronal 2	Plasma Membrane	other
ENSMUST000 00099761	LSAMP	limbic system-associated membrane protein	Plasma Membrane	other
ENSMUST000 00028362	LY75	lymphocyte antigen 75	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST000 00004827	LY9	lymphocyte antigen 9	Plasma Membrane	other
ENSMUST000 00159417	LYPD1	LY6/PLAUR domain containing 1	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST000 00020554	Madcam1	mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1	Plasma Membrane	other
ENSMUST000 00040548	MAG	myelin associated glycoprotein	Plasma Membrane	other
ENSMUST000 00115442	MET	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	Plasma Membrane	kinase
ENSMUST000 00139954	MFSD11	major facilitator superfamily domain containing 11	Other	other
ENSMUST000 00095749	Mfsd4b3	major facilitator superfamily domain containing 4B3	Other	other
ENSMUST000 00058092	MRGPRG	MAS related GPR family member G	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST000 00159587	Ms4a6b	membrane-spanning 4- domains, subfamily A, member 6B	Other	other
ENSMUST000 00044451	NAALADL1	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase like 1	Plasma Membrane	peptidase
ENSMUST000 00043189	NFASC	neurofascin	Plasma Membrane	other

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST000 00119374	NKAIN3	Sodium/potassium transporting ATPase interacting 3	Other	other
ENSMUST000 00006825	NPHS1	NPHS1, nephrin	Plasma Membrane	other
ENSMUST000 00072671	NRXN1	neurexin 1	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST000 00079828	NTRK2	neurotrophic receptor tyrosine kinase 2	Plasma Membrane	kinase
ENSMUST000 00121504	ORAI3	ORAI calcium release- activated calcium modulator 3	Other	other
ENSMUST000 00176826	OSMR	oncostatin M receptor	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST000 00097625	PAM	peptidylglycine alpha- amidating monooxygenase	Plasma Membrane	enzyme
ENSMUST000 00170695	PCDH10	protocadherin 10	Plasma Membrane	other
ENSMUST000 00025311	PCDH12	protocadherin 12	Plasma Membrane	other
ENSMUST000 00195355	PCDH8	protocadherin 8	Plasma Membrane	other
ENSMUST000 00056522	PCDHB2	protocadherin beta 2	Plasma Membrane	other
ENSMUST000 00051754	PCDHB3	protocadherin beta 3	Plasma Membrane	other
ENSMUST000 00053037	Pcdhb7	protocadherin beta 7	Plasma Membrane	other
ENSMUST000 00051163	Pcdhb8	protocadherin beta 8	Plasma Membrane	other

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST000 00194888	PCDHGA1	protocadherin gamma subfamily A, 1	Plasma Membrane	other
ENSMUST000 00194447	PCDHGC3	protocadherin gamma subfamily C, 3	Plasma Membrane	other
ENSMUST000 00112576	PDCD1LG2	programmed cell death 1 ligand 2	Plasma Membrane	enzyme
ENSMUST000 00168162	PDGFRA	platelet derived growth factor receptor alpha	Plasma Membrane	kinase
ENSMUST000 00115274	PDGFRB	platelet derived growth factor receptor beta	Plasma Membrane	kinase
ENSMUST000 00173490	PEAR1	platelet endothelial aggregation receptor 1	Plasma Membrane	other
ENSMUST000 00068021	PECAM1	platelet and endothelial cell adhesion molecule 1	Plasma Membrane	other
ENSMUST000 00032479	PIANP	PILR alpha associated neural protein	Plasma Membrane	other
ENSMUST000 00182177	PIEZO2	piezo mechanosensitive ion channel component 2	Other	ion channel
ENSMUST000 00098375	PKD1L2	polycystin 1 like 2 (gene/pseudogene)	Other	ion channel
ENSMUST000 00057344	PKD1L3	polycystin 1 like 3, transient receptor potential channel interacting	Plasma Membrane	ion channel
ENSMUST000 00166156	PKD2L2	polycystin 2 like 2, transient receptor potential cation channel	Plasma Membrane	ion channel
ENSMUST000 00034227	PLLP	plasmolipin	Plasma Membrane	transporter

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST00000033800	PLP1	proteolipid protein 1	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000063879	PLPP2	phospholipid phosphatase 2	Plasma Membrane	phosphatase
ENSMUST00000049845	PLXNA1	plexin A1	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000004326	PLXNA3	plexin A3	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000054125	PMEL	premelanosome protein	Plasma Membrane	enzyme
ENSMUST00000108700	PMP22	peripheral myelin protein 22	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000175889	PPP1R9A	protein phosphatase 1 regulatory subunit 9A	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000172945	Prrt1	proline-rich transmembrane protein 1	Other	other
ENSMUST00000101059	PRRT3	proline rich transmembrane protein 3	Other	other
ENSMUST00000030443	PTCH2	patched 2	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000120563	PTGER4	prostaglandin E receptor 4	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000029670	PTGFR	prostaglandin F receptor	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000167679	PTPRO	protein tyrosine phosphatase, receptor type O	Plasma Membrane	phosphatase
ENSMUST00000090568	PTPRZ1	protein tyrosine phosphatase, receptor type Z1	Plasma Membrane	phosphatase

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST00000155413	RELT	RELT tumor necrosis factor receptor	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST0000030627	RHCE/RHD	Rh blood group D antigen	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000021918	ROR2	receptor tyrosine kinase like orphan receptor 2	Plasma Membrane	kinase
ENSMUST00000122088	S1PR5	sphingosine-1-phosphate receptor 5	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000148373	SCARB1	scavenger receptor class B member 1	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000049941	SCN3B	sodium voltage-gated channel beta subunit 3	Plasma Membrane	ion channel
ENSMUST00000152591	SDC3	syndecan 3	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000166237	SEMA4A	semaphorin 4A	Plasma Membrane	other
ENSMUST0000021900	SEMA4D	semaphorin 4D	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000115449	SEMA6A	semaphorin 6A	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000001256	SEMA6B	semaphorin 6B	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000105996	SERINC2	serine incorporator 2	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000166320	SGCA	sarcoglycan alpha	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000133306	SGCE	sarcoglycan epsilon	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000077954	SGCG	sarcoglycan gamma	Plasma Membrane	other

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST00000023138	SHISA9	shisa family member 9	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000049262	SIRPA	signal regulatory protein alpha	Plasma Membrane	phosphatase
ENSMUST00000030180	SIT1	signaling threshold regulating transmembrane adaptor 1	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000095572	SLC10A1	solute carrier family 10 member 1	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000031263	SLC10A6	solute carrier family 10 member 6	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000131511	SLC11A1	solute carrier family 11 member 1	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000124324	SLC11A2	solute carrier family 11 member 2	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000202223	SLC12A5	solute carrier family 12 member 5	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000021161	SLC13A5	solute carrier family 13 member 5	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000106723	SLC16A4	solute carrier family 16 member 4	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000159230	SLC19A2	solute carrier family 19 member 2	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000025875	SLC1A1	solute carrier family 1 member 1	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000005493	SLC1A3	solute carrier family 1 member 3	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000153455	SLC1A3	solute carrier family 1 member 3	Plasma Membrane	transporter

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST00000109594	SLC1A4	solute carrier family 1 member 4	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000005490	SLC1A6	solute carrier family 1 member 6	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000110315	SLC20A1	solute carrier family 20 member 1	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000024596	SLC22A1	solute carrier family 22 member 1	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000027405	SLC23A3	solute carrier family 23 member 3	Other	transporter
ENSMUST00000107158	SLC24A2	solute carrier family 24 member 2	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000119595	SLC29A3	solute carrier family 29 member 3	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000166135	SLC2A3	solute carrier family 2 member 3	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000178809	SLC2A4	solute carrier family 2 member 4	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000030826	SLC2A5	solute carrier family 2 member 5	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000191777	SLC2A8	solute carrier family 2 member 8	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000005238	SLC2A9	solute carrier family 2 member 9	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000081094	SLC30A2	solute carrier family 30 member 2	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000189443	SLC35F5	solute carrier family 35 member F5	Other	other
ENSMUST00000165149	SLC37A1	solute carrier family 37 member 1	Plasma Membrane	transporter

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST0000022688	SLC39A14	solute carrier family 39 member 14	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000160668	SLC39A2	solute carrier family 39 member 2	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000059551	SLC39A3	solute carrier family 39 member 3	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000073428	SLC39A4	solute carrier family 39 member 4	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000169397	SLC39A7	solute carrier family 39 member 7	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000032177	SLC41A3	solute carrier family 41 member 3	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000111624	SLC43A1	solute carrier family 43 member 1	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000108433	SLC43A2	solute carrier family 43 member 2	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000107646	SLC44A1	solute carrier family 44 member 1	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000039197	SLC44A3	solute carrier family 44 member 3	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000010267	SLC47A1	solute carrier family 47 member 1	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000132445	SLC50A1	solute carrier family 50 member 1	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000109861	SLC52A3	solute carrier family 52 member 3	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000167299	SLC5A11	solute carrier family 5 member 11	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000120757	Slc5a4b	solute carrier family 5 member (neutral amino acid	Other	transporter

transporters, system A),
member 4b

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST0000000809	SLC5A5	solute carrier family 5 member 5	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000080431	SLC5A6	solute carrier family 5 member 6	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000165456	SLC6A12	solute carrier family 6 member 12	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000120322	SLC6A19	solute carrier family 6 member 19	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000149168	SLC6A9	solute carrier family 6 member 9	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000029297	SLC7A11	solute carrier family 7 member 11	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000057784	SLC7A2	solute carrier family 7 member 2	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000073927	SLC7A3	solute carrier family 7 member 3	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000116648	SLC7A4	solute carrier family 7 member 4	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000000984	SLC7A7	solute carrier family 7 member 7	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000163123	SLC8A1	solute carrier family 8 member A1	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000064594	SLC8A3	solute carrier family 8 member A3	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000111889	SLC8B1	solute carrier family 8 member B1	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST0000156079	SLC9A1	solute carrier family 9 member A1	Plasma Membrane	ion channel

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST00000114784	SLC9A6	solute carrier family 9 member A6	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000139902	SLCO4A1	solute carrier organic anion transporter family member 4A1	Plasma Membrane	transporter
ENSMUST00000162131	SPATA13	spermatogenesis associated 13	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000053239	SSTR3	somatostatin receptor 3	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000052113	ST7	suppression of tumorigenicity 7	Other	other
ENSMUST00000035288	STAB2	stabilin 2	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000030011	Stra6l	STRA6-like	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000040166	SUSD1	sushi domain containing 1	Other	other
ENSMUST00000007236	SYNGR3	synaptogyrin 3	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000030792	TAS1R1	taste 1 receptor member 1	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000030949	TAS1R3	taste 1 receptor member 3	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000073939	TEK	TEK receptor tyrosine kinase	Plasma Membrane	kinase
ENSMUST00000096065	TIGIT	T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000059349	TLR1	toll like receptor 1	Plasma Membrane	transmembrane receptor

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST0000034056	TLR3	toll like receptor 3	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST0000110997	TLR5	toll like receptor 5	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST0000049023	TLR8	toll like receptor 8	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST0000123476	TMEFF1	transmembrane protein with EGF like and two follistatin like domains 1	Plasma Membrane	other
ENSMUST0000156230	TMEM104	transmembrane protein 104	Other	transporter
ENSMUST0000092852	TMEM132E	transmembrane protein 132E	Other	other
ENSMUST0000002413	TMEM161A	transmembrane protein 161A	Other	other
ENSMUST0000077517	TMEM236	transmembrane protein 236	Other	other
ENSMUST0000107609	TMEM245	transmembrane protein 245	Other	other
ENSMUST0000080995	TMEM26	transmembrane protein 26	Other	other
ENSMUST0000150052	TMEM47	transmembrane protein 47	Plasma Membrane	other
ENSMUST0000128906	TMEM80	transmembrane protein 80	Other	other
ENSMUST0000058167	TMEM81	transmembrane protein 81	Other	other
ENSMUST0000090046	TMEM87A	transmembrane protein 87A	Other	other

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST00000143398	TMEM87B	transmembrane protein 87B	Other	other
ENSMUST0000045919	TNFRSF14	TNF receptor superfamily member 14	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000103173	TNFRSF18	TNF receptor superfamily member 18	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000025706	TNFRSF25	TNF receptor superfamily member 25	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000030339	TNFRSF8	TNF receptor superfamily member 8	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000030047	TNFSF8	tumor necrosis factor superfamily member 8	Plasma Membrane	cytokine
ENSMUST00000152045	TPRA1	transmembrane protein adipocyte associated 1	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000048782	TREM1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000170941	TREML2	triggering receptor expressed on myeloid cells like 2	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000061632	TRHDE	thyrotropin releasing hormone degrading enzyme	Plasma Membrane	peptidase
ENSMUST00000127277	TRPM7	transient receptor potential cation channel subfamily M member 7	Plasma Membrane	kinase
ENSMUST00000021346	TSHR	thyroid stimulating hormone receptor	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000031678	TSPAN12	tetraspanin 12	Plasma Membrane	other

Gene ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
ENSMUST00000099503	TSPAN17	tetraspanin 17	Other	enzyme
ENSMUST00000009396	TSPAN32	tetraspanin 32	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000046750	TSPAN33	tetraspanin 33	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000121826	TSPAN5	tetraspanin 5	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000149982	TSPAN7	tetraspanin 7	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000179196	TSPAN8	tetraspanin 8	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000169796	ULBP1	UL16 binding protein 1	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000075282	UNC5C	unc-5 netrin receptor C	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ENSMUST00000084966	UNC93A	unc-93 homolog A (C. elegans)	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000039044	UTS2R	urotensin 2 receptor	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000011315	VIPR2	vasoactive intestinal peptide receptor 2	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000170922	Vmn2r32 (includes others)	vomer nasal 2, receptor 32	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
ENSMUST00000050707	VSIG4	V-set and immunoglobulin domain containing 4	Plasma Membrane	other
ENSMUST00000182350	XCR1	X-C motif chemokine receptor 1	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor

Annexe 5 : Contenu du script de calcul des masses théoriques attendues.

Commande générale pour lancer le script :

```
python          script_masse_peptide_IAA.py          masse_aa_IAA.txt  
PW1_prot_pep/nom_prot.tsv results/nom_prot_mass.txt
```

Contenu du script python :

```
import sys  
  
#fichier masses acides amines  
maa=open(sys.argv[1],"r")  
  
#fichier de séquences protéiques  
seq=open(sys.argv[2],"r")  
  
#exporter les résultats  
res=open(sys.argv[3],"w")  
res.write("seq"+"\\t"+"poids"+"\\t"+"nombre Nglyc"+"\\t"+"poids Nglyc"+"\\t"+"Nbre  
deriv"+"\\t"+"poids derive"+"\\t"+"poidsmax"+"\\n")  
  
#stocker les masses des aa dans un dictionnaire  
dd={}  
ligne=maa.readline()  
dd[ligne.split("\\t")[0]]=ligne.split("\\r\\n")[0].split("\\t")[1]  
ligne=maa.readline()  
while ligne:  
    dd[ligne.split("\\t")[0]]=ligne.split("\\r\\n")[0].split("\\t")[1]  
    ligne=maa.readline()  
print "dico", dd  
  
#lire le fichier de séquences
```

```

ls=seq.readline()
print "ls", ls
print ls.split("\t")

```

```

ls=seq.readline()

```

```

while ls:

```

```

    prot=ls.split("\t")[1]

```

```

    suiv=ls.split("\t")[2]

```

```

    print "prot", prot

```

```

    print "suiv", suiv

```

```

    print len(prot)

```

```

    poids=18.01056

```

```

    Nglyc=0

```

```

    poidsNglyc=0

```

```

    nbderiv=0

```

```

    nterm=0

```

```

    for i in range(len(prot)):

```

```

        poids+=float(dd[prot[i]])

```

```

        if (prot[i]=="N") and ((i+1) in range(len(prot))) and (prot[i+1]!="P"):

```

```

            if ((i+2) in range(len(prot))) and ((prot[i+2]=="S") or
(prot[i+2]=="T")):

```

```

                Nglyc+=1

```

```

            elif (((i+2)==len(prot)) and ((suiv=="S") or (suiv=="T"))): #len

```

prot = nombre d'AA mais i commence à 0 donc len(prot)==(i+1), si i est avant dernier,
la fin est à i+2

```

                Nglyc+=1

```

```

            if prot[i]=="K" and (i+1)!=len(prot):

```

```

                nbderiv+=1

```

```

        if suiv=="-":

```

```

nterm+=1
print "N-term"

poidsNglyc=poids+Nglyc*0.98401 #rajout du poids des N-glycannes
poidsderiv=poids+(nbderiv+nterm)*131.00410
poidsmax=poids+(Nglyc*0.98401)+((nbderiv+nterm)*131.00410)
print "poids", poids
res.write(prot+"\t"+str(poids)+"\t"+str(Nglyc)+"\t"+str(poidsNglyc)+"\t"+str(
nbderiv)+"\t"+str(nterm)+"\t"+str(poidsderiv)+"\t"+str(poidsmax)+"\n")
ls=seq.readline()

#fermer les fichiers
seq.close()
maa.close()
res.close()

```

Contenu du fichier masse_aa-IAA (après réduction et alkylation par l'iodoacétamide)

A	71.03711
R	156.10111
N	114.04293
D	115.02694
C	160.03065
E	129.04259
Q	128.05858
G	57.02146
H	137.05891
I	113.08406
L	113.08406
K	128.09496
M	131.04049
F	147.06841

P	97.05276
S	87.03203
T	101.04768
W	186.07931
Y	163.06333
V	99.06841

Annexe 6 : Liste des protéines membranaires retrouvées par spectrométrie de masse dans les cellules PW1⁺ puis vérifiée via IPA.

Uniprot ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
Q4KML4	ABRACL	ABRA C-terminal like	Other	other
B2RXR6	ANKRD 44	ankyrin repeat domain 44	Other	other
Q6PDB7	Ces2b	carboxyesterase 2B	Other	other
Q9D439	CFAP53	cilia and flagella associated protein 53	Other	other
Q8BQ47	CNPY4	canopy FGF signaling regulator 4	Other	other
Q6PCQ6	EFCAB1 4	EF-hand calcium binding domain 14	Other	other
Q8C845	EFHD2	EF-hand domain family member D2	Other	other
Q8K2Y3	EVA1B	eva-1 homolog B	Other	other
H3BJI7	Methig 1	methyltransferase hypoxia inducible domain containing 1	Other	other
G3X9G9	Mettl7a 2/Mettl 7a3	methyltransferase like 7A3	Other	other
F7AA26	Pakap	paralemmin A kinase anchor protein	Other	other
Q3TDD9	PPP1R2 1	protein phosphatase 1 regulatory subunit 21	Other	other
Q8K441	ABCA6	ATP binding cassette subfamily A member 6	Plasma Membrane	transporter
Q8K440	ABCA8	ATP binding cassette subfamily A member 8	Plasma Membrane	transporter
P21447	ABCB1	ATP binding cassette subfamily B member 1	Plasma Membrane	transporter
P06795	Abcb1b	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B	Plasma Membrane	transporter
Q99LR1	ABHD1 2	abhydrolase domain containing 12	Plasma Membrane	enzyme

Uniprot ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
P09470	ACE	angiotensin I converting enzyme	Plasma Membrane	peptidase
P61161	ACTR2	ARP2 actin related protein 2 homolog	Plasma Membrane	other
Q99JY9	ACTR3	ARP3 actin related protein 3 homolog	Plasma Membrane	other
Q8VDL4	ADPGK	ADP dependent glucokinase	Plasma Membrane	kinase
Q9JKV1	ADRM1	adhesion regulating molecule 1	Plasma Membrane	other
O54931	AKAP2	A-kinase anchoring protein 2	Plasma Membrane	other
P09242	ALPL	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	Plasma Membrane	phosphatase
Q8C8R3	Ank2	ankyrin 2, brain	Plasma Membrane	other
Q6P9J9	ANO6	anoctamin 6	Plasma Membrane	ion channel
P97449	ANPEP	alanyl aminopeptidase, membrane	Plasma Membrane	peptidase
P10107	ANXA1	annexin A1	Plasma Membrane	enzyme
P07356	ANXA2	annexin A2	Plasma Membrane	other
P97429	ANXA4	annexin A4	Plasma Membrane	other
P48036	ANXA5	annexin A5	Plasma Membrane	transporter
P14824	ANXA6	annexin A6	Plasma Membrane	ion channel

Uniprot ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
Q07076	ANXA7	annexin A7	Plasma Membrane	ion channel
O70423	AOC3	amine oxidase, copper containing 3	Plasma Membrane	enzyme
Q9DBG3	Ap2b1	adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit	Plasma Membrane	other
Q9Z1T1	AP3B1	adaptor related protein complex 3 beta 1 subunit	Plasma Membrane	transporte r
Q9D7N9	APMAP	adipocyte plasma membrane associated protein	Plasma Membrane	enzyme
Q8VBT6	APOBR	apolipoprotein B receptor	Plasma Membrane	transmem brane receptor
Q02013	AQP1	aquaporin 1 (Colton blood group)	Plasma Membrane	transporte r
Q9D0A3	ARPIN/ C15orf3 8- AP3S2	C15orf38-AP3S2 readthrough	Plasma Membrane	other
Q8VDN2	ATP1A1	ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit alpha 1	Plasma Membrane	transporte r
Q6PIE5	ATP1A2	ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit alpha 2	Plasma Membrane	transporte r
P14094	ATP1B1	ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 1	Plasma Membrane	transporte r
P97370	ATP1B3	ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 3	Plasma Membrane	transporte r
G5E829	ATP2B1	ATPase plasma membrane Ca ²⁺ transporting 1	Plasma Membrane	transporte r

Uniprot ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
Q6Q477	ATP2B4	ATPase plasma membrane Ca ²⁺ transporting 4	Plasma Membrane	transporter
P50516	ATP6V1 A	ATPase H ⁺ transporting V1 subunit A	Plasma Membrane	transporter
Q9R069	BCAM	basal cell adhesion molecule (Lutheran blood group)	Plasma Membrane	transmembrane receptor
J3QP71	BSG	basigin (Ok blood group)	Plasma Membrane	transporter
Q8R2Q8	Bst2	bone marrow stromal cell antigen 2	Plasma Membrane	other
P30993	C5AR1	complement C5a receptor 1	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
O08532	CACNA 2D1	calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta 1	Plasma Membrane	ion channel
E9QA16	Cald1	caldesmon 1	Plasma Membrane	other
P40124	CAP1	adenylate cyclase associated protein 1	Plasma Membrane	other
Q60865	CAPRIN 1	cell cycle associated protein 1	Plasma Membrane	other
P49817	CAV1	caveolin 1	Plasma Membrane	transmembrane receptor
P10810	CD14	CD14 molecule	Plasma Membrane	transmembrane receptor
O35566	CD151	CD151 molecule (Raph blood group)	Plasma Membrane	other

Uniprot ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
Q2VLH6	CD163	CD163 molecule	Plasma Membrane	transmembrane receptor
Q62192	CD180	CD180 molecule	Plasma Membrane	other
O54901	CD200	CD200 molecule	Plasma Membrane	other
Q64314	CD34	CD34 molecule	Plasma Membrane	other
Q08857	CD36	CD36 molecule	Plasma Membrane	transmembrane receptor
Q61735	CD47	CD47 molecule	Plasma Membrane	transmembrane receptor
P31996	CD68	CD68 molecule	Plasma Membrane	other
P40240	CD9	CD9 molecule	Plasma Membrane	other
P60766	Cdc42	cell division cycle 42	Plasma Membrane	enzyme
P49300	CLEC10A	C-type lectin domain family 10 member A	Plasma Membrane	other
Q9QYB1	CLIC4	chloride intracellular channel 4	Plasma Membrane	ion channel
O08585	CLTA	clathrin light chain A	Plasma Membrane	other
Q6IRU5	CLTB	clathrin light chain B	Plasma Membrane	other

Uniprot ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
Q68FD5	CLTC	clathrin heavy chain	Plasma Membrane	other
P97468	CMKLR1	chemerin chemokine-like receptor 1	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
Q3TWN3	CNNM2	cyclin and CBS domain divalent metal cation transport mediator 2	Plasma Membrane	transporter
Q9QXT0	CNPY2	canopy FGF signaling regulator 2	Plasma Membrane	other
Q8K4Q8	COLEC12	collectin subfamily member 12	Plasma Membrane	transmembrane receptor
Q64735	CR1L	complement C3b/C4b receptor 1 like	Plasma Membrane	other
Q9DCT8	Crip2	cysteine rich protein 2	Plasma Membrane	other
P26231	CTNNA1	catenin alpha 1	Plasma Membrane	other
Q60598	CTTN	cortactin	Plasma Membrane	other
P98078	DAB2	DAB2, clathrin adaptor protein	Plasma Membrane	other
Q9JLM8	DCLK1	doublecortin like kinase 1	Plasma Membrane	kinase
A2ADY9	DDI2	DNA damage inducible 1 homolog 2	Plasma Membrane	transporter
Q8K382	DENND1A	DENN domain containing 1A	Plasma Membrane	other
Q811D0	DLG1	discs large MAGUK scaffold protein 1	Plasma Membrane	kinase

Uniprot ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
P39054	DNM2	dynamamin 2	Plasma Membrane	enzyme
P28843	DPP4	dipeptidyl peptidase 4	Plasma Membrane	peptidase
Q4PZA2	ECE1	endothelin converting enzyme 1	Plasma Membrane	peptidase
Q8BG67	EFR3A	EFR3 homolog A	Plasma Membrane	other
Q01279	EGFR	epidermal growth factor receptor	Plasma Membrane	kinase
Q9EQP2	EHD4	EH domain containing 4	Plasma Membrane	enzyme
Q63961	ENG	endoglin	Plasma Membrane	transmembrane receptor
P06802	ENPP1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	Plasma Membrane	enzyme
Q6DYE8	ENPP3	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3	Plasma Membrane	enzyme
P55772	ENTPD1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	Plasma Membrane	enzyme
P48193	EPB41	erythrocyte membrane protein band 4.1	Plasma Membrane	other
O70318	EPB41L 2	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 2	Plasma Membrane	other
Q80VP1	EPN1	epsin 1	Plasma Membrane	other
Q60902	EPS15L 1	epidermal growth factor receptor pathway substrate 15 like 1	Plasma Membrane	other

Uniprot ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
Q08509	EPS8	epidermal growth factor receptor pathway substrate 8	Plasma Membrane	peptidase
Q8BFZ9	ERLIN2	ER lipid raft associated 2	Plasma Membrane	kinase
Q3TZZ7	ESYT2	extended synaptotagmin 2	Plasma Membrane	other
Q6PGF7	EXOC8	exocyst complex component 8	Plasma Membrane	other
P26040	EZR	ezrin	Plasma Membrane	other
F8VPU2	FARP1	FERM, ARH/RhoGEF and pleckstrin domain protein 1	Plasma Membrane	other
P20491	FCER1G	Fc fragment of IgE receptor Ig	Plasma Membrane	transmembrane receptor
P08101	FCGR2B	Fc fragment of IgG receptor IIb	Plasma Membrane	transmembrane receptor
Q61559	FCGRT	Fc fragment of IgG receptor and transporter	Plasma Membrane	transmembrane receptor
Q6P9Q6	FKBP15	FK506 binding protein 15	Plasma Membrane	enzyme
O08917	FLOT1	flotillin 1	Plasma Membrane	other
Q60634	FLOT2	flotillin 2	Plasma Membrane	other
O55126	GBAS	glioblastoma amplified sequence	Plasma Membrane	other

Uniprot ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
Q9Z2A9	GGT5	gamma-glutamyltransferase 5	Plasma Membrane	enzyme
P21278	GNA11	G protein subunit alpha 11	Plasma Membrane	enzyme
P27601	GNA13	G protein subunit alpha 13	Plasma Membrane	enzyme
P08752	GNAI2	G protein subunit alpha i2	Plasma Membrane	enzyme
P18872	GNAO1	G protein subunit alpha o1	Plasma Membrane	enzyme
P21279	GNAQ	G protein subunit alpha q	Plasma Membrane	enzyme
P63094	GNAS	GNAS complex locus	Plasma Membrane	enzyme
P62874	GNB1	G protein subunit beta 1	Plasma Membrane	enzyme
P62880	GNB2	G protein subunit beta 2	Plasma Membrane	enzyme
Q8BUV3	GPHN	gephyrin	Plasma Membrane	enzyme
E9Q7X6	HEG1	heart development protein with EGF like domains 1	Plasma Membrane	other
P01899	HLA-A	major histocompatibility complex, class I, A	Plasma Membrane	other
P14434	HLA-DQA1	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	Plasma Membrane	transmembrane receptor
P14483	HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	Plasma Membrane	other

Uniprot ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
P04230	HLA-DRB5	major histocompatibility complex, class II, DR beta 5	Plasma Membrane	transmembrane receptor
P13597	ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	Plasma Membrane	transmembrane receptor
Q9CQW9	IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3	Plasma Membrane	other
Q07113	IGF2R	insulin like growth factor 2 receptor	Plasma Membrane	transmembrane receptor
O55222	ILK	integrin linked kinase	Plasma Membrane	kinase
Q3V3R4	ITGA1	integrin subunit alpha 1	Plasma Membrane	other
P11688	ITGA5	integrin subunit alpha 5	Plasma Membrane	transmembrane receptor
Q61738	ITGA7	integrin subunit alpha 7	Plasma Membrane	other
B8JK39	ITGA9	integrin subunit alpha 9	Plasma Membrane	other
P05555	ITGAM	integrin subunit alpha M	Plasma Membrane	transmembrane receptor
P43406	ITGAV	integrin subunit alpha V	Plasma Membrane	transmembrane receptor

Uniprot ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
P09055	ITGB1	integrin subunit beta 1	Plasma Membrane	transmembrane receptor
P11835	ITGB2	integrin subunit beta 2	Plasma Membrane	transmembrane receptor
O70309	ITGB5	integrin subunit beta 5	Plasma Membrane	other
Q6WVG3	KCTD12	potassium channel tetramerization domain containing 12	Plasma Membrane	ion channel
Q6GV12	KDSR	3-ketodihydrosphingosine reductase	Plasma Membrane	enzyme
P11438	LAMP1	lysosomal associated membrane protein 1	Plasma Membrane	other
P17047	LAMP2	lysosomal associated membrane protein 2	Plasma Membrane	enzyme
Q9CQ22	LAMTOR1	late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 1	Plasma Membrane	other
O89112	LANCL1	LanC like 1	Plasma Membrane	other
Q07797	LGALS3BP	galectin 3 binding protein	Plasma Membrane	transmembrane receptor
Q99JW4	LIMS1	LIM zinc finger domain containing 1	Plasma Membrane	other
Q91ZX7	LRP1	LDL receptor related protein 1	Plasma Membrane	transmembrane receptor
P55302	LRPAP1	LDL receptor related protein associated protein 1	Plasma Membrane	other

Uniprot ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
Q80WG5	LRR8A	leucine rich repeat containing 8 family member A	Plasma Membrane	ion channel
Q8R502	LRR8C	leucine rich repeat containing 8 family member C	Plasma Membrane	ion channel
P26645	Marcks	myristoylated alanine rich protein kinase C substrate	Plasma Membrane	other
Q8CHK3	MBOAT7	membrane bound O-acyltransferase domain containing 7	Plasma Membrane	enzyme
Q6ZQI3	MLEC	malectin	Plasma Membrane	other
P70290	MPP1	membrane palmitoylated protein 1	Plasma Membrane	kinase
Q61830	MRC1	mannose receptor C-type 1	Plasma Membrane	transmembrane receptor
Q64449	MRC2	mannose receptor C type 2	Plasma Membrane	transmembrane receptor
P26041	MSN	moesin	Plasma Membrane	other
Q9CZR2	NAALAD2	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase 2	Plasma Membrane	peptidase
Q8BLF1	NCEH1	neutral cholesterol ester hydrolase 1	Plasma Membrane	enzyme
P28660	NCKAP1	NCK associated protein 1	Plasma Membrane	other
Q8K1X4	NCKAP1L	NCK associated protein 1 like	Plasma Membrane	other
P57716	NCSTN	nicastrin	Plasma Membrane	peptidase

Uniprot ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
Q6GQT9	NOMO1 (include s others)	NODAL modulator 1	Plasma Membrane	other
P97300	Nptn	neuroplastin	Plasma Membrane	other
P97333	NRP1	neuropilin 1	Plasma Membrane	transmembrane receptor
Q9Z1M0	P2RX7	purinergic receptor P2X 7	Plasma Membrane	ion channel
Q9Z0P4	PALM	paralemmin	Plasma Membrane	other
P26618	PDGFR A	platelet derived growth factor receptor alpha	Plasma Membrane	kinase
Q08481	PECAM 1	platelet and endothelial cell adhesion molecule 1	Plasma Membrane	other
O55022	PGRMC 1	progesterone receptor membrane component 1	Plasma Membrane	transmembrane receptor
O08852	PKD1	polycystin 1, transient receptor potential channel interacting	Plasma Membrane	ion channel
Q99JY8	PLPP3	phospholipid phosphatase 3	Plasma Membrane	phosphatase
Q9JIZ9	PLSCR3	phospholipid scramblase 3	Plasma Membrane	enzyme
B2RXS4	PLXNB2	plexin B2	Plasma Membrane	transmembrane receptor

Uniprot ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
Q8C8U0	PPFIBP1	PPFIA binding protein 1	Plasma Membrane	other
Q9WV91	PTGFRN	prostaglandin F2 receptor inhibitor	Plasma Membrane	other
P18052	PTPRA	protein tyrosine phosphatase, receptor type A	Plasma Membrane	phosphatase
P06800	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type C	Plasma Membrane	phosphatase
Q64455	PTPRJ	protein tyrosine phosphatase, receptor type J	Plasma Membrane	phosphatase
P55258	RAB8A	RAB8A, member RAS oncogene family	Plasma Membrane	enzyme
P63001	RAC1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)	Plasma Membrane	enzyme
P61226	RAP2B	RAP2B, member of RAS oncogene family	Plasma Membrane	enzyme
Q60790	RASA3	RAS p21 protein activator 3	Plasma Membrane	ion channel
Q6A0D4	RFTN1	raftlin, lipid raft linker 1	Plasma Membrane	other
O35114	SCARB2	scavenger receptor class B member 2	Plasma Membrane	other
P82350	SGCA	sarcoglycan alpha	Plasma Membrane	other
P82349	SGCB	sarcoglycan beta	Plasma Membrane	other
P82348	SGCG	sarcoglycan gamma	Plasma Membrane	other

Uniprot ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
Q62420	SH3GL2	SH3 domain containing GRB2 like 2, endophilin A1	Plasma Membrane	enzyme
Q62230	SIGLEC1	sialic acid binding Ig like lectin 1	Plasma Membrane	other
P97797	SIRPA	signal regulatory protein alpha	Plasma Membrane	phosphatase
Q99MR3	SLC12A9	solute carrier family 12 member 9	Plasma Membrane	transporter
Q9ESU7	SLC1A5	solute carrier family 1 member 5	Plasma Membrane	transporter
Q9JIM1	SLC29A1	solute carrier family 29 member 1 (Augustine blood group)	Plasma Membrane	transporter
Q99P65	SLC29A3	solute carrier family 29 member 3	Plasma Membrane	transporter
Q31125	SLC39A7	solute carrier family 39 member 7	Plasma Membrane	transporter
P10852	SLC3A2	solute carrier family 3 member 2	Plasma Membrane	transporter
O09044	SNAP23	synaptosome associated protein 23	Plasma Membrane	transporter
Q61235	SNTB2	syntrophin beta 2	Plasma Membrane	other
A3KGU5	SPTAN1	spectrin alpha, non-erythrocytic 1	Plasma Membrane	other
Q62261	SPTBN1	spectrin beta, non-erythrocytic 1	Plasma Membrane	other
G3X973	STAB1	stabilin 1	Plasma Membrane	transporter
P54116	STOM	stomatin	Plasma Membrane	other

Uniprot ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
Q99JB2	STOML2	stomatin like 2	Plasma Membrane	other
Q9Z1Z2	STRAP	serine/threonine kinase receptor associated protein	Plasma Membrane	other
P70452	STX4	syntaxin 4	Plasma Membrane	transporter
O70439	STX7	syntaxin 7	Plasma Membrane	transporter
O88983	STX8	syntaxin 8	Plasma Membrane	other
Q8K4L3	SVIL	supervillin	Plasma Membrane	other
P36423	TBXAS1	thromboxane A synthase 1	Plasma Membrane	enzyme
Q9JHF5	TCIRG1	T-cell immune regulator 1, ATPase H ⁺ transporting V0 subunit a3	Plasma Membrane	enzyme
P01831	THY1	Thy-1 cell surface antigen	Plasma Membrane	other
P39447	TJP1	tight junction protein 1	Plasma Membrane	other
P26039	TLN1	talin 1	Plasma Membrane	other
P58021	TM9SF2	transmembrane 9 superfamily member 2	Plasma Membrane	transporter
A0A087WQ50	TNS1	tensin 1	Plasma Membrane	other
Q8CGB6	TNS2	tensin 2	Plasma Membrane	other
P58771	Tpm1	tropomyosin 1, alpha	Plasma Membrane	other

Uniprot ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
Q9WTR1	TRPV2	transient receptor potential cation channel subfamily V member 2	Plasma Membrane	ion channel
P70398	USP9X	ubiquitin specific peptidase 9, X-linked	Plasma Membrane	peptidase
P63024	VAMP3	vesicle associated membrane protein 3	Plasma Membrane	other
Q9QY76	VAPB	VAMP associated protein B and C	Plasma Membrane	other
Q62465	VAT1	vesicle amine transport 1	Plasma Membrane	transporter
Q64727	VCL	vinculin	Plasma Membrane	enzyme
Q99KU0	VMP1	vacuole membrane protein 1	Plasma Membrane	other
Q8BH43	WASF2	WAS protein family member 2	Plasma Membrane	other
Q3UPF5	ZC3HAV1	zinc finger CCCH-type containing, antiviral 1	Plasma Membrane	other
Q62523	ZYX	zyxin	Plasma Membrane	other

Annexe 7 : Paramètres utilisés dans l'annexe 1 pour obtenir le secrétome prédit (en rouge sont signalés les paramètres modifiés pour obtenir le membranome).

Etape	Nom de l'outil	Paramètres appliqués
A	Get ORF or CDS :	Genetic code: standard
		Look for ORF or CDS : CDS (with start and stop codon)
		Selection criteria: All ORF/CDS from each sequence with the maximum length
		Minimum length for CDS (in AA): 70
		Strand to search: Search both forward and reverse strand.
B	SignalP v3.0	Organism : eukaryote
		Truncate sequence to : 70AA
C	Fasta to tabular	Divided in 2columns
		No title character to keep
		(C1 : Ensembl transcript ID – C2 : Sequence informations – C3 : sequence)
D	Filter	c14='Y' or c15='S' or c15='A'
E	Compare two datasets	Using column 1
		Against column 1
		To find: matching rows of first dataset
F	tabular to fasta	Title column 1
		Sequence column 3
G	wolfpsort	Organism: animal
H	TMHMM	
I	NLStradamus	Model: two state
		Algorithm: both (Viterbi & posterior with threshold)
		Threshold: 0, 65
J	PredictNLS	
K	select	That: matching
		The pattern: extr
L		Using column 1

	compare two datasets	Against column 1 To find: non matching rows of first dataset
M	Filter	With following conditions: $c4==1$ Number of header lines to skip: 0
N	concatenate datasets	
O	compare two datasets	Using column 1 Against column 1 To find: non matching rows of first dataset
P	Filter	With following conditions: $c5==0$ Number of header lines to skip: 0
Q	Compare two datasets	Using column 1 Against column 1 To find: matching rows of first dataset
R	Compare two datasets	Using column 1 Against column 1 To find: matching rows of first dataset

Annexe 8 : Paramètres utilisés pour obtenir les candidats secrétés dont l'expression a fortement varié entre les conditions normales et infarcies.

Etape	Outil	Paramètre	valeur
A Trim		Trim this column only	1
		Trim from the beginning to this position	1
		Remove everything from this position to the end	-5
Cut		Cut column	1
		Delimited by	TAB
B Join		Join	Dataset
		using	Column 1
		With	Dataset from biomart
		Keep lines of first input that do not join with second input	Yes
		Keep lines of the first input that are incomplete	Yes
	Fill empty columns	No	
C Join		Join	Dataset
		using	Column 1
		With	Dataset from Abundances
		Keep lines of first input that do not join with second input	Yes

		Keep lines of the first input that are incomplete	Yes
		Fill empty columns	No
D	Awk	Pour les FDG	<code>{gsub(",",".",\$0);print \$1,\$2,\$4,\$8,\$16,\$15=\$16/\$8}</code>
		Pour les DP	<code>{gsub(",",".",\$0);print \$1,\$2,\$4,\$7,\$14,\$15=\$14/\$7}</code>
		Pour les C-kit	<code>{gsub(",",".",\$0);print \$1,\$2,\$4,\$6,\$14,\$15=\$12/\$6}</code>
E	Awk	Surexpression MI	<code>\$6>1.5 {print \$0}</code>
F	Awk	Surexpression	<code>\$6<0,667 {print \$0}</code>
		Normal	

Bibliographie

- Acharya, A., Baek, S. T., Huang, G., Eskiocak, B., Goetsch, S., Sung, C. Y., ... Tallquist, M. D. (2012). The bHLH transcription factor Tcf21 is required for lineage-specific EMT of cardiac fibroblast progenitors. *Development (Cambridge, England)*, *139*(12), 2139–2149. <https://doi.org/10.1242/dev.079970>
- Ackers-Johnson, M., Li, P. Y., Holmes, A. P., O'Brien, S. M., Pavlovic, D., & Foo, R. S. (2016). A Simplified, Langendorff-Free Method for Concomitant Isolation of Viable Cardiac Myocytes and Nonmyocytes from the Adult Mouse Heart. *Circulation Research*, *119*(8), 909–920. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309202>
- Alghisi, G. C., Ponsonnet, L., & Rüegg, C. (2009). The integrin antagonist cilengitide activates $\alpha V\beta 3$, disrupts VE-cadherin localization at cell junctions and enhances permeability in endothelial cells. *PLoS ONE*, *4*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004449>
- Ali, S. R., Ranjbarvaziri, S., Talkhabi, M., Zhao, P., Subat, A., Hojjat, A., ... Ardehali, R. (2014). Developmental heterogeneity of cardiac fibroblasts does not predict pathological proliferation and activation. *Circulation Research*, *115*(7), 625–635. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.303794>
- Alimperti, S., You, H., George, T., Agarwal, S. K., & Andreadis, S. T. (2014). Cadherin-11 regulates both mesenchymal stem cell differentiation into smooth muscle cells and the development of contractile function in vivo. *Journal of Cell Science*, *127*(12), 2627–2638. <https://doi.org/10.1242/jcs.134833>
- Aluwihare, P., Mu, Z., Zhao, Z., Yu, D., Weinreb, P. H., Horan, G. S., ... Munger, J. S. (2009). Mice that lack activity of $\alpha 6$ - and $\alpha 8$ -integrins reproduce the abnormalities of $Tgfb1$ - and $Tgfb3$ -null mice. *Journal of Cell Science*, *122*(Pt 2), 227–232. <https://doi.org/10.1242/jcs.035246>
- Anversa, P., & Kajstura, J. (1998). Point / Counterpoint Ventricular Myocytes Are Not Terminally Differentiated in the Adult Mammalian Heart, 1–14. <https://doi.org/10.1161/01.RES.83.1.1>
- Anversa, P., Kajstura, J., & Leri, A. (2012). Cardiovascular Regeneration and Tissue Engineering. In *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine* (pp. 99–106). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0398-6.00011-1>
- Bader, B. L., Rayburn, H., Crowley, D., & Hynes, R. O. (1998). Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all α v integrins. *Cell*, *95*(4), 507–519. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81618-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81618-9)
- Banerjee, I., Fuseler, J. J. W., Price, R. L., Borg, T. K., Baudino, T. a, Jw, F., ... Ta, B. (2007). Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *American of Physiology*, *293*(3), 1883–1891. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00514.2007>

- Barallobre-Barreiro, J., Didangelos, A., Schoendube, F. A., Drozdov, I., Yin, X., Fernández-Caggiano, M., ... Mayr, M. (2012). Proteomics analysis of cardiac extracellular matrix remodeling in a porcine model of ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, *125*(6), 789–802. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.056952>
- Barallobre-Barreiro, J., Oklu, R., Lynch, M., Fava, M., Baig, F., Yin, X., ... Mayr, M. (2016). Extracellular matrix remodelling in response to venous hypertension: Proteomics of human varicose veins. *Cardiovascular Research*, *110*(3), 419–430. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw075>
- Barczyk, M., Carracedo, S., & Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell and Tissue Research*, *339*(1), 269–280. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, *136*(2), 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Bassat, E., Mutlak, Y. E., Genzelinakh, A., Shadrin, I. Y., Baruch Umansky, K., Yifa, O., ... Tzahor, E. (2017). The extracellular matrix protein agrin promotes heart regeneration in mice. *Nature*, *547*(7662), 179–184. <https://doi.org/10.1038/nature22978>
- Bearzi, C., Rota, M., Hosoda, T., Tillmanns, J., Nascimbene, A., De Angelis, A., ... Anversa, P. (2007). Human cardiac stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(35), 14068–14073. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706760104>
- Beksaç, M. (Ed.). (2014). *Bone Marrow and Stem Cell Transplantation* (Vol. 1109). New York, NY: Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9437-9>
- Beltrami, A. P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., ... Anversa, P. (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, *114*(6), 763–776. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00687-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00687-1)
- Beltrami, A. P., Urbanek, K., Kajstura, J., Yan, S. M., Finato, N., Bussani, R., ... Anversa, P. (2001). Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*, *344*(23), 1750–1757. <https://doi.org/10.1056/NEJM200106073442303>
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Von Heijne, G., & Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, *340*(4), 783–795. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.028>
- Berg, J. S., Lin, K. K., Sonnet, C., Boles, N. C., Weksberg, D. C., Nguyen, H., ... Goodell, M. A. (2011). Imprinted genes that regulate early mammalian growth are coexpressed in somatic stem cells. *PLoS ONE*, *6*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026410>
- Bergmann, O., Bhardwaj, R. D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabé-Heider, F., Walsh, S., ... Frisén, J. (2009). Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans. *Science*, *324*(5923), 98–102. <https://doi.org/10.1126/science.1164680>
- Besson, V., Kyrachenko, S., Janich, P., Benitah, S. A., Marazzi, G., & Sassoon, D. (2017). Expression Analysis of the Stem Cell Marker Pw1/Peg3 Reveals a CD34 Negative Progenitor Population in the Hair Follicle. *STEM CELLS*, *35*(4), 1015–1027.

<https://doi.org/10.1002/stem.2540>

- Besson, V., Smeriglio, P., Wegener, A., Relaix, F., Nait, B., & Sassoon, D. A. (2011). Identifies Multiple Adult Stem and Progenitor Cell Populations. *Pnas*, *3*, 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103873108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1103873108>
- Beyfuss, K., & Hood, D. A. (2018). A systematic review of p53 regulation of oxidative stress in skeletal muscle. *Redox Report*, *0002*, 1–18. <https://doi.org/10.1080/13510002.2017.1416773>
- Bleumink, G. S., Knetsch, A. M., Sturkenboom, M. C. J. M., Straus, S. M. J. M., Hofman, A., Deckers, J. W., ... Stricker, B. H. C. (2004). Quantifying the heart failure epidemic: Prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure - The Rotterdam Study. *European Heart Journal*, *25*(18), 1614–1619. <https://doi.org/10.1016/j.ehj.2004.06.038>
- Bolli, R., Chugh, A. R., D’Amario, D., Loughran, J. H., Stoddard, M. F., Ikram, S., ... Anversa, P. (2011). Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *The Lancet*, *378*(9806), 1847–1857. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61590-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61590-0)
- Bolli, R., Tang, X.-L., Sanganalmath, S. K., Rimoldi, O., Mosna, F., Abdel-Latif, A., ... Kajstura, J. (2013). Intracoronary Delivery of Autologous Cardiac Stem Cells Improves Cardiac Function in a Porcine Model of Chronic Ischemic Cardiomyopathy. *Circulation*, *128*(2), 122–131. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001075>
- Bondue, A., Tännler, S., Chiapparò, G., Chabab, S., Ramialison, M., Paulissen, C., ... Blanpain, C. (2011). Defining the earliest step of cardiovascular progenitor specification during embryonic stem cell differentiation. *Journal of Cell Biology*, *192*(5), 751–765. <https://doi.org/10.1083/jcb.201007063>
- Bonfanti, C., Rossi, G., Tedesco, F. S., Giannotta, M., Benedetti, S., Tonlorenzi, R., ... Messina, G. (2015). PW1/Peg3 expression regulates key properties that determine mesoangioblast stem cell competence. *Nature Communications*, *6*(May 2014). <https://doi.org/10.1038/ncomms7364>
- Breuss, J. M., Gallo, J., DeLisser, H. M., Klimanskaya, I. V., Folkesson, H. G., Pittet, J. F., ... Carpenter, W. (1995). Expression of the $\beta 6$ integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *Journal of Cell Science*, *108*, 2241–2251. <https://doi.org/10.1242/jcs.00145>
- Buraschi, S., Neill, T., Goyal, A., Poluzzi, C., Smythies, J., Owens, R. T., ... Iozzo, R. V. (2013). Decorin causes autophagy in endothelial cells via Peg3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(28), E2582–E2591. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305732110>
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
- Carter, A. (2010). Integrins as target: first phase III trial launches, but questions remain.

Journal of the National Cancer Institute, 102(10), 675–677.
<https://doi.org/10.1093/jnci/djq186>

- Castro-Malaspina, H., Ebell, W., & Wang, S. (1984). Human bone marrow fibroblast colony-forming units (CFU-F). *Progress in Clinical and Biological Research*, 154, 209–236. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6382294>
- Champagne, F. A., Curley, J. P., Swaney, W. T., Hasen, N. S., & Keverne, E. B. (2009). Paternal influence on female behavior: the role of Peg3 in exploration, olfaction, and neuroendocrine regulation of maternal behavior of female mice. *Behavioral Neuroscience*, 123(3), 469–480. <https://doi.org/10.1037/a0015060>
- Chang, Y., Lau, W. L., Jo, H., Tsujino, K., Gewin, L., Reed, N. I., ... Sheppard, D. (2017). Pharmacologic Blockade of $\alpha v \beta 1$ Integrin Ameliorates Renal Failure and Fibrosis *In Vivo*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(7), 1998–2005. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015050585>
- Chong, J. J. H., Chandrakanthan, V., Xaymardan, M., Asli, N. S., Li, J., Ahmed, I., ... Harvey, R. P. (2011). Adult Cardiac-Resident MSC-like Stem Cells with a Proepicardial Origin. *Cell Stem Cell*, 9(6), 527–540. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.10.002>
- Choo, J. H., Kim, J. Do, & Kim, J. (2008). Imprinting of an evolutionarily conserved antisense transcript gene APeg3. *Gene*, 409(1–2), 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.10.036>
- Cirkel, G. A., Kerklaan, B. M., Vanhoutte, F., Van der Aa, A., Lorenzon, G., Namour, F., ... Lolkema, M. P. (2016). A dose escalating phase I study of GLPG0187, a broad spectrum integrin receptor antagonist, in adult patients with progressive high-grade glioma and other advanced solid malignancies. *Investigational New Drugs*, 34(2), 184–192. <https://doi.org/10.1007/s10637-015-0320-9>
- Cokol, M., Nair, R., & Rost, B. (2000). Finding nuclear localization signals. *EMBO Reports*, 1(5), 411–415. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvd092>
- Cox, D., Brennan, M., & Moran, N. (2010). Integrins as therapeutic targets: Lessons and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(10), 804–820. <https://doi.org/10.1038/nrd3266>
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T. S., ... Péault, B. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, 3(3), 301–313. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.003>
- Darby, I. A., & Hewitson, T. D. (2007). Fibroblast Differentiation in Wound Healing and Fibrosis. *International Review of Cytology*, 257, 143–179. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(07\)57004-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(07)57004-X)
- Deb, A., Wang, S., Skelding, K. A., Miller, D., Simper, D., & Caplice, N. M. (2003). Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation*, 107(9), 1247–1249. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12628942>
- Dechantsreiter, M. A., Planker, E., Mathä, B., Lohof, E., Hölzemann, G., Jonczyk, A., ... Kessler, H. (1999). N-methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective

- $\alpha(v)\beta 3$ integrin antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, 42(16), 3033–3040. <https://doi.org/10.1021/jm970832g>
- Denizot, A. L., Besson, V., Corraera, R. M., Mazzola, A., Lopes, I., Courbard, J. R., ... Sassoon, D. A. (2016). A Novel Mutant Allele of Pw1/Peg3 Does Not Affect Maternal Behavior or Nursing Behavior. *PLoS Genetics*, 12(5), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006053>
- Deutsch, M.-A., Sturzu, A., & Wu, S. M. (2013). At a Crossroad: Cell Therapy for Cardiac Repair. *Circ Res*, 112(6), 884–890. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.275974>
- Dey, D., Han, L., Bauer, M., Sanada, F., Oikonomopoulos, A., Hosoda, T., ... Wu, J. C. (2013). Dissecting the Molecular Relationship Among Various Cardiogenic Progenitor Cells. *Circulation Research*, 112(9), 1253–1262. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.300779>
- Dierick, F., Héry, T., Hoareau-Coudert, B., Mougenot, N., Monceau, V., Claude, C., ... Nadaud, S. (2016). Resident PW1 + Progenitor Cells Participate in Vascular Remodeling During Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation Research*, 118(5), 822–833. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307035>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Donnenberg, V. S., Zhang, J. J., Moravcikova, E., Meyer, E. M., Lu, H., Carson, C. T., & Donnenberg, A. D. (2018). Antibody-based cell-surface proteome profiling of metastatic breast cancer primary explants and cell lines. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23300>
- Ebihara, Y., Masuya, M., Larue, A. C., Fleming, P. A., Visconti, R. P., Minamiguchi, H., ... Ogawa, M. (2006). Hematopoietic origins of fibroblasts: II. In vitro studies of fibroblasts, CFU-F, and fibrocytes. *Experimental Hematology*, 34(2), 219–229. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2005.10.008>
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature Protocols*, 2(4), 953–971. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.131>
- Farahani, R. M., & Xaymardan, M. (2015). Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha as a Marker of Mesenchymal Stem Cells in Development and Stem Cell Biology. *Stem Cells International*, 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/362753>
- Felding-Habermann, B., & Cheresch, D. A. (1993). Vitronectin and its receptors. *Current Opinion in Cell Biology*, 5(5), 864–868.
- Framingham, T., Study, H., Larson, M. G., Kannel, W. B., Agostino, R. B. D., Levy, D., & Page, P. (2002). Residual Lifetime Risk for Developing Hypertension in Middle-Aged

- Women and Men. *Jama*, 287(8), 1003–1010.
<https://doi.org/10.1001/jama.287.8.1003>
- Franke, W. W., Schmid, E., Osborn, M., & Weber, K. (1979). Intermediate-sized filaments of human endothelial cells. *The Journal of Cell Biology*, 81(3), 570–580. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/379021>
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and Tissue Kinetics*, 3(4), 393–403.
- Friedenstein, A. J., Deriglasova, U. F., Kulagina, N. N., Panasuk, A. F., Rudakowa, S. F., Luriá, E. A., & Ruadkow, I. A. (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental Hematology*, 2(2), 83–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4455512>
- Friedenstein, A. Y., & Lalykina, K. S. (1970). Lymphoid cell populations are competent systems for induced osteogenesis. *Calcified Tissue Research*, Suppl:105-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5464071>
- Garbern, J. C., & Lee, R. T. (2013). Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.05.008>
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., & Yamada, K. M. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(11), 793–805. <https://doi.org/10.1038/35099066>
- Gnecchi, M., He, H., Noiseux, N., Liang, O. D., Zhang, L., Morello, F., ... Dzau, V. J. (2006). Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(6), 661–669. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5211com>
- Gomes-Alves, P., Serra, M., Brito, C., R-Borlado, L., López, J. A., Vázquez, J., ... Alves, P. M. (2015). Exploring analytical proteomics platforms toward the definition of human cardiac stem cells receptome. *Proteomics*, 15(7), 1332–1337. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400318>
- Goodman, S. L., & Picard, M. (2012). Integrins as therapeutic targets. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(7), 405–412. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.04.002>
- Gourdie, R. G., Dimmeler, S., & Kohl, P. (2016). Novel therapeutic strategies targeting fibroblasts and fibrosis in heart disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(9), 620–638. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.89>
- Grassian, A. R., Schafer, Z. T., & Brugge, J. S. (2011). ErbB2 stabilizes epidermal growth factor receptor (EGFR) expression via Erk and Sprouty2 in extracellular matrix-detached cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(1), 79–90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.169821>
- Groult, H., Ruiz-Cabello, J., Pellico, J., Lechuga-Vieco, A. V., Bhavesh, R., Zamai, M., ...

- Herranz, F. (2015). Parallel multifunctionalization of nanoparticles: a one-step modular approach for in vivo imaging. *Bioconjugate Chemistry*, 26(1), 153–160. <https://doi.org/10.1021/bc500536y>
- Gvozdenovic, A., Boro, A., Meier, D., Bode-Lesniewska, B., Born, W., Muff, R., & Fuchs, B. (2016). Targeting $\alpha\beta3$ and $\alpha\beta5$ integrins inhibits pulmonary metastasis in an intratibial xenograft osteosarcoma mouse model. *Oncotarget*, 7(34), 55141–55154. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10461>
- Haase, C. G., & Hohlfeld, R. (1999). [Bone marrow and stem cell transplantation in multiple sclerosis?]. *Der Nervenarzt*, 70(2), 178–181. <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0308-4>
- Harker, L. A. (1998). Therapeutic inhibition of platelet function in stroke. *Cerebrovascular Diseases (Basel, Switzerland)*, 8 Suppl 5, 8–18. <https://doi.org/10.1159/000047513>
- Hatley, R. J. D., Macdonald, S. J. F., Slack, R. J., Le, J., Ludbrook, S. B., & Lukey, P. T. (2018). An α -RGD Integrin Inhibitor Toolbox: Drug Discovery Insight, Challenges and Opportunities. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 57(13), 3298–3321. <https://doi.org/10.1002/anie.201707948>
- Heldin, C. H., & Westermark, B. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological Reviews*, 79(4), 1283–1316. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.57.030195.001501>
- Henderson, N. C., Arnold, T. D., Katamura, Y., Giacomini, M. M., Rodriguez, J. D., McCarty, J. H., ... Sheppard, D. (2013). Targeting of α v integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. *Nature Medicine*, 19(12), 1617–1624. <https://doi.org/10.1038/nm.3282>
- Hierlihy, A. M., Seale, P., Lobe, C. G., Rudnicki, M. A., & Megeney, L. A. (2002). The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Letters*, 530(1–3), 239–243. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03477-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03477-4)
- Hood, J. D., Frausto, R., Kiosses, W. B., Schwartz, M. A., & Cheresch, D. A. (2003). Differential α v integrin-mediated Ras-ERK signaling during two pathways of angiogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 162(5), 933–943. <https://doi.org/10.1083/jcb.200304105>
- Horioka, K., Ohuchida, K., Sada, M., Zheng, B., Moriyama, T., Fujita, H., ... Nakamura, M. (2016). Suppression of CD51 in pancreatic stellate cells inhibits tumor growth by reducing stroma and altering tumor-stromal interaction in pancreatic cancer. *International Journal of Oncology*, 48(4), 1499–1508. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3374>
- Hörmann, K., Stukalov, A., Müller, A. C., Heinz, L. X., Superti-Furga, G., Colinge, J., & Bennett, K. L. (2016). A Surface Biotinylation Strategy for Reproducible Plasma Membrane Protein Purification and Tracking of Genetic and Drug-Induced Alterations. *Journal of Proteome Research*, 15(2), 647–658. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b01066>
- Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., & Nakai, K.

- (2007). WoLF PSORT: Protein localization predictor. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL.2), 585–587. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm259>
- Hsieh, P. C. H., Davis, M. E., Lisowski, L. K., & Lee, R. T. (2006). Endothelial-cardiomyocyte interactions in cardiac development and repair. *Annual Review of Physiology*, 68(5), 51–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.124629>
- Humphries, M. J. (2000). Integrin Structure. *Biochemical Society Transactions*, 28(4), 311–340. <https://doi.org/10.1042/bst0280311>
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6), 673–687. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00971-6)
- Iancu, C. B., Iancu, D., Rențea, I., Hostiuc, S., Dermengiu, D., & Rusu, M. C. (2015). Molecular signatures of cardiac stem cells. *Rom J Morphol Embryol*, 56(4), 1255–1262.
- Jackson, K. A., Majka, S. M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C. J., Majesky, M. W., ... Goodell, M. A. (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(11), 1395–1402. <https://doi.org/10.1172/JCI12150>
- Jacob, F., Novo, C. P., Bachert, C., & Van Crombruggen, K. (2013). Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic Signalling*, 9(3), 285–306. <https://doi.org/10.1007/s11302-013-9357-4>
- Jacobson, L. O., Simmons, E. L., Marks, E. K., & Eldredge, J. H. (1951). Recovery from Radiation Injury. *Science*, 113(2940), 510–511. <https://doi.org/10.1126/science.113.2940.510>
- Johnson, M. D., Wu, X., Aithmitti, N., & Morrison, R. S. (2002). Peg3/Pw1 is a mediator between p53 and Bax in DNA damage-induced neuronal death. *Journal of Biological Chemistry*, 277(25), 23000–23007. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201907200>
- Jurisic, G., Iolyeva, M., Proulx, S. T., Halin, C., & Detmar, M. (2010). Thymus cell antigen 1 (Thy1, CD90) is expressed by lymphatic vessels and mediates cell adhesion to lymphatic endothelium. *Experimental Cell Research*, 316(17), 2982–2992. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.06.013>
- Kaneko-Ishino, T., Kuroiwa, Y., Miyoshi, N., Kohda, T., Suzuki, R., Yokoyama, M., ... Surani, M. A. (1995). Peg1/Mest imprinted gene on chromosome 6 identified by cDNA subtraction hybridization. *Nature Genetics*, 11(1), 52–59. <https://doi.org/10.1038/ng0995-52>
- Kania, G., Blyszczuk, P., Stein, S., Valaperti, A., Germano, D., Dirnhofer, S., ... Eriksson, U. (2009). Heart-infiltrating prominin-1+/CD133+ progenitor cells represent the cellular source of transforming growth factor beta-mediated cardiac fibrosis in experimental autoimmune myocarditis. *Circulation Research*, 105(5), 462–470. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.196287>
- Kapp, T. G., Rechenmacher, F., Neubauer, S., Maltsev, O. V., Cavalcanti-Adam, E. A., Zarka, R., ... Kessler, H. (2017). A comprehensive evaluation of the activity and selectivity

- profile of ligands for RGD-binding integrins. *Scientific Reports*, 7(January), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep39805>
- Keith, M. C. L., & Bolli, R. (2015). “string theory” of c-kitpos cardiac cells: A new paradigm regarding the nature of these cells that may reconcile apparently discrepant results. *Circulation Research*, 116(7), 1216–1230. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305557>
- Kikuchi, K., & Poss, K. D. (2012). Cardiac Regenerative Capacity and Mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28(1), 719–741. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155739>
- Kim, H., Cho, H.-J., Kim, S.-W., Liu, B., Choi, Y. J., Lee, J., ... Yoon, Y. -s. (2010). 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. *Circulation Research*, 107(5), 602–614. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.218396>
- Kim, J., Ashworth, L., Branscomb, E., & Stubbs, L. (1997). The human homolog of a mouse-imprinted gene, Peg3, maps to a zinc finger gene-rich region of human chromosome 19q13.4. *Genome Research*, 7(5), 532–540. <https://doi.org/10.1101/gr.7.5.532>
- Kim, J., Bergmann, A., Lucas, S., Stone, R., & Stubbs, L. (2004). Lineage-specific imprinting and evolution of the zinc-finger gene ZIM2. *Genomics*, 84(1), 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.02.007>
- Kim, J., Bergmann, A., & Stubbs, L. (2000). Exon sharing of a novel human zinc-finger gene, ZIM2, and paternally expressed gene 3 (PEG3). *Genomics*, 64(1), 114–118. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.6112>
- Kim, J., Bergmann, A., Wehri, E., Lu, X., & Stubbs, L. (2001). Imprinting and evolution of two Kruppel-type zinc-finger genes, ZIM3 and ZNF264, located in the PEG3/USP29 imprinted domain. *Genomics*, 77(1–2), 91–98. <https://doi.org/10.1006/geno.2001.6621>
- Kim, J., Gordon, L., Dehal, P., Badri, H., Christensen, M., Groza, M., ... Stubbs, L. (2001). Homology-driven assembly of a sequence-ready mouse BAC contig map spanning regions related to the 46-Mb gene-rich euchromatic segments of human chromosome 19. *Genomics*, 74(2), 129–141. <https://doi.org/10.1006/geno.2001.6521>
- Kim, J., Lu, X., & Stubbs, L. (1999). Zim1, a maternally expressed mouse Kruppel-type zinc-finger gene located in proximal chromosome 7. *Human Molecular Genetics*, 8(5), 847–854. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.5.847>
- Kim, J., Noskov, V. N., Lu, X., Bergmann, A., Ren, X., Warth, T., ... Stubbs, L. (2000). Discovery of a novel, paternally expressed ubiquitin-specific processing protease gene through comparative analysis of an imprinted region of mouse chromosome 7 and human chromosome 19q13.4. *Genome Research*, 10(8), 1138–1147. <https://doi.org/10.1101/gr.10.8.1138>
- Kong, P., Christia, P., Saxena, A., Su, Y., & Frangogiannis, N. G. (2013). Lack of specificity of

- fibroblast-specific protein 1 in cardiac remodeling and fibrosis. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 305(9), H1363-72. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00395.2013>
- Korf-Klingebiel, M., Reboll, M. R., Klede, S., Brod, T., Pich, A., Polten, F., ... Wollert, K. C. (2015). Myeloid-derived growth factor (C19orf10) mediates cardiac repair following myocardial infarction. *Nature Medicine*, 21(2), 140–149. <https://doi.org/10.1038/nm.3778>
- Kramann, R., Schneider, R. K., Dirocco, D. P., Machado, F., Fleig, S., Bondzie, P. A., ... Humphreys, B. D. (2015). Perivascular Gli1+ progenitors are key contributors to injury-induced organ fibrosis. *Cell Stem Cell*, 16(1), 51–66. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.11.004>
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305(3), 567–580. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>
- Kuroiwa, Y., Kaneko-Ishino, T., Kagitani, F., Kohda, T., Li, L. L., Tada, M., ... Surani, M. A. (1996). Peg3 imprinted gene on proximal chromosome 7 encodes for a zinc finger protein. *Nature Genetics*, 12(2), 186–190. <https://doi.org/10.1038/ng0296-186>
- Laflamme, M. A., & Murry, C. E. (2011). Heart regeneration. *Nature*, 473(7347), 326–335. <https://doi.org/10.1038/nature10147>
- LaFlamme, S. E., Nieves, B., Colello, D., & Reverte, C. G. (2008). Integrins as regulators of the mitotic machinery. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(5), 576–582. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.06.006>
- Lafoya, B., Munroe, J. A., Miyamoto, A., Detweiler, M. A., Crow, J. J., Gazdik, T., & Albig, A. R. (2018). Beyond the matrix: The many non-ECM ligands for integrins. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 1–33. <https://doi.org/10.3390/ijms19020449>
- Laitinen, I., Notni, J., Pohle, K., Rudelius, M., Farrell, E., Nekolla, S. G., ... Schwaiger, M. (2013). Comparison of cyclic RGD peptides for alphavbeta3 integrin detection in a rat model of myocardial infarction. *EJNMMI Res*, 3(1), 38. <https://doi.org/10.1186/2191-219X-3-38>
- Lajiness, J. D., & Conway, S. J. (2014). Origin, development, and differentiation of cardiac fibroblasts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 70, 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.11.003>
- Lane, E. B., Hogan, B. L., Kurkinen, M., & Garrels, J. I. (n.d.). Co-expression of vimentin and cytokeratins in parietal endoderm cells of early mouse embryo. *Nature*, 303(5919), 701–704. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6190091>
- Latour, S., Tanaka, H., Demeure, C., Mateo, V., Rubio, M., Brown, E. J., ... Sarfati, M. (2001). Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein-alpha: down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(5), 2547–2554.

- Laugwitz, K.-L., Moretti, A., Lam, J., Gruber, P., Chen, Y., Woodard, S., ... Chien, K. R. (2005). Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*, *433*(7026), 647–653. <https://doi.org/10.1038/nature03215>
- Lee, S., Ye, A., & Kim, J. (2015). DNA-binding motif of the imprinted transcription factor PEG3. *PLoS ONE*, *10*(12), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145531>
- Legate, K. R., Wickström, S. a, Fässler, R., Fa, R., & Wickstro, S. a. (2009). Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling, 397–418. <https://doi.org/10.1101/gad.1758709>
- Li, A. H., Liu, P. P., Villarreal, F. J., & Garcia, R. A. (2014). Dynamic changes in myocardial matrix and relevance to disease: Translational perspectives. *Circulation Research*, *114*(5), 916–927. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302819>
- Li, L., Keverne, E. B., Aparicio, S. A., Ishino, F., Barton, S. C., & Surani, M. A. (1999). Regulation of maternal behavior and offspring growth by paternally expressed Peg3. *Science (New York, N.Y.)*, *284*(5412), 330–333. <https://doi.org/10.1126/science.284.5412.330>
- Lin, Z., & Pu, W. T. (2014). Strategies for cardiac regeneration and repair. *Science Translational Medicine*, *6*(239), 1–23. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006681>
- Lincoln, J., Alfieri, C. M., & Yutzey, K. E. (2004). Development of heart valve leaflets and supporting apparatus in chicken and mouse embryos. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *230*(2), 239–250. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20051>
- Lörchner, H., Pöling, J., Gajawada, P., Hou, Y., Polyakova, V., Kostin, S., ... Braun, T. (2015). Myocardial healing requires Reg3β-dependent accumulation of macrophages in the ischemic heart. *Nature Medicine*, *21*(4), 353–362. <https://doi.org/10.1038/nm.3816>
- Lucifero, D., Mann, M. R. W., Bartolomei, M. S., & Trasler, J. M. (2004). Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Human Molecular Genetics*, *13*(8), 839–849. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh104>
- MacDonald, T. J., Stewart, C. F., Kocak, M., Goldman, S., Ellenbogen, R. G., Phillips, P., ... Kun, L. E. (2008). Phase I clinical trial of cilengitide in children with refractory brain tumors: Pediatric Brain Tumor Consortium Study PBTC-012. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *26*(6), 919–924. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.1812>
- MacLachlan, T. K., & Giordano, A. (1998). TRAF2 expression in differentiated muscle. *Journal of Cellular Biochemistry*, *71*(4), 461–466. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4644\(19981215\)71:4<461::AID-JCB1>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(19981215)71:4<461::AID-JCB1>3.0.CO;2-0)
- Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J., ... Ogawa, S. (1999). Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *The Journal of Clinical Investigation*, *103*(5), 697–705. <https://doi.org/10.1172/JCI5298>
- Maleki, M., Ghanbarvand, F., Behvarz, M. R., Ejtemaei, M., & Ghadirkhomi, E. (2014). Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells.

International Journal of Stem Cells, 7(2), 118–126.
<https://doi.org/10.15283/ijsc.2014.7.2.118>

Margadant, C., Charafeddine, R. A., & Sonnenberg, A. (2010). Unique and redundant functions of integrins in the epidermis. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(11), 4133–4152.
<https://doi.org/10.1096/fj.09-151449>

Margadant, C., & Sonnenberg, A. (2010). Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Reports*, 11(2), 97–105.
<https://doi.org/10.1038/embor.2009.276>

Mas-Moruno, C., Rechenmacher, F., & Kessler, H. (2010). Cilengitide: The First Anti-Angiogenic Small Molecule Drug Candidate. Design, Synthesis and Clinical Evaluation. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 10(10), 753–768.
<https://doi.org/10.2174/187152010794728639>

Matsuura, K., Nagai, T., Nishigaki, N., Oyama, T., Nishi, J., Wada, H., ... Komuro, I. (2004). Adult Cardiac Sca-1-positive Cells Differentiate into Beating Cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(12), 11384–11391.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M310822200>

McCulloch, E. A., & Till, J. E. (1960). The Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells, Determined by Quantitative Marrow Transplantation into Irradiated Mice. *Radiation Research*, 13(1), 115. <https://doi.org/10.2307/3570877>

McMurray, J. J. V., Adamopoulos, S., Anker, S. D., Auricchio, A., Bohm, M., Dickstein, K., ... Ponikowski, P. (2012). ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart. *European Heart Journal*, 33(14), 1787–1847.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs104>

Mikawa, T., & Gourdie, R. G. (1996). Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Developmental Biology*, 174(2), 221–232.
<https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0068>

Mitchell, K. J., Pannérec, A., Cadot, B., Parlakian, A., Besson, V., Gomes, E. R., ... Sassoon, D. A. (2010). Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nature Cell Biology*, 12(3), 257–266.
<https://doi.org/10.1038/ncb2025>

Mitchell, K. O., Ricci, M. S., Miyashita, T., Dicker, D. T., Jin, Z., Reed, J. C., & El-Deiry, W. S. (2000). Bax is a transcriptional target and mediator of c-Myc-induced apoptosis. *Cancer Research*, 60(22), 6318–6325.

Möller, S., Croning, M. D. R., & Apweiler, R. (2001). Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics*, 17(7), 646–653.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.7.646>

Moore-Morris, T., Guimarães-Camboa, N., Banerjee, I., Zambon, A. C., Kisseleva, T.,

- Velayoudon, A., ... Evans, S. M. (2014). Resident fibroblast lineages mediate pressure overload-induced cardiac fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, *124*(7), 2921–2934. <https://doi.org/10.1172/JCI74783>
- Morabito, C. J., Dettman, R. W., Kattan, J., Collier, J. M., & Bristow, J. (2001). Positive and negative regulation of epicardial-mesenchymal transformation during avian heart development. *Developmental Biology*, *234*(1), 204–215. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0254>
- Morales, M. O., Price, R. L., & Goldsmith, E. C. (2005). Expression of Discoidin Domain Receptor 2 (DDR2) in the developing heart. *Microscopy and Microanalysis: The Official Journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*, *11*(3), 260–267. <https://doi.org/10.1017/S1431927605050518>
- Moreno-Layseca, P., & Streuli, C. H. (2014). Signalling pathways linking integrins with cell cycle progression. *Matrix Biology*, *34*, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.10.011>
- Mørk, C., van Deurs, B., & Petersen, O. W. (1990). Regulation of vimentin expression in cultured human mammary epithelial cells. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, *43*(2), 146–156. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2373288>
- Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., Cushman, M., ... Turner, M. B. (2016). Executive summary: Heart disease and stroke statistics-2016 update: A Report from the American Heart Association. *Circulation*, *133*(4), 447–454. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000366>
- Multiple sclerosis woes. (2005). *Nature Neuroscience*, *8*(7), 837–837. <https://doi.org/10.1038/nn0705-837>
- Munger, J. S., Harpel, J. G., Giancotti, F. G., & Rifkin, D. B. (1998). Interactions between growth factors and integrins: latent forms of transforming growth factor-beta are ligands for the integrin alpha v beta 1. *Molecular Biology of the Cell*, *9*(9), 2627–2638. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.9.2627>
- Munger, J. S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M. J., Dalton, S. L., Wu, J., ... Sheppard, D. (1999). The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell*, *96*(3), 319–328.
- Murray, I. R., Gonzalez, Z. N., Baily, J., Dobie, R., Wallace, R. J., Mackinnon, A. C., ... Henderson, N. C. (2017). Av Integrins on Mesenchymal Cells Regulate Skeletal and Cardiac Muscle Fibrosis. *Nature Communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01097-z>
- Nag, A. C. (1980). Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios*, *28*(109), 41–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7428441>
- Neill, T., Schaefer, L., & Iozzo, R. V. (2012). Decorin: A guardian from the matrix. *American Journal of Pathology*, *181*(2), 380–387.

<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.04.029>

- Nguyen Ba, A. N., Pogoutse, A., Provart, N., & Moses, A. M. (2009). NLStradamus: A simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics*, *10*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-202>
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., & von Heijne, G. (1997). A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *International Journal of Neural Systems*, *8*(5–6), 581–599. <https://doi.org/10.1142/S0129065797000537>
- Noiri, E., Gailit, J., Sheth, D., Magazine, H., Gurrath, M., Muller, G., ... Goligorsky, M. S. (1994). Cyclic RGD peptides ameliorate ischemic acute renal failure in rats. *Kidney International*, *46*(4), 1050–1058. <https://doi.org/10.1038/ki.1994.366>
- Oeckinghaus, A., & Ghosh, S. (2009). The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *1*(4), a000034. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000034>
- Ogawara, Y., Kishishita, S., Obata, T., Isazawa, Y., Suzuki, T., Tanaka, K., ... Gotoh, Y. (2002). Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(24), 21843–21850. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109745200>
- Oh, H., Bradfute, S. B., Gallardo, T. D., Nakamura, T., Gaussin, V., Mishina, Y., ... Schneider, M. D. (2003). Cardiac progenitor cells from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(21), 12313–12318. <https://doi.org/10.1073/pnas.2132126100>
- Olivey, H. E., Mundell, N. A., Austin, A. F., & Barnett, J. V. (2006). Transforming growth factor-beta stimulates epithelial-mesenchymal transformation in the proepicardium. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *235*(1), 50–59. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20593>
- Paine, R., & Ward, P. A. (1999). Cell adhesion molecules and pulmonary fibrosis. *The American Journal of Medicine*, *107*(3), 268–279. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10492321>
- Pannerec, A., Formicola, L., Besson, V., Marazzi, G., & Sassoon, D. A. (2013). Defining skeletal muscle resident progenitors and their cell fate potentials. *Development*, *140*(14), 2879–2891. <https://doi.org/10.1242/dev.089326>
- Pinho, S., Lacombe, J., Hanoun, M., Mizoguchi, T., Bruns, I., Kunisaki, Y., & Frenette, P. S. (2013). PDGFR α and CD51 mark human Nestin⁺ sphere-forming mesenchymal stem cells capable of hematopoietic progenitor cell expansion. *The Journal of Experimental Medicine*, *210*(7), 1351–1367. <https://doi.org/10.1084/jem.20122252>
- Pinto, A. R., Ilinykh, A., Ivey, M. J., Kuwabara, J. T., D'Antoni, M. L., Debuque, R., ... Tallquist, M. D. (2016). Revisiting Cardiac Cellular Composition Novelty and Significance. *Circulation Research*, *118*(3), 400–409. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307778>
- Pionneau, C., Canelle, L., Bousquet, J., Hardouin, J., Bigeard, J., Caron, M., & Joubert-

- Caron, R. (2005). Proteomic analysis of membrane-associated proteins from the breast cancer cell line MCF7. *Cancer Genomics and Proteomics*, 2(4), 199–208.
- Plesner, L. (1995). Ecto-ATPases: identities and functions. *International Review of Cytology*, 158, 141–214. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62487-0](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62487-0)
- Porter, K. E., & Turner, N. A. (2009). Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. *Pharmacology and Therapeutics*, 123(2), 255–278. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.05.002>
- Pozzobon, M., Bollini, S., Iop, L., De Gaspari, P., Chiavegato, A., Rossi, C. A., ... De Coppi, P. (2010). Human bone marrow-derived CD133(+) cells delivered to a collagen patch on cryoinjured rat heart promote angiogenesis and arteriogenesis. *Cell Transplantation*, 19(10), 1247–1260. <https://doi.org/10.3727/096368910X505864>
- Prabhu, S. D., & Frangogiannis, N. G. (2016). The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction. *Circulation Research*, 119(1), 91–112. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303577>
- Quaini, F., Urbanek, K., Beltrami, A. P., Finato, N., Beltrami, C. A., Nadal-Ginard, B., ... Anversa, P. (2002). Chimerism of the transplanted heart. *The New England Journal of Medicine*, 346(1), 5–15. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012081>
- Raff, M. C. (1971). Surface antigenic markers for distinguishing T and B lymphocytes in mice. *Transplantation Reviews*, 6, 52–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4108877>
- Raica, M., & Cimpian, A. M. (2010). Platelet-derived growth factor (PDGF)/PDGF receptors (PDGFR) axis as target for antitumor and antiangiogenic therapy. *Pharmaceuticals*, 3(3), 572–599. <https://doi.org/10.3390/ph3030572>
- Rapisarda, V., Borghesan, M., Miguela, V., Encheva, V., Snijders, A. P., Lujambio, A., ... O’Loghlen, A. (2017). Integrin Beta 3 Regulates Cellular Senescence by Activating the TGF- β Pathway. *Cell Reports*, 18(10), 2480–2493. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.012>
- Reardon, D. A., Neyns, B., Weller, M., Tonn, J. C., Nabors, L. B., & Stupp, R. (2011). *Cilengitide: an RGD pentapeptide $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ integrin inhibitor in development for glioblastoma and other malignancies*. *Future Oncology* (Vol. 7). <https://doi.org/10.2217/fon.11.8>
- Reed, N. I., Jo, H., Chen, C., Tsujino, K., Arnold, T. D., DeGrado, W. F., & Sheppard, D. (2015). The $\alpha v \beta 1$ integrin plays a critical in vivo role in tissue fibrosis. *Science Translational Medicine*, 7(288), 288ra79–288ra79. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa5094>
- Relaix, F., Wei, X. -j., Li, W., Pan, J., Lin, Y., Bowtell, D. D., ... Wu, X. (2000). Pw1/Peg3 is a potential cell death mediator and cooperates with Siah1a in p53-mediated apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(5), 2105–2110. <https://doi.org/10.1073/pnas.040378897>
- Relaix, F., Wei, X., Wu, X., & Sassoon, D. a. (1998). Peg3/Pw1 is an imprinted gene involved in the TNF-NFkappaB signal transduction pathway. *Nature Genetics*, 18, 287–291.

<https://doi.org/10.1038/ng0398-287>

- Relaix, F., Weng, X., Marazzi, G., Yang, E., Copeland, N., Jenkins, N., ... Sassoon, D. (1996). Pw1, a Novel Zinc Finger Gene Implicated in the Myogenic and Neuronal Lineages. *Developmental Biology*, 177(2), 383–396. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0172>
- Santini, M. P., Forte, E., Harvey, R. P., & Kovacic, J. C. (2016). Developmental origin and lineage plasticity of endogenous cardiac stem cells. *Development*, 143(8), 1242–1258. <https://doi.org/10.1242/dev.111591>
- Sappino, A. P., Schürch, W., & Gabbiani, G. (1990). Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 63(2), 144–161. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2116562>
- Scaringi, C., Minniti, G., Caporello, P., & Enrici, R. M. (2012). Integrin inhibitor cilengitide for the treatment of glioblastoma: a brief overview of current clinical results. *Anticancer Res*, 32(10), 4213–4223. <https://doi.org/32/10/4213> [pii]
- Schlondorff, D. (1993). Renal complications of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Kidney International*, 44(3), 643–653. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8231040>
- Schwab, J., Burkovski, A., Siegle, L., Müssel, C., & Kestler, H. A. (2017). ViSiBooL-visualization and simulation of Boolean networks with temporal constraints. *Bioinformatics*, 33(4), 601–604. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw661>
- Seaberg, R. M., & Van Der Kooy, D. (2003). Stem and progenitor cells: The premature desertion of rigorous definitions. *Trends in Neurosciences*, 26(3), 125–131. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00031-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00031-6)
- Sera, Y., LaRue, A. C., Moussa, O., Mehrotra, M., Duncan, J. D., Williams, C. R., ... Ogawa, M. (2009). Hematopoietic stem cell origin of adipocytes. *Experimental Hematology*, 37(9), 1108–1120, 1120.e1-4. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2009.06.008>
- Shen, Y., Miao, N., Wang, B., Xu, J., Gan, X., Xu, D., ... Lu, L. (2017). c-Myc promotes renal fibrosis by inducing integrin α -mediated transforming growth factor- β signaling. *Kidney International*, 92(4), 888–899. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.03.006>
- Sidney, L. E., Branch, M. J., Dunphy, S. E., Dua, H. S., & Hopkinson, A. (2014). Concise review: Evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells*, 32(6), 1380–1389. <https://doi.org/10.1002/stem.1661>
- Siegle, L., Schwab, J. D., Kühlwein, S. D., Lausser, L., Tümpel, S., Pfister, A. S., ... Kestler, H. A. (2018). A Boolean network of the crosstalk between IGF and Wnt signaling in aging satellite cells. *PLoS One*, 13(3), e0195126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195126>
- Silvestre, J. S., & Menasché, P. (2015). The Evolution of the Stem Cell Theory for Heart Failure. *EBioMedicine*, 2(12), 1871–1879. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.11.010>

- Skalli, O., Ropraz, P., Trzeciak, A., Benzonana, G., Gillesen, D., & Gabbiani, G. (1986). A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *The Journal of Cell Biology*, *103*(6 Pt 2), 2787–2796. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3539945>
- Skelton, R. J. P., Costa, M., Anderson, D. J., Bruveris, F., Finnin, B. W., Koutsis, K., ... Elliott, D. A. (2014). SIRPA, VCAM1 and CD34 identify discrete lineages during early human cardiovascular development. *Stem Cell Research*, *13*(1), 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2014.04.016>
- Skuli, N., Monferran, S., Delmas, C., Favre, G., Bonnet, J., Toulas, C., & Moyal, E. C. J. (2009). $\alpha\beta 3/\alpha\beta 5$ integrins-fak-rhoB: A novel pathway for hypoxia regulation in glioblastoma. *Cancer Research*, *69*(8), 3308–3316. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2158>
- Smith, C. L., Baek, S. T., Sung, C. Y., & Tallquist, M. D. (2011). Epicardial-derived cell epithelial-to-mesenchymal transition and fate specification require PDGF receptor signaling. *Circulation Research*, *108*(12), e15-26. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.235531>
- Sojoodi, M., Stradiot, L., Tanaka, K., Heremans, Y., Leuckx, G., Besson, V., ... Bonfanti, P. (2016). The zinc finger transcription factor PW1/PEG3 restrains murine beta cell cycling. *Diabetologia*, *59*(7), 1474–1479. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3954-z>
- Somanath, P. R., Malinin, N. L., & Byzova, T. V. (2009). Cooperation between integrin $\alpha v\beta 3$ and VEGFR2 in angiogenesis. *Angiogenesis*, *12*(2), 177–185. <https://doi.org/10.1007/s10456-009-9141-9>
- Song, K.-H., Cho, S.-J., & Song, J.-Y. (2016). $\alpha v\beta 1$ Integrin As a Novel Therapeutic Target for Tissue Fibrosis. *Annals of Translational Medicine*, *4*(20), 411. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.10.33>
- Sonnhammer, E. L., von Heijne, G., & Krogh, A. (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings / ... International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology; ISMB. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, *6*, 175–182. <https://doi.org/9783223>
- Spaans, F., de Vos, P., Bakker, W. W., van Goor, H., & Faas, M. M. (2014). Danger Signals From ATP and Adenosine in Pregnancy and Preeclampsia. *Hypertension*, *63*(6), 1154–1160. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03240>
- Spinella-Jaegle, S., Rawadi, G., Kawai, S., Gallea, S., Faucheu, C., Mollat, P., ... Roman-Roman, S. (2001). Sonic hedgehog increases the commitment of pluripotent mesenchymal cells into the osteoblastic lineage and abolishes adipocytic differentiation. *Journal of Cell Science*, *114*(Pt 11), 2085–2094. Retrieved from <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11493644&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/9DAAAB6A-F2D8-4F26-A5E1-EF8C3E5E273E>
- Streuli, C. H. (2009). Integrins and cell-fate determination. *Journal of Cell Science*, *122*(Pt

- 2), 171–177. <https://doi.org/10.1242/jcs.018945>
- Strutz, F., Okada, H., Lo, C. W., Danoff, T., Carone, R. L., Tomaszewski, J. E., & Neilson, E. G. (1995). Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *The Journal of Cell Biology*, *130*(2), 393–405. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7615639>
- Stupp, R., Hegi, M. E., Neyns, B., Goldbrunner, R., Schlegel, U., Clement, P. M. J., ... Weller, M. (2010). Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *28*(16), 2712–2718. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.6650>
- Sun, Y., Zeng, Y., Zhu, Y., Feng, F., Xu, W., Wu, C., ... Zhu, Z. (2014). Application of (68)Ga-PRGD2 PET/CT for $\alpha\beta 3$ -integrin imaging of myocardial infarction and stroke. *Theranostics*, *4*(8), 778–786. <https://doi.org/10.7150/thno.8809>
- Swaney, W. T., Curley, J. P., Champagne, F. A., & Keverne, E. B. (2008). The paternally expressed gene Peg3 regulates sexual experience-dependent preferences for estrous odors. *Behavioral Neuroscience*, *122*(5), 963–973. <https://doi.org/10.1037/a0012706>
- Taga, T., Suzuki, A., Gonzalez-Gomez, I., Gilles, F. H., Stins, M., Shimada, H., ... Laug, W. E. (2002). α -integrin antagonist EMD 121974 induces apoptosis in brain tumor cells growing on vitronectin and tenascin. *International Journal of Cancer*, *98*(5), 690–697. <https://doi.org/10.1002/ijc.10265>
- Tang, X. L., Rokosh, G., Sanganalmath, S. K., Yuan, F., Sato, H., Mu, J., ... Bolli, R. (2010). Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation*, *121*(2), 293–305. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.871905>
- Thiaville, M. M., Huang, J. M., Kim, H., Ekram, M. B., Roh, T.-Y., & Kim, J. (2013). DNA-binding motif and target genes of the imprinted transcription factor PEG3. *Gene*, *512*(2), 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.10.005>
- Thiaville, M. M., Kim, H., Frey, W. D., & Kim, J. (2013). Identification of an Evolutionarily Conserved Cis-Regulatory Element Controlling the Peg3 Imprinted Domain. *PLoS ONE*, *8*(9), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075417>
- Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., & Brown, R. A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *3*(5), 349–363. <https://doi.org/10.1038/nrm809>
- Torry, D. J., Richards, C. D., Podor, T. J., & Gauldie, J. (1994). Anchorage-independent colony growth of pulmonary fibroblasts derived from fibrotic human lung tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, *93*(4), 1525–1532. <https://doi.org/10.1172/JCI117131>
- Travers, J. G., Kamal, F. A., Robbins, J., Yutzey, K. E., & Blaxall, B. C. (2016). Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circulation Research*, *118*(6), 1021–1040.

<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306565>

- Turner, N. A., & Porter, K. E. (2013). Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction. *Fibrogenesis and Tissue Repair*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-6-5>
- Ulmasov, B., Neuschwander-Tetri, B. A., Lai, J., Monastyrskiy, V., Bhat, T., Yates, M. P., ... Griggs, D. W. (2016). Inhibitors of Arg-Gly-Asp-Binding Integrins Reduce Development of Pancreatic Fibrosis in Mice. *Cmgh*, 2(4), 499–518. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.03.004>
- Urbanek, K., Quaini, F., Tasca, G., Torella, D., Castaldo, C., Nadal-Ginard, B., ... Anversa, P. (2003). Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(18), 10440–10445. <https://doi.org/10.1073/pnas.1832855100>
- van Amerongen, M. J., Bou-Gharios, G., Popa, E., van Ark, J., Petersen, A. H., van Dam, G. M., ... Harmsen, M. C. (2008). Bone marrow-derived myofibroblasts contribute functionally to scar formation after myocardial infarction. *The Journal of Pathology*, 214(3), 377–386. <https://doi.org/10.1002/path.2281>
- Van der Flier, A., & Sonnenberg, A. (2001). Function and interactions of integrins. *Cell and Tissue Research*, 305(3), 285–298. <https://doi.org/10.1007/s004410100417>
- Walker, J. L., & Assoian, R. K. (2005). Integrin-dependent signal transduction regulating cyclin D1 expression and G1 phase cell cycle progression. *Cancer Metastasis Reviews*, 24(3), 383–393. <https://doi.org/10.1007/s10555-005-5130-7>
- Warnke, C., Menge, T., Hartung, H.-P., Racke, M. K., Cravens, P. D., Bennett, J. L., ... Stüve, O. (2010). Natalizumab and progressive multifocal leukoencephalopathy: what are the causal factors and can it be avoided? *Archives of Neurology*, 67(8), 923–930. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.161>
- Wilkins, E., Wilson, L., Wickramasinghe, K., Bhatnagar, P., Leal, J., Luengo-Fernandez, R., ... Townsend, N. (2017). European Cardiovascular Disease Statistics 2017 edition. *European Heart Network, Brussels*, 192. <https://doi.org/978-2-9537898-1-2>
- Wysoczynski, M., Guo, Y., Moore, J. B., Muthusamy, S., Li, Q., Nasr, M., ... Bolli, R. (2017). Myocardial Reparative Properties of Cardiac Mesenchymal Cells Isolated on the Basis of Adherence. *Journal of the American College of Cardiology*, 69(14), 1824–1838. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.01.048>
- Xing, M. (2013, March 1). Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc3431>
- Yamaguchi, A., Taniguchi, M., Hori, O., Ogawa, S., Tojo, N., Matsuoka, N., ... Tohyama, M. (2002). Peg3/Pw1 is involved in p53-mediated cell death pathway in brain ischemia/hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 623–629. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107435200>
- Yaniz-Galende, E., Roux, M., Nadaud, S., Mougnot, N., Bouvet, M., Claude, O., ... Hulot, J. S. (2017). Fibrogenic Potential of PW1/Peg3 Expressing Cardiac Stem Cells. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(6), 728–741.

<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.06.010>

- Yellon, D. M., & Hausenloy, D. J. (2007). Myocardial reperfusion injury. *N. Engl. J. Med.*, *357*, 1121–1135. <https://doi.org/10.1056/NEJMra071667>
- Yong, K. W., Li, Y., Huang, G., Lu, T. J., Safwani, W. K. Z. W., Pingguan-Murphy, B., & Xu, F. (2015). Mechanoregulation of cardiac myofibroblast differentiation: implications for cardiac fibrosis and therapy. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *309*(4), H532–H542. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00299.2015>
- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., & Geiger, B. (2007). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nature Cell Biology*, *9*(8), 858–867. <https://doi.org/10.1038/ncb0807-858>
- Zeisberg, E. M., Tarnavski, O., Zeisberg, M., Dorfman, A. L., McMullen, J. R., Gustafsson, E., ... Kalluri, R. (2007). Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nature Medicine*, *13*(8), 952–961. <https://doi.org/10.1038/nm1613>
- Zhang, Y., Sivakumaran, P., Newcomb, A. E., Hernandez, D., Harris, N., Khanabdali, R., ... Lim, S. Y. (2015). Cardiac Repair With a Novel Population of Mesenchymal Stem Cells Resident in the Human Heart. *STEM CELLS*, *33*(10), 3100–3113. <https://doi.org/10.1002/stem.2101>
- Zlatanova, I., Pinto, C., & Silvestre, J.-S. (2016). Immune Modulation of Cardiac Repair and Regeneration: The Art of Mending Broken Hearts. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *3*(October), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2016.00040>

Résumé

Les cardiopathies ischémiques sont la cause principale d'insuffisance cardiaque. Lors du processus de cicatrisation suite à un infarctus, il a été montré que les cellules souches progénitrices cardiaques PW1⁺ participaient activement au remodelage du cœur, et ce, en participant à l'augmentation du nombre de fibroblastes. A l'heure actuelle les cellules PW1⁺ ne peuvent être récoltées qu'à travers l'utilisation d'une lignée rapportrice exprimant la β -Galactosidase sous le contrôle du gène Pw1. Ce projet a pour but de déterminer un marqueur membranaire associé à la présence de PW1 permettant de cibler spécifiquement ces cellules. A l'aide d'une suite logicielle, nous avons pu prédire un membranome des cellules PW1⁺ à partir de données RNA-seq que nous avons croisé avec le membranome observé par spectrométrie de masse. Cette approche combinée nous a permis de déterminer un ensemble de cibles d'intérêt dont l'expression a ensuite été validée par cytométrie en flux. Nous avons été capables d'associer la présence d'une protéine membranaire avec la présence de PW1 dans la fraction non myocytaire avec une forte spécificité et sensibilité. Des inhibiteurs pharmacologiques ont été décrit pour cette protéine, et leur utilisation in vitro puis in vivo a permis de montrer une réduction significative de la fibrose dans un modèle murin d'infarctus du myocarde accompagnée d'une augmentation de la survie après traitement.

Abstract

ischemic heart diseases are the major cause of heart failure, one of the most concerning disease in the world. The scarring process following myocardial infarction has been shown to be driven by cardiac progenitors cells (CPC), and PW1⁺ CPCs were shown to mediate and participate to this process. To target PW1⁺ cells, we are limited to a PW1^{nLacZ} reporter mice model. We aim to find a membrane bound protein associated with PW1 presence to help to target specifically those cells. Using a prediction software suite, we predicted a specific membranome for PW1⁺ CPCs from RNA-Seq datas. We performed a mass spectrometry analysis to determine an observed membranome, and the combination of both approaches allowed us to find candidates to test. We then confirmed the expression of the candidates, and one showed strong sensibility and sensibility to describe PW1⁺ cells. The inhibition of this target by pharmacological drug in vitro and in vivo showed a significant decrease of fibrosis in a myocardial infarction murine model together with a significant increase of survival after treatment.