

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG

Discipline : Sciences du Vivant

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

par

Eric SCHORDAN

Implication de la Protéine Apparentée à l'Hormone
Parathyroïdienne (PTHrP) dans la prolifération des
Cellules Musculaires Lisses Vasculaires et identification
d'une cible nucléaire de la PTHrP

*Pharmacologie et Physiopathologie Rénales
U727 INSERM-ULP (Directeur : Dr JJ. Helwig)
Faculté de Médecine, Strasbourg*

Soutenue le 21 juin 2005 devant la commission d'examen :

P. Corvol

A. Parini

V. Schini-Kerth

C. Silve

JJ. Helwig

T. Massfelder

Examinateur

Rapporteur externe

Rapporteur interne

Rapporteur externe

Codirecteur de thèse

Codirecteur de thèse

A Sandra

A mes parents

A ma grand-mère

A mes défunts grands-parents

A mes sœurs et leurs familles

A tous ceux qui me sont chers

Je remercie chaleureusement le **Docteur Thierry Massfelder**, CR1 à l'Inserm, co-directeur de ma thèse pour son aide, sa disponibilité, nos discussions enrichissantes, son excellence scientifique et ses précieux conseils le tout dans la bonne humeur.

Je remercie chaleureusement le **Docteur Jean-Jacques Helwig**, Directeur de recherche à l'Inserm, Directeur du laboratoire de Pharmacologie et Physiopathologie Rénale U727 et co-directeur de ma thèse pour son accueil, son accessibilité, sa disponibilité, son expertise scientifique et son soutien.

Je remercie également les membres du jury : les **Docteurs Caroline Silve** et **Angelo Parini** et les **Professeurs Valérie Schini-Kerth** et **Pierre Corvol** pour avoir acceptés de juger mon travail.

Je remercie tout particulièrement **Mademoiselle Sandra Welsch** pour son aide de tous les instants et son réconfort quotidien. Merci de m'avoir soutenu et motivé toutes ces années me permettant de réaliser mon cursus comme je l'ai fait.

Mes pensées vont également à tous les membres du Laboratoire de Pharmacologie et Physiopathologie Rénale qui ont tous participé à la réalisation de ce travail.

Au **Docteur Mariette Barthelmebs** pour son concours scientifique.

A **Madame Sylvie Rothhut** pour sa précieuse aide et son amitié.

A **Monsieur Alain Lambert**, ingénieur à l'Inserm pour sa disponibilité et son aide technique.

A **Mesdames Danièle Kuhlwein, Virginie Roques** et **Suzanne Wendling** pour leur aide technique et les travaux de secrétariat.

A tous mes amis du laboratoire, **Mesdemoiselle Sabrina Danilin** et **Carole Sourbier**, et **Monsieur Abdelali Agouni** ainsi que **Madame le Docteur Véronique Lindner** et **Messieurs les Docteurs Benoît Escande** et **Hervé Lang**, pour leur sympathie, leur soutien et leur bonne humeur quotidienne.

Abréviations

AC : adénylate cyclase

ADN : acide désoxyribonucléique

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

Ang II : angiotensine II

ANP : peptide natriurétique atrial

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine triphosphate

BSA : sérum albumine de bœuf

CML : cellule musculaire lisse

- **Ao** : aortique
- **Rv** : réovasculaire
- **V** : vasculaires

CRE : élément répondant à l'AMPc

DAG : diacylglycérol

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

EGF : facteur de croissance épithélial

FACS : fluorescence-activated cell sorting

FBS : sérum fœtal de bœuf

FGF : facteur de croissance fibroblastique

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GC : guanylate cyclase

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

GPCR : récepteurs couplés aux protéines G

GRKs : kinases des récepteurs couplés aux protéines G

HHM : hypercalcémie humorale maligne

HTA : hypertension artérielle

HTLV-1 : human T cell leukemia virus de type 1

IGF : insuline growth factor

IL-1 : interleukine 1

IP-3 : inositol triphosphate

MAPK : mitogen activated protein kinase

NLS: signal de location nucléaire

NO: monoxyde d'azote

NOS : synthase du monoxyde d'azote

PBS : phosphate buffer saline

pcDNA : plasmide complementary désoxyribonucléic acid

PDGF : platelet-derived growth factor

PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

PLC : phospholipase C

PTH : hormone parathyroïdienne

PTHrP: protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne

RPTH1 : récepteur à l'hormone parathyroïdienne de type 1

RT-PCR : transcription reverse-réaction de polymérisation en chaîne

SHR : rat spontanément hypertendu

SLN : séquence de localisation nucléaire

SP : séquence signal

TIP 39: peptide tubéroinfundibulaire de 39 acides aminés

TGF- β : facteur de croissance tumoral

TNF- α : facteur de nécrose tumorale

VEGF: vascular endothelial growth factor

VIP : Vasointestinal peptide

Sommaire

Abréviations

Chapitre I : Introduction bibliographique	1
1. Historique et découverte de la PTHrP	2
Découverte de la PTHrP	2
Historique	2
2. Biologie moléculaire de la PTHrP	3
2.1 Structure du gène de la PTHrP	3
2.2 Modifications post-traductionnelles	5
La séquence prépro de la PTHrP	6
La PTHrP(1-36)	6
La PTHrP intermédiaire	6
La PTHrP C-Terminale (107-139)	7
Le fragment C-terminal extrême : la PTHrP(141-173)	7
2.3 Les formes circulantes de la PTHrP	8
La PTHrP(1-36)	8
La PTHrP(38-94/95 et/ou 101)	9
La PTHrP(107-139/141)	9
La PTHrP(141-173)	10
2.4 Sécrétion de la PTHrP	10
2.5 Régulation de l'expression de la PTHrP	11
3. Récepteur de la PTHrP	13
3.1 Le RPTH1	14
Généralités	14
Structure du gène	14
Régulation de l'expression	15
Distribution	16
Systèmes effecteurs couplés et régulation fonctionnelle	17
RPTH1 et désordres génétiques	18
3.2 Le RPTH2	20
Généralités	20
Distribution	20
Ligands	21
Systèmes effecteurs couplés et rôles potentiels	22
4. Effets biologiques de la PTHrP	22
4.1 La PTHrP dans les tissus fœtaux	23
Chez l'homme	24
Modèles génétiquement modifiés	25
Système cardiovasculaire	26
4.2 La PTHrP dans les tissus adultes	26
Dans les tumeurs	26
Dans l'os et le squelette	27
Dans le système nerveux central	28
Dans la peau et le follicule pileux	28
Dans le sein et la glande mammaire	29
Dans le poumon	29
Dans le foie	29

Dans le système endocrine	30
5. La PTHrP dans le système cardiovasculaire et rénal	31
5.1 Effets cardiaques	31
La PTHrP dans le développement cardiaque	31
La PTHrP dans le cœur	32
La PTHrP dans les pathologies cardiaques :	33
5.2 Effets hémodynamiques	35
Effets hypotenseurs/vasodilatateurs	35
Effets hypertenseurs	37
5.2.1 Effet sur l'hémodynamique rénale	38
Expression	38
Le rein, cible privilégiée de l'action relaxante de la PTHrP	39
Actions sur le tonus glomérulo-vasculaire	40
Action sur la libération de rénine	41
5.3 Effets trophiques	42
CML rénovasculaires	42
Cellules mésangiales	42
Cellules tubulaires	43
6. La PTHrP et les cellules musculaires lisses	43
6.1 Expression	43
Stimulation par le sérum et les vasoconstricteurs	44
Stimulation par les forces mécaniques	45
Stimuli pathologiques	46
6.2 Voie de transduction dans les CMLV	46
6.3 Effets sur la prolifération des CMLV	47
6.3.1 Inhibition autocrine/paracrine de la prolifération	47
6.3.2 Stimulation intracrine	50
7. Mécanisme du ciblage nucléaire de la PTHrP	53
7.1 Accès au cytoplasme	54
Endocytose	54
Initiation alternative de la traduction	55
Passage rétrograde du réticulum endoplasmique	57
7.2 Accès au noyau	58
7.3 Fonctions nucléaires possibles de la PTHrP	61
7.4 Prolifération et apoptose cellulaire	61
7.5 La biogénèse des ribosomes	62
8. Cibles nucléaires potentielles de la PTHrP : la culline 3	63
9. Le stretch mécanique dans les CMLV	67
9.1 Définition	67
9.2 Influence sur le phénotype de CMLV	67
9.3 Mécanisme d'action / voie de transduction	69
Les récepteurs à tyrosine kinase	69
Les intégrines	70
Les récepteurs à protéine G et protéines G	71
Les canaux ioniques	72
9.4 Induction de l'expression de gènes cibles	74
9.5 Effet sur la prolifération des CMLV	75

10. Modèles antérieurs de souris transgéniques	76
10.1 Souris invalidées pour la PTHrP et le R-PTH1	76
10.2 Souris « rescue »	76
10.3 Souris transgéniques surexprimant la PTHrP et/ou le R-PTH1 dans les CML	76
10.4 Excision conditionnelle de la PTHrP dans les CML	77
Obtention des souris dont la PTHrP peut être excisée de manière conditionnelle dans les CML	79

Objectifs	82
------------------	-----------

Chapitre II : Matériel et Méthodes	85
---	-----------

▪ Animaux	86
▪ Isolement des arbres vasculaires intra-rénaux et des aortes thoraciques	86
▪ Obtention et mise en culture des CMLRv et CMLAo	86
▪ Immunofluorescence	87
▪ Mesure de la prolifération cellulaire	87
▪ Protocole de stretch mécanique des cellules	88
▪ Transfection stable des CMLRv et CMLAo	88
▪ Mesure de viabilité cellulaire	89
▪ Mesure de la prolifération par incorporation BrdU	89
▪ Stabilité de l'ARNm de la PTHrP	90
▪ Mesure de l'activité des promoteurs de la PTHrP	90
▪ Analyse de l'expression de la PTHrP par RT-PCR semi-quantitative et quantitative	90
○ Extraction de l'ARN	90
○ Synthèse de l'ADNc par transcription réverse (RT)	91
○ PCR Semi-Quantitative	91
○ Amplification de l'ADNc par PCR quantitative en temps réel	92
▪ Analyse par Western Blot	93
▪ Statistiques	94

Chapitre III : Implication de la PTHrP sur la prolifération des CMLV soumises au stretch mécanique.	96
--	-----------

Introduction	97
Résultats et discussion	98
▪ Effet du stretch mécanique sur la prolifération des CMLV	98
▪ Effet du stretch mécanique sur l'expression de la PTHrP et le RPTH1	99
▪ Implication de la PTHrP dans l'inhibition de la prolifération par le stretch mécanique	100
▪ Mécanisme de la stimulation de la PTHrP par le stretch mécanique	101

Chapitre IV : Etablissement des lignées de CMLV délétées pour la PTHrP 110

Introduction	111
Résultats et discussion	111
▪ Excision de la PTHrP dans les CMLV de souris	112
▪ Implication de la PTHrP dans la prolifération des CMLV	112
▪ Dérégulation du RPTH1 par l'angiotensine II et la PTHrP : un exemple de l'apport des CMLV délétées pour la PTHrP	113
▪ Perspectives	114

Chapitre V : Identification d'une cible nucléaire de la PTHrP : la Culline 3 116

Introduction	117
Résultats et discussion	117
▪ Stimulation de l'expression de la culline 3 par la PTHrP intracrine	117

Chapitre VI : Discussion générale 122

Conclusions 127

Résumé 129

Références Bibliographiques 136

Introduction bibliographique

Chapitre I

1. Historique et découverte de la PTHrP

Découverte de la PTHrP

En 1987, la PTHrP a été découverte et identifiée simultanément dans 3 laboratoires différents comme le facteur circulant d'origine tumorale responsable du syndrome paranéoplasique d'hypercalcémie humorale maligne, ou HHM, notamment grâce à ses propriétés « *PTH-like* » sur l'os et le tubule rénal.

Historique :

L'hypercalcémie humorale maligne (HHM) fut décrite pour la première fois dans les années 1920 lors de l'introduction en clinique de méthodes de dosages du calcium sérique chez des patients atteints d'un cancer ⁽¹⁾. Les premières séries de patients présentaient des métastases osseuses qui furent directement associées comme étant la cause de l'HHM. En 1941, Albright décrit le cas d'un patient présentant un carcinome rénal et une seule métastase osseuse atteint d'HHM associée à une hypophosphatémie. Cette hypercalcémie et hypophosphatémie furent reversées après ablation de la tumeur primaire. Albright en conclut qu'il devait exister un facteur circulant calcémiant et phosphaturique sécrété par le carcinome rénal et qu'il pourrait s'agir de part ses propriétés, de l'hormone parathyroïdienne ou d'un composé proche. De la même manière, Connor et Thomas décrivent 2 séries de patients atteints d'HHM ne présentant pas de métastases osseuses et réversible après ablation des tumeurs primaires. Il est maintenant bien admis qu'il existe 2 types d'HHM : 20% présentant des métastases osseuses et 80% où cette hypercalcémie est d'origine humorale. Ces données en faveur d'un facteur humoral responsable de l'HHM décrit par Albright ont initié une série de travaux destinés à découvrir ce facteur et mirent plus de 30 ans pour aboutir. Les premiers candidats furent des analogues de la vitamine D et les prostaglandines, mais les recherches s'orientèrent rapidement dans les années 60 et 70 vers la PTH. C'est en 1980 que les syndromes de l'HHM ont été bien définis en termes biochimiques ⁽²⁾. Les patients atteints d'HHM présentaient de fortes ressemblances avec les patients atteints d'hyperparathyroïdisme primaire, caractérisé par une augmentation d'excrétion d'AMPc par le néphron et une réduction de la réabsorption du phosphate par le tubule rénal. Cependant, un problème subsistait : les patients atteints

d'HHM présentait un taux très faible de PTH dans le plasma ainsi qu'une réduction des formes actives de la vitamine D. De plus, la balance entre la résorption ostéoclastique et la synthèse ostéoblastique était très différente entre l'hyperparathyroïdisme et l'HHM indiquant bien qu'il ne pouvait s'agir d'une sécrétion ectopique de PTH dans l'HHM. Le fait que dans l'HHM, la sécrétion d'AMPc néphrogénique est augmentée suggère fortement que ce facteur responsable de l'HHM puisse le lier et interagir avec le récepteur de la PTH (RPTH1) au niveau tubulaire. Fort de ce constat, une nouvelle stratégie fut employée afin d'isoler et identifier ce facteur en exploitant cette propriété de se lier au RPTH1.

Ainsi en 1987, trois groupes utilisant des modèles basés sur des tests de stimulation d'adénylate cyclase d'origine rénale ou ostéoblastique décrivent la purification de la partie N-Terminal de la PTHrP^(3, 4) ainsi que son clonage, l'isolement et le séquençage de l'ADNc de la PTHrP⁽⁵⁾.

2. Biologie moléculaire de la PTHrP

2.1 Structure du gène de la PTHrP

Chez l'homme, les gènes de la PTH et de la PTHrP sont portés par le bras court des chromosomes 11 et 12, respectivement^(6, 5). Les gènes de la PTH et de la PTHrP auraient une origine phylogénétique commune⁽⁷⁾, Ces deux gènes seraient en effet issus d'une duplication ancestrale d'un chromosome commun. En effet, ces deux chromosomes portent des gènes apparentés dont les isoformes A et B de la lactate déshydrogénase (LDH) et les formes H et K du gène ras⁽⁸⁾. L'analyse de leur structure génomique a montré que le gène de la PTHrP était beaucoup plus complexe que celui de la PTH⁽¹⁾. La PTHrP est le produit d'un gène unique dont la structure a été rapportée au début des années 1990 chez l'homme, le rat et la souris et depuis chez le chien, le bovin et le lapin^(1,9). Le gène de la PTHrP s'étend sur plus de 15 kb d'ADN génomique et comporte chez l'homme 3 promoteurs (P1, P2 et P3) et 9 exons qui génèrent après épissage alternatif de l'ARN pré-messager trois isoformes de 139, 141 et/ou 173 aminoacides selon les tissus^(1,9). Les promoteurs P1 et P3 consistent en des boîtes «TATA» classiques requises pour la transcription par l'ARN polymérase II^(10, 11, 12, 13), alors que le promoteur P2 est une séquence riche en éléments «GC»⁽¹⁴⁾ contenant de nombreux sites de liaison pour les facteurs de transcription suggérant une régulation complexe de

l'expression du gène de la PTHrP. En règle générale, les trois promoteurs sont actifs dans la plupart des cellules normales et tumorales bien que des spécificités d'expression suivant les tissus aient été rapportées. Comme la plupart des gènes eucaryotes, le gène de la PTHrP contient un certain nombre de sites régulateurs comme des « enhancers », des « silencers », des sites de liaison pour des facteurs de transcription (AP1, AP2 et Sp1) et des sites CRE (« cAMP responsive element ») et GRE (« glucocorticoïde responsive element »). Chez le poulet la structure du gène est plus simple et seules les PTHrP(1-139) et (1-141) sont formées. Chez les rongeurs la structure encore simplifiée du gène de la PTHrP fait que seule une isoforme est synthétisée, à savoir la PTHrP(1-141) chez le rat et la PTHrP(1-139) chez la souris (**Fig. I.1**). Ainsi, le gène de la PTHrP ne s'est pas simplifié au cours de l'évolution. Bien au contraire sa structure est devenue complexe permettant de générer davantage d'isoformes de la protéine, notamment une forme (1-173) possédant une partie carboxy-terminale unique dont les propriétés biologiques commencent seulement à être découvertes.

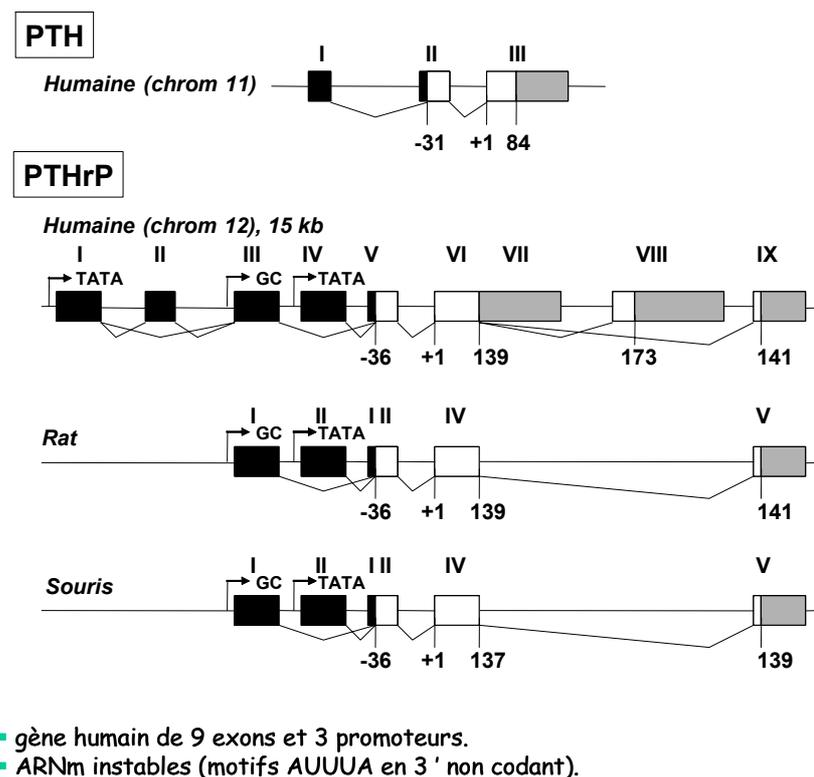


Figure I.1. Structure du gène de la PTHrP.

La figure compare l'organisation des gènes de la PTH (chromosome 11 chez l'homme) et de la PTHrP (chromosome 12 chez l'homme) et montre des exemples de variations phylogénétiques du gène de la PTHrP chez l'homme et diverses espèces. Les exons codants, non codant en 5' et non codant en 3' sont représentés par les rectangles blanc, noir et gris, respectivement. Les introns par les traits pleins. Les promoteurs (3 chez l'homme, 2 chez les oiseaux et les rongeurs) sont représentés par les flèches au-dessus des séquences. Les épissages alternatifs permettant de générer diverses isoformes de la PTHrP suivant l'espèce sont représentés par les lignes brisées sous chacune des séquences.

Une caractéristique importante de la structure primaire de l'ARNm de la PTHrP est la présence dans les régions non traduites en 3' de motifs nucléotidiques riches en « AU » connus pour être impliqués dans la dégradation rapide des ARNm. Ces séquences consensus sont retrouvées dans la grande majorité des ARNm de protéines jouant un rôle dans la différenciation et la prolifération cellulaire, à savoir les cytokines, les lymphokines et les protooncogènes. Ces caractéristiques sont en accord non seulement avec la demi-vie courte du messager de la PTHrP rapportée comme allant de 30 minutes à 3 heures suivant le type cellulaire mais aussi avec les taux cellulaires très bas du messager ⁽¹⁵⁾. Comme pour les autres facteurs contenant ces motifs « AU », le rapide « turn-over » de la PTHrP servirait à limiter la durée de réponse de la PTHrP à divers stimuli aussi bien intracellulaires qu'extracellulaires. La présence de nombreux sites de régulation dans les régions promotrices sont en accord avec ce concept « cytokine-like » de la PTHrP.

2.2 Modifications post-traductionnelles

La traduction des différents ARNm de la PTHrP donne naissance à trois isoformes de 175, 177 et 209 AA, contenant chacun une séquence prépro de 36 AA. L'extrémité C-terminale s'étend jusqu'aux AA 139, 141 ou 173. L'homologie de la séquence entre PTHrP et PTH est limitée à l'extrémité N-terminale avec 8 des 13 premiers AA identiques entre les 2 protéines. A partir du 14^{ème} AA la séquence diverge totalement entre les 2 peptides mais conserve une structure tridimensionnelle comparable jusqu'au 34^{ème} AA, ce qui permet d'ailleurs aux fragments N-terminaux de la PTHrP de se lier au même récepteur que la PTH, le RPTH1.

La séquence 1-111 ne présente aucune forme d'homologie avec d'autres protéines connues mais est néanmoins très conservée de part sa très forte homologie entre les différentes espèces telles que l'homme, la souris, le rat et le poulet.

La région C-terminale de la PTHrP (111-139) présente quand à elle une homologie mais à un degré moindre entre les espèces alors que la partie C-terminale extrême (141-173) est spécifique à l'homme ⁽¹⁾.

L'ensemble des isoformes de la PTHrP sont le siège de modifications post-traductionnelles protéolytiques par des « prohormones convertases » comme les PC1/2/3 ou la furine (une protéase de la famille des subtilisines) clivant la PTHrP au niveau de sites mono- ou multi-basiques (résidus K/R) générant plusieurs formes de sécrétion, dont les mieux

connues sont la PTHrP(1-36), la PTHrP(38-94/95 et/ou 101) et la PTHrP(107-139/141) (**Fig. I.2**).

La séquence prépro de la PTHrP

Comme nous l'avons mentionné plus haut, la PTHrP possède une séquence putative prépro de 36 AA en 5' de son ARNm. La séquence pré ou signale s'étend de l'acide aminé -36 jusque -8, -9. Elle est composée d'une séquence de 10 à 15 AA hydrophobes entourés de part et d'autre d'acides aminés chargés. La présence de cette séquence prépro va permettre à l'ARNm nouvellement synthétisé dans le cytosol d'être acheminé vers le réticulum endoplasmique rugueux où une « signal peptidase » va la cliver au niveau des acides aminés -8 ou -9⁽¹⁾. Le séquençage de la protéine a permis de déterminer que la PTHrP mature débutait avec une Ala¹^(2, 16). Il reste alors la séquence pro qui s'étend de la position -8 ou -7 à -1 qui contient un site endoprotéolytique multi basique Arg-Arg-Leu-Lys-Arg reconnu par une prohormone convertase : la furine. La fonction de ce propeptide reste à ce jour inconnu pour la PTHrP, mais il pourrait être impliqué dans le ciblage de la protéine au cours de sa maturation.

La PTHrP(1-36)

C'est la forme la plus étudiée, qui se lie au RPTH1. Le premier acide aminé étant l'Alanine-1 qui se situe juste après la séquence de clivage multibasique décrite plus haut. La partie C-terminale de ce peptide se termine au niveau du 36^{ème} acide aminé⁽¹⁾. En effet, le résidu monobasique Arg³⁷ est l'un des premiers substrats décrits pour les pro-hormones convertases, générant ainsi le fragment N-terminal de la PTHrP.

La PTHrP intermédiaire

La partie intermédiaire débutant par l'Ala³⁸ a été identifiée comme la forme mature de ce peptide⁽¹⁷⁾. Il est formé suite au clivage de l'Arg³⁷ décrit ci-dessus. Ce fragment présente un poids moléculaire d'environ 7000 Da, ce qui permet de situer son extrémité C-Terminale aux alentours des 80-100 AA de la séquence prédite par l'ADNc. En effet, cette région de la PTHrP présente de nombreux sites multibasiques pouvant être la cible de processus endoproteolitiques par des « prohormones convertases »⁽¹⁾. La recherche de l'extrémité C-terminale de ce fragment a révélé l'existence de trois formes sécrétées : la PTHrP(38-94), (38-95) et (38-101)⁽¹⁸⁾.

Il est également important de préciser dans ce chapitre que les régions multi-basiques dans la partie intermédiaire de la PTHrP 88-106 jouent un rôle fondamental dans le trafic cellulaire de la PTHrP naissante, puisqu'elles servent non seulement de sites de modifications post-traductionnelles de protéolyse permettant de générer certains des fragments présentés ici, mais également de séquence de localisation nucléaire (SLN) permettant à la PTHrP d'être transloquée vers le noyau cellulaire et de là d'affecter des mécanismes aussi fondamentaux que la prolifération cellulaire et la mort cellulaire dans divers types cellulaires normaux et tumoraux (j'y reviendrais dans les chapitres I.6 et I.7). De manière intéressante, il semble que ces régions soient également importantes pour diriger la PTHrP vers un site intracellulaire de dégradation probablement via la voie du protéasome après son ubiquitinylation ^(19, 20, 21).

La PTHrP C-Terminale (107-139)

La séquence de la PTHrP présente aux positions 102 à 106 une séquence multibasique Lys-Lys-Lys-Arg-Arg, substrat des prohormones convertases. Ceci suggère qu'il existe un peptide qui commence au niveau de l'acide aminé 107. La séquence 107-111 est une séquence très conservée entre les différentes espèces, suggérant qu'un peptide dérivé de cette région pourrait avoir des fonctions physiologiques très importante ⁽²²⁾. En effet, la PTHrP(107-139) également appelée « ostéostatine », a la propriété particulière d'inhiber la résorption osseuse en inhibant l'activité des ostéoclastes et en stimulant celle des ostéoblastes ^(22, 23).

Le fragment C-terminal extrême : la PTHrP(141-173)

Chez l'homme, l'épissage de l'exon 6 code pour la région 141-173 de la PTHrP. La PTHrP(141-173) a été dosée radioimmunologiquement dans de multiples situations : le lait maternel, le sang du cordon ombilical, le milieu conditionné de kératinocytes, les carcinomes squameux et rénaux ⁽²⁴⁾, les cancers de la prostate ⁽²⁵⁾ ainsi que dans les membranes amniotiques ⁽²⁶⁾. Mais le rôle physiologique de ce fragment C-terminal extrême de la PTHrP reste cependant encore inconnu actuellement.

A côté du traitement protéolytique, d'autres modifications post-traductionnelles ont été rapportées comme la O-glycosylation (présence de nombreux résidus sérine, thréonine et proline le long de la structure primaire de la PTHrP) dans les kératinocytes ⁽²⁷⁾ et les cardiomyocytes ⁽⁹⁾ et, bien qu'elle n'est pas été formellement démontrée, l'amidation du

fragment intermédiaire (38-94/95 et ou /101) décrit ci-dessous dans divers types cellulaires⁽¹⁸⁾. En revanche, la PTHrP humaine ne contient aucun site de N-glycosilation.

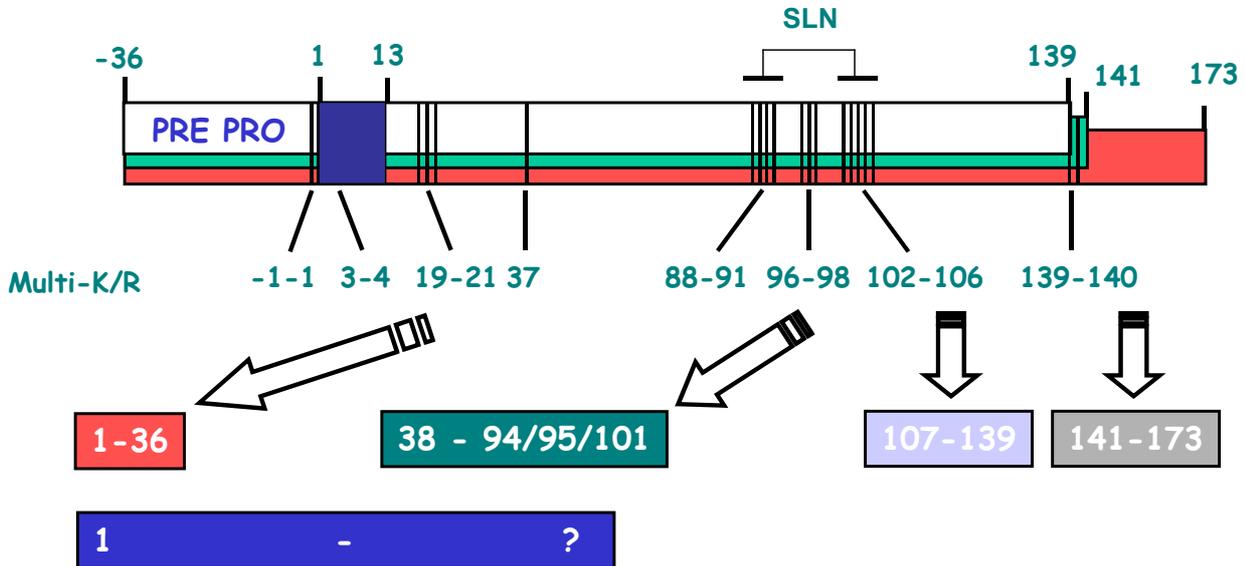


Figure I.2. Modifications post-traductionnelles de la PTHrP.

Les trois isoformes de la PTHrP sont représentées. Chez l'homme le gène de la PTHrP code pour 3 isoformes de 139, 141 et/ou 173 acides aminés (seule les formes de 139 et/ou de 141 acides aminés sont présentes chez les espèces inférieures). Ces isoformes contiennent dans leur structure primaire des sites multi-basiques (multi-K/R) qui servent de sites post-traductionnelles de protéolyse permettant de générer plusieurs fragments: un fragment amino-terminal (1-36), une forme intermédiaire (38-94/95/101) et des formes carboxy-terminale (107-139) et chez l'homme seulement une forme (141-173). En outre, d'autres fragments de sécrétion peuvent être générés, comme par exemple au cours de l'HHM où les fragments contiennent la séquence amino-terminal ainsi qu'une partie de la région intermédiaire dont on ne connaît pas l'extrémité carboxy-terminale (en bleu).

2.3 Les formes circulantes de la PTHrP

La PTHrP(1-36)

C'est la forme la plus étudiée, qui se lie au RPTH1. L'activation de ce récepteur est responsable des effets traditionnels de la PTHrP sur le métabolisme phosphocalcique. Ce peptide est responsable de la majorité des effets connus de la PTHrP dans les conditions normales et pathologiques, notamment au niveau cardiovasculaire, sur lesquelles je reviendrai plus largement. A côté de ses effets toniques sur le muscle lisse, ce fragment a été montré comme ayant des effets sur la prolifération cellulaire aussi bien dans les cellules normales que dans les cellules tumorales^(1, 9, 28) sur lesquels nous reviendrons très largement également.

La PTHrP(38-94/95 et/ou 101)

Cette forme est notamment impliquée dans le transport transplacentaire du calcium^(9, 18, 29, 30, 31). En effet, Care et coll.⁽²⁹⁾ ont montré l'importance du fragment (38-94) de la PTHrP sur le transport transplacentaire de calcium chez l'agneau et le veau, effet qui n'est reproduit ni par la PTH ni par la PTHrP(1-36). Ces travaux ont joué un rôle essentiel dans la mise en évidence de cette région de la PTHrP dans le maintien du gradient calcique materno-fœtal pendant la gestation. Il est important de noter que ce fragment est la forme majeure de sécrétion de plusieurs types cellulaires⁽¹⁷⁾. Ce fragment interagit avec un récepteur non encore identifié présent dans plusieurs types cellulaires incluant les CMLV, les cellules β - pancréatiques, le placenta et les cellules cancéreuses. Cependant ce récepteur ne semble pas être couplé à l'adénylyl cyclase (AC) mais est capable de stimuler l'influx de calcium dans divers types cellulaires incluant ceux énumérés ci-dessus⁽³¹⁾. On peut mentionner ici que malgré l'effet de ce fragment sur le calcium cytosolique, ce peptide ne présente aucune vasoactivité ni au niveau rénal (résultats non publiés) ni dans d'autres lits vasculaires. Par contre, ce fragment a récemment été montré comme ayant des effets inhibiteurs sur la prolifération des cellules tumorales mammaires *in vitro* et *in vivo* chez la souris « nude »⁽³²⁾. Cet aspect des propriétés de ce fragment pourrait être unique à certaines lignées tumorales notamment mammaires car il n'a pas été reproduit jusqu'ici dans d'autres types cellulaires.

La PTHrP(107-139/141)

A l'inverse de la PTHrP(1-36), cette forme manifeste des propriétés inhibitrices sur la résorption osseuse. De nombreuses études ont permis d'identifier le fragment (107-139) comme une authentique forme de sécrétion mature de la PTHrP et la présence de fragments carboxy-terminaux de la PTHrP a été détectée dans la circulation de patients atteints d'HHM^(33, 24, 34) ou d'insuffisance rénale chronique⁽³⁵⁾. Dès 1991, Fenton et coll.⁽³⁶⁾ ont mis en évidence une action inhibitrice du fragment (107-139) de la PTHrP sur la résorption osseuse, un effet qui est diamétralement opposé à celui de la région N-terminale du peptide. Des études de relations structure-activité ont révélé par la suite que cette activité est contenue dans la séquence 107-111 dénommée pour cette raison « ostéostatine ». En effet, ce fragment agit directement sur les ostéoclastes en inhibant leur activité. Les travaux de Seitz et coll.⁽²³⁾ ont par ailleurs montré que le fragment (107-139) de la PTHrP stimulait l'activité des ostéoblastes en activant l'AC de ces cellules. Ce fragment présente également d'autres propriétés comme par exemple un effet stimulateur sur l'expression du VEGF (pour « vascular endothelial

growth factor »), un facteur angiogénique très puissant, dans les cellules osseuses ostéoblastiques humaines hOB et ce aussi bien au niveau de l'ARNm que de la protéine elle-même⁽³⁷⁾. Cet effet est inhibé par la staurosporine, un inhibiteur de la PKC mais pas par le H89, un inhibiteur de la PKA suggérant que cet effet est obtenu par stimulation de la PLC. Cette relation PTHrP-VEGF pourrait avoir des implications dans la vascularisation et la formation de l'os mais également dans l'angiogénèse tumorale dans les cancers produisant de la PTHrP, bien que cet aspect reste encore à être démontré. Comme les fragments N-terminaux et intermédiaires, le fragment C-terminal a été montré comme ayant des effets sur la prolifération cellulaire aussi bien dans les cellules normales que dans les cellules tumorales^(38, 39, 40, 41, 42).

La PTHrP(141-173)

Cette forme est présente chez l'homme uniquement. Ce fragment peut être dosé radio-immunologiquement dans le lait et le sang du cordon ombilical⁽⁸⁾, dans le milieu conditionné des kératinocytes humains, dans les carcinomes squameux et rénaux⁽⁴³⁾ ainsi que dans les cancers prostatiques⁽²⁵⁾. Le rôle et les propriétés physiologiques de ce fragment sont encore mal connus à ce jour mais des données récentes de la littérature montrent non seulement que la PTHrP(141-173) stimule la prolifération cellulaire notamment au niveau de l'os⁽⁴⁴⁾ mais également qu'une séquence de localisation nucléaire (SLN) serait présente dans cette extrémité rendant compte notamment de propriétés dans la régulation de la matrice extracellulaire et du contenu extracellulaire en phosphate au niveau de l'os.

2.4 Sécrétion de la PTHrP

La classification de la PTHrP est plutôt inhabituelle sachant qu'elle peut être à la fois classée comme un facteur neuroendocrinien et un facteur de croissance ou une cytokine. C'est un facteur neuroendocrinien dans le sens où suivant le type cellulaire, la PTHrP va être empaquetée dans des granules de sécrétions denses, telles que dans les cellules β pancréatiques, justaglomérulaires, parathyroïdiennes, adrénomedullaires, pituitaires ou encore dans les neurones du système nerveux central (**Fig. I.3**). La PTHrP va ainsi pouvoir être sécrétée par dépolarisation de la cellule et fusion des granules avec la membrane plasmique. D'autre part, dans les types cellulaires ne contenant pas une telle machinerie neurosécrétoire, la PTHrP va être sécrétée constitutivement. Ceci est le cas pour les cytokines ou les facteurs de croissance où la sécrétion se fait de façon continue, l'élément déterminant pour son taux de

sécrétion étant alors son taux de transcription et sa vitesse de dégradation. Ce mode de sécrétion est retrouvé dans les cellules musculaires lisses, les hépatocytes, les ostéoblastes, les chondrocytes ou encore les kératinocytes,

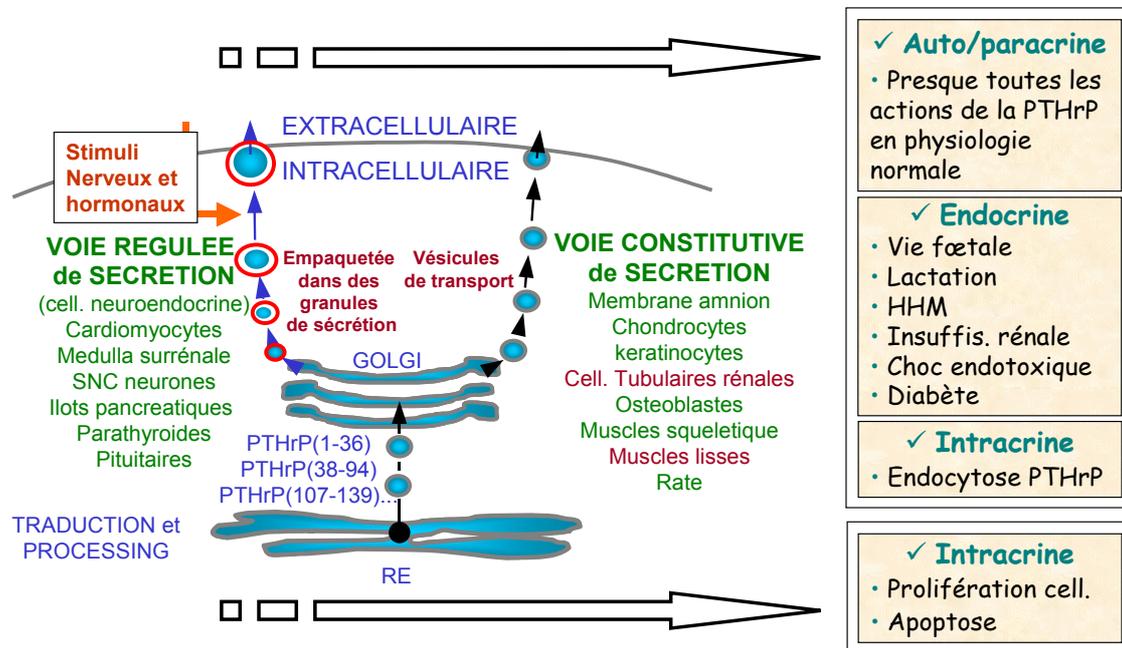


Figure I.3. Voies de sécrétion et d'action de la PTHrP.

La PTHrP utilise soit la voie de sécrétion dite régulée soit celle dite constitutive suivant le type cellulaire (cf. texte). Une fois sécrétée dans le milieu extracellulaire, la PTHrP peut agir selon divers modes *auto/paracrine* (le plus fréquent), *endocrine* (dans certaines conditions physiologiques ou pathologiques) ou *intracrine* (par endocytose puis translocation nucléaire). La PTHrP peut également utilisée la voie *intracrine* sans sécrétion préalable et affecter la vie cellulaire.

2.5 Régulation de l'expression de la PTHrP

La structure complexe du gène de la PTHrP, qui comprend trois promoteurs et qui subit un épissage alternatif des transcrits précurseurs en 5' et 3' du gène, suggère bien le niveau de complexité que peut atteindre sa régulation. Connaissant le caractère ubiquitaire de la PTHrP, il devient évident que cette protéine peut assurer une ou plusieurs fonctions dans une grande variété de tissus aussi bien au cours de la vie fœtale, néonatale qu'adulte. D'ailleurs, les données récentes de la littérature concordes toutes pour classer le gène de la PTHrP dans la famille des cytokines. La présence de séquences d'instabilité AUUUA dans les régions non traduites en 3' de ses ARNm sont responsable d'une demi-vie brève du message, reportée comme variant de 30 minutes à 3h suivant les conditions et le tissu considérés.

Nous savons à ce jour que la synthèse et la sécrétion de PTHrP sont régulées suivant les conditions physiologiques et le tissu considéré par différents agents (**Fig. I.4**) incluant le calcium, l'AMPC, les esters de phorbol, les facteurs de croissance et les cytokines (EGF, TNFs, TGFs, ILs...), les hormones peptidiques comme les vasoconstricteurs (angiotensine II, endothéline-1, thrombine...), les neuropeptides et divers composés stéroïdiens (glucocorticoïdes, vitamine D3, oestrogènes...), ainsi que par l'étirement de certains tissus notamment musculaires (vessie, utérus, intestin, artères...) sur lequel je reviendrai plus particulièrement. ^(1, 9, 45). L'expression de la PTHrP est également induite ou augmentée dans les conditions pathologiques telles que, l'athérosclérose, la resténose après angioplastie et l'hypertension artérielle ou encore les cancers, le choc endotoxinémique, l'ischémie rénale ou l'insuffisance rénale. Ainsi, dans l'athérosclérose, la resténose après angioplastie ou encore l'hypertension artérielle, une augmentation de l'expression de la PTHrP a été démontrée dans les CMLV en prolifération et ce aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* ^(9, 45, 46).

La présence en 5' à la fois de promoteurs TATA et CG du gène de la PTHrP est une particularité intéressante car les gènes présentant une telle architecture peuvent utiliser un type de promoteur pour une expression basale et l'autre type pour une régulation de son expression en fonction de divers stimuli. Il a été montré que les promoteurs riche en éléments « GC » sont constitutivement actifs permettant ainsi une expression des gènes d'entretiens (Brandt et al 1994) alors que les promoteurs TATA permettraient une expression différentielle des gènes suivant les tissus et les stimuli. Cependant, ceci ne semble pas être le cas pour la PTHrP où l'utilisation de tel ou tel promoteur varie énormément en fonction du tissu et du type cellulaire.

<ul style="list-style-type: none"> ➤ Vasoconstricteurs (+) ➤ Oestradiol ➤ Facteurs de croissances (+) <ul style="list-style-type: none"> • IL, TGFB • PDGF, EGF • VEGF, NGF (?) ➤ 1,25(OH)2D3(+/-) ➤ Glucocorticoïdes (-) 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Stretch (+) <ul style="list-style-type: none"> • Utérus • Vessie • Vaisseaux • Cœur • GI • Oviducte 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Pathologies (+) <ul style="list-style-type: none"> • Cancer • HHM • Hypertension • Ischémie • Lésions vasc. • Endotoxémie • Calcification ML • Inflammation • Diabètes (?)
--	--	--

Figure I.4. Régulation de l'expression de la PTHrP.

La figure rassemble les principaux stimuli connus de l'expression de la PTHrP.

3. Récepteur de la PTHrP

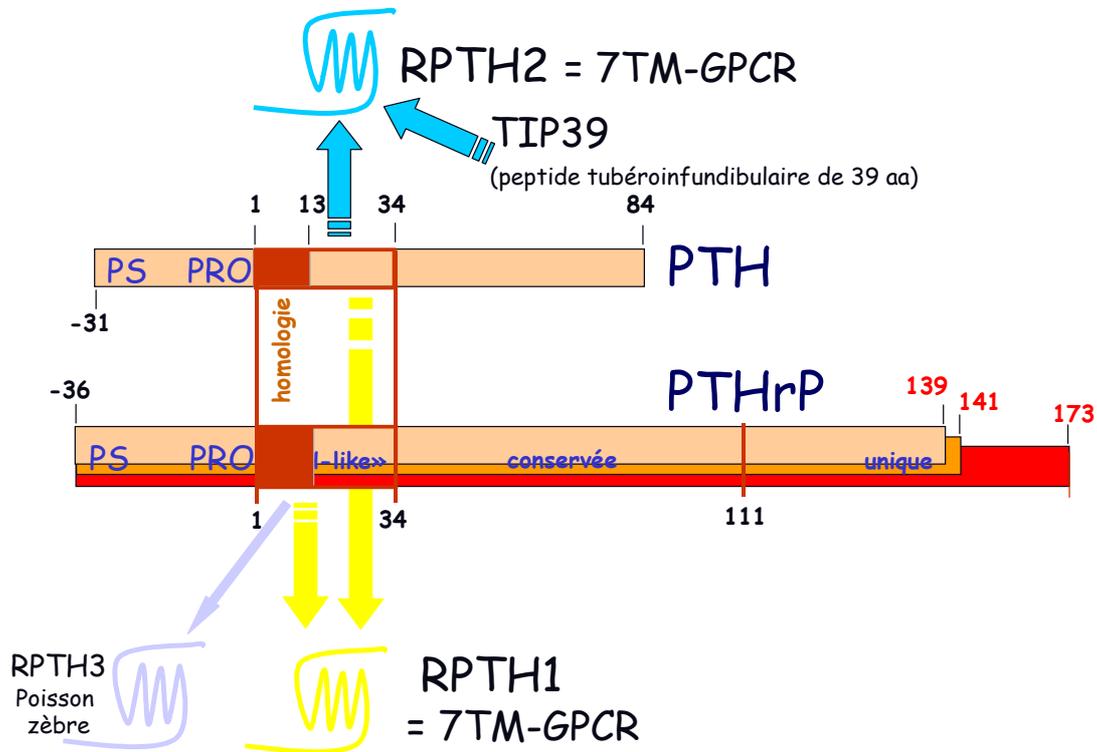


Figure I.5. Les trois types de récepteurs du système PTH/PTHrP/TIP39.

Le R-PTH1 lie avec des affinités similaires la PTH et la PTHrP. Le TIP39 est considéré comme le ligand endogène du R-PTH2 alors que la PTH ne semble être qu'un agoniste partiel de ce récepteur. Le R-PTH3, identifié chez le poisson zèbre, lierait préférentiellement la PTHrP. GPCR signifie « G-protein-coupled receptor ».

La PTHrP agit de toute évidence via divers récepteurs dont un seul a été cloné et bien caractérisé : le RPTH1. Il s'agit du récepteur commun PTH/PTHrP capable de fixer aussi bien la PTH que la PTHrP. L'existence de récepteurs spécifiques aux fragments intermédiaires de la PTHrP et à son extrémité C-terminale a été caractérisée pharmacologiquement mais jusqu'à présent aucun récepteur reconnaissant spécifiquement ces formes n'a pu être cloné. En 1995, un autre récepteur a été isolé et cloné, dénommé RPTH2 qui reconnaît la PTH mais pas la PTHrP⁽⁴⁷⁾. Les principales caractéristiques de ce récepteur sont présentées ci-dessous. Enfin, un troisième récepteur du système PTH/PTHrP a plus récemment été identifié chez le poisson zèbre, le RPTH3 qui reconnaît la PTHrP et avec une moindre affinité la PTH⁽⁴⁸⁾. Ce récepteur pourrait être spécifique de certaines espèces de poissons car il n'est pas retrouvé chez d'autres espèces animales, je ne reviendrai par conséquent pas dessus dans ce chapitre. Ces récepteurs

sont tous à 7 segments transmembranaires et couplés aux protéines G. La **Figure I.5** schématise le système PTH/PTHrP et ses récepteurs en terme d'interactions.

3.1 Le RPTH1

Généralités

Il s'agit du récepteur le mieux caractérisé et certainement le plus étudié en clinique dans la recherche de traitements visant à lutter contre l'hyperparathyroïdisme, l'HHM et l'ostéoporose. Le RPTH1 appartient à une sous-famille de récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G^(49, 50), appartenant à la famille des récepteurs à la sécrétine, la calcitonine ou encore le VIP^(51, 52, 53, 49). Le clonage moléculaire du RPTH1 et des récepteurs de la calcitonine et de la sécrétine ont permis de définir une nouvelle famille de récepteurs qui se distinguent de la classe des récepteurs β_2 -adrénergiques (classe I) : il s'agit des récepteurs de classe II ou de la famille B. Ces récepteurs sont couplés aux protéines G (RCPG) et sont caractérisés par sept hélices transmembranaires reliées entre elles par des boucles hydrophiles d'environ 280 acides aminés, un domaine N-terminal extracellulaire particulièrement long (d'environ 150 résidus) pouvant être glycosylé et une extrémité C-terminale cytoplasmique d'environ 130 résidus pouvant être phosphorylée par les kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRK), la PKA et la PKC. Une autre caractéristique consiste en la présence de résidus hautement conservés dans sa séquence: huit résidus cystéine dont six se trouvent dans l'extrémité N-terminale extracellulaire du RPTH1 et les deux restants dans les boucles extracellulaires 1 et 2^(49, 50, 54). De par leur localisation, ces deux cystéines sont probablement impliquées dans la formation de ponts disulfures.

Structure du gène

Le RPTH1 a été cloné début des années 1990 chez plusieurs espèces animales incluant l'opossum, le rat, la souris et l'homme et plus récemment chez le chien^(1, 49, 50, 55). Il apparaît dans diverses études phylogénétiques que le gène du RPTH1 est très conservé à travers les espèces, à l'instar du gène de la PTHrP. Chez l'homme il est situé sur le bras court du chromosome 3 (en 3p21.1-22) et s'étend sur environ 22 kb d'ADN génomique et est constitué de 17 exons (14 exons codants et 3 exons non-codants) (**Fig. I.6**). Il code pour une glycoprotéine monomérique d'environ 90kDa (60kDa à l'état non glycosylé) qui lie aussi bien la PTH(1-34) que la PTHrP(1-36)^(49, 50). Un certain nombre d'observations ont révélé

l'existence, après épissage alternatif du RPTH1, de plusieurs isoformes d'ARNm du récepteur, une caractéristique également retrouvée chez les autres membres de cette sous-famille de récepteurs. Ceci est réalisé grâce à la présence de 3 promoteurs dénommés P1, P2 et P3 (ce dernier ne serait actif que chez l'homme) ^(49, 50, 56) dont l'activité est dépendante du tissu considéré, et à la présence de 3 exons non traduits en 5' dénommés U1, U2 et U3. Chez les rongeurs quatre isoformes au moins d'ARNm du RPTH1 ont ainsi pu être identifiées qui suivent une distribution tissulaire spécifique ⁽⁵⁷⁾: l'isoforme I qui est transcrit de l'exon U3 (promoteur P2) est retrouvé dans la majorité des tissus et les isoformes II, III, IV qui sont transcrits à partir de l'exon U1 (promoteur P1) mais qui ont une distribution plus restreinte, à savoir le rein pour les isoformes II, III, et IV et les ovaires pour l'isoforme IV. Ainsi, toutes les initiations de transcription à partir du promoteur P1 sont identifiées dans le rein et 90% des ARNm du RPTH1 présents dans le rein résultent de l'activité du promoteur P1 ⁽⁵⁸⁾. Il est intéressant de noter à ce niveau que ceci est également vrai pour les CMLV des artérioles préglomérulaires et que ceci est unique au rein car les CMLV des autres territoires sanguins expriment le RPTH1 à partir du promoteur P2. Il faut noter également que l'isoforme III ne contient pas de peptide signal et pourrait coder pour une forme intracellulaire du RPTH1.

La régulation de l'expression du gène du RPTH1 chez l'homme est plus complexe par rapport à celle observée chez la souris. Bien que les régions promotrices P1, P2 et la région non-traduite en 5' soient bien conservées entre les deux espèces ⁽⁵⁹⁾, l'activité de P1 est sélective du rein humain adulte tandis que P2 est le seul promoteur actif au cours de la vie fœtale ⁽⁶⁰⁾. La présence d'un promoteur P3 chez l'homme, plus particulièrement actif dans le rein, mais aussi exprimé dans de nombreux tissus humains, rend la régulation de l'expression du gène du RPTH1 encore plus complexe ⁽⁶¹⁾.

Régulation de l'expression

La régulation de l'expression du gène du R-PTH1 chez l'homme est plus complexe par rapport à celle observée chez la souris. Les promoteurs P1 chez l'homme et la souris contiennent plusieurs sites d'initiation répartis sur plus de 100 pb ^(58, 60) et environ 50% de motifs riches en GC. Leurs promoteurs P2 sont très riches en GC et possèdent des sites d'initiation unique dans les régions contenant le facteur de transcription Sp1 ^(60, 62). Le promoteur P3 contient, quant à lui, de nombreux motifs riches en GC et présente également des sites pour les facteurs de transcription Sp1 et Maz ⁽⁶³⁾. D'autre part, l'état actif/inactif du promoteur est modulé par méthylation de résidus cystéine ⁽⁶⁰⁾. La méthylation des promoteurs

induit l'inhibition de leur activité. La déméthylation n'est pourtant pas suffisante à l'activation des promoteurs qui sont aussi sous le contrôle des facteurs de transcription.

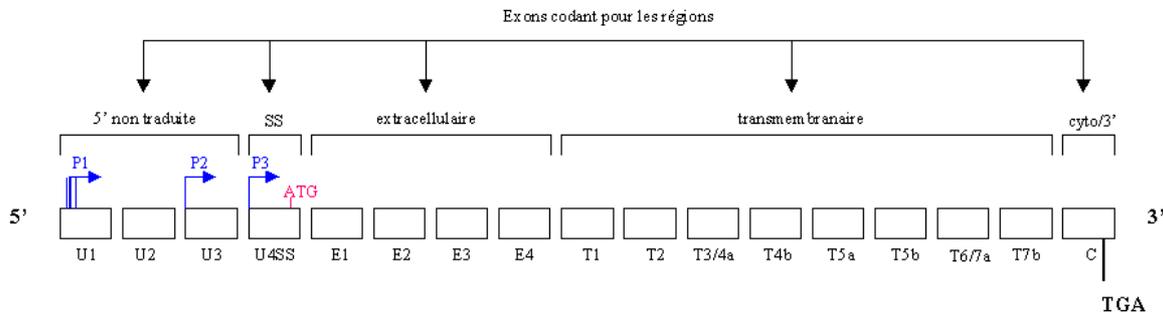


Figure I.6. Représentation schématique de la structure du gène du RPTH1.

La position des promoteurs P1, P2 et P3 est indiquée par les flèches bleues. Le codon initiateur ATG marque le début de la traduction. Les exons codant pour les séquences 5' non traduites, la séquence signal, les domaines extracellulaires, les domaines transmembranaires et la région cytoplasmique sont indiqués respectivement par U, SS, E, T et C. D'après Lee et coll.

Distribution

Comme la PTHrP, le RPTH1 a une distribution ubiquitaire ^(49, 50), Le RPTH1 est fortement exprimé dans les sites dits « traditionnels » d'action de la PTH que sont l'os et le tubule rénal. Par ses interactions avec les RPTH1 présents dans ces tissus, la PTH régule l'homéostasie du calcium ainsi que toute une série d'ions et d'électrolytes. Bien que la PTH circule à des taux faibles de l'ordre du picomolaire, la forte densité de RPTH1 présents dans ces sites permet à l'hormone d'exercer ses fonctions régulatrices. La PTHrP exprimée localement présente également ces propriétés, mais à l'opposé de la PTH agissant sur un mode endocrine, la PTHrP agit selon divers modes auto/paracrine et/ou intracrine, propres aux facteurs locaux. Cependant, la PTHrP peut également agir selon un mode endocrine sur ces tissus dans les conditions pathologiques, notamment l'HHM. Le RPTH1 est plus faiblement exprimé dans les sites d'action dits « non traditionnels » de la PTH. Ces sites regroupent l'ensemble des tissus ou cellules cibles où des propriétés ont pu être mises en évidence pour la PTH avant la découverte de la PTHrP, mais uniquement à des concentrations pharmacologiques, loin des niveaux physiologiques de PTH. Dans ces sites et dans ceux mis en évidence suite au clonage de la PTHrP, le RPTH1 est présent en faible densité, insuffisante pour que la PTH puisse exercer une quelconque activité biologique dans les conditions normales. Bien que les concentrations circulantes de PTH peuvent augmenter dans certaines conditions pathologiques, comme l'hyperparathyroïdisme, les niveaux atteints ne sont pas suffisants pour

permettre à la PTH d'agir sur ces sites. Ce n'est pas le cas de la PTHrP qui est exprimée localement et qui s'est révélée être le ligand endogène du RPTH1 présent dans ces sites, la PTHrP agissant selon un mode auto/paracrine et/ou intracrine pour réguler toute une série de processus biologiques notamment la différenciation et la prolifération cellulaire. Parmi ces cibles non traditionnelles, on notera plus particulièrement le cerveau, les poumons, le foie, le système gastro-intestinal, les testicules, les ovaires, l'utérus, le cœur, les muscles lisses vasculaires et non vasculaires et l'endothélium vasculaire ^(57, 64, 65).

De manière importante, diverses études immunohistologiques ont révélé qu'à côté de sa localisation membranaire, le RPTH1 est également retrouvé dans le noyau de plusieurs types de tissus et types cellulaires *in vitro* et *in vivo* incluant le foie (hépatocytes), les ovaires (cellules de la granulosa), l'utérus (cellules épithéliales glandulaires), l'os (diverses lignées cellulaires ostéoblastiques) et le rein (cellules épithéliales des tubules contournés proximaux et podocytes glomérulaires) ^(66, 67). La signification physiopathologique de la présence du RPTH1, ou tout au moins d'une isoforme immunoréactive du RPTH1, dans le noyau reste inconnue à l'heure actuelle. Le RPTH1 nucléaire pourrait être le produit de traduction de l'isoforme III de l'ARNm du RPTH1 évoqué ci-dessus, bien que cela reste à être démontré. Une hypothèse tentante est que le RPTH1 nucléaire puisse servir de partenaire à la PTHrP nucléaire pour exercer ces effets notamment sur la prolifération et la mort cellulaire.

Systemes effecteurs couplés et régulation fonctionnelle

En terme de couplage aux systèmes effecteurs, il est bien décrit que selon le type cellulaire le RPTH1 est couplé, via les protéines régulatrices $G\alpha_s$ ou $G\alpha_i$, au système AC/AMPC/PKA et/ou, via $G\alpha_q$ ou $G\alpha_{11}$, au système phospholipase C (PLC)/IP3-DAG/ PKC ^(49, 50). Un certain nombre d'études a permis de mieux définir la contribution de ces deux voies de signalisation dans les réponses cellulaires à la PTH et à la PTHrP. Il s'avère que le RPTH1 n'est pas couplé à ces deux voies avec la même efficacité et que les réponses induites par l'agoniste via la voie de l'AC/PKA sont plus sensibles et plus importantes en intensité que celles via la voie de la PLC/PKC ^(49, 50). En outre, il semble que, selon le type cellulaire étudié, l'une ou l'autre voie puisse être préférée par rapport à l'autre.

De nombreux sites de phosphorylation sont présents dans la structure primaire du RPTH1 pour la caséine kinase II, la PKA, la PKC mais également la β -ARK. L'activité du RPTH1, et donc les propriétés auto/paracrine de la PTHrP (et endocrine de la PTH), est modulée par le phénomène de désensibilisation dont le mécanisme semble être spécifique du

tissu considéré ^(49, 50). Chez le rat ce sont particulièrement les résidus sérine en position 489, 491-493, 495, 501 et 504 localisés dans l'extrémité carboxy-terminale du RPTH1 qui sont phosphorylés par une famille de protéines kinases agissant sur les récepteurs activés par l'agoniste, nommées GRKs ^(49, 50, 68). Sept membres de GRKs ont été identifiés jusqu'à présent, les GRK-2, 3 et 5 étant impliquées dans la phosphorylation des RPTH1 *in vivo* et *in vitro* ^(69, 70). L'implication des protéines kinases dépendantes des seconds messagers (PKA et PKC) dans la phosphorylation du RPTH1 est controversée ^(68, 71, 72, 73) tout comme l'importance de la phosphorylation dans l'internalisation du RPTH1 ^(68, 70). Par exemple, les travaux récents de Tawfeek et coll. ⁽⁶⁸⁾ démontrent que la phosphorylation du R-PTH1 est nécessaire à son internalisation. Bien que le mécanisme moléculaire par lequel le RPTH1 est internalisé n'a pas encore été formellement identifié, une implication du système β -arrestines/clathrine a pu être mise en évidence ^(49, 50, 74, 75). Par contre, l'internalisation du RPTH1 ne semble impliquer ni la PKA ni la PKC. Les études de Huang et coll. ⁽⁷⁶⁾ indiquent que le RPTH1 contient des régions régulatrices activatrices et inhibitrices de l'internalisation au niveau de la 3^{ème} boucle intracellulaire et dans son extrémité carboxy-terminale. Comme dans d'autres systèmes, la phosphorylation du RPTH1 constitue également un mécanisme régulateur limitant la stimulation du récepteur.

RPTH1 et désordres génétiques

Deux maladies génétiques humaines ont récemment été associées à des mutations du gène du RPTH1. Il s'agit des chondrodysplasies de Jansen et de Blomstrand, associées respectivement à mutations activatrices et inhibitrices de l'activité du RPTH1.

La chondrodysplasie de Jansen est un désordre autosomique dominant caractérisé par un raccourcissement des membres associé à une hypercalcémie et une hypophosphatémie indépendante de l'agoniste ⁽⁷⁷⁾. Les mutations du RPTH1 ont été caractérisées en positions 223 (histidine en arginine, H223R), 410 (thréonine en proline, T410P) et 458 (isoleucine en arginine, I458R) ^(9, 78, 79, 80). Les trois résidus mutés sont tous conservés, signe d'un rôle fonctionnel important pour ces résidus. Les cellules COS-7 transfectées transitoirement par le RPTH1 muté à l'une ou l'autre de ces positions montrent une activité constitutive avec une accumulation d'AMPC supérieure à celle obtenue dans les cellules transfectées par le RPTH1 sauvage. Le phénotype observé chez les patients atteints de la maladie de Jansen ressemble fortement au phénotype observé non seulement chez les souris transgéniques surexprimant la PTHrP dans les chondrocytes mais également chez les souris transgéniques exprimant l'un de

ces mutants (H223R) sous le contrôle du promoteur $\alpha 1$ (I) du collagène. L'expression chez la souris invalidée pour le gène de la PTHrP du transgène H223R sous le contrôle du promoteur $\alpha 1$ (II) du collagène, permet de retarder la différenciation des chondrocytes sauvant ces souris d'une mort prématurée ⁽⁸¹⁾. Plus récemment, l'expression chez la souris invalidée pour le gène du RPTH1 de ce même transgène sous le contrôle du promoteur $\alpha 1$ (II) du collagène a permis de restaurer un développement normal du squelette. Cependant, et de manière forte intéressante, ces souris étaient toujours caractérisées par une mort prématurée périnatale suggérant que d'autres processus sont affectés chez les souris invalidées pour le gène du RPTH1 et responsables de la mort prématurée de ces souris ⁽⁸²⁾.

La chondrodysplasie de Blomstrand, qui est létale dans les derniers mois de grossesse, est un désordre autosomique récessif caractérisé par une mort prématurée des chondrocytes. Les os longs sont courts avec une densité augmentée et une absence de plaque de croissance ⁽⁸³⁾. Dans ce cas, le phénotype des fœtus atteint de cette maladie ressemble fortement au phénotype des souris invalidées pour le gène du RPTH1. En accord avec ce fait et avec les observations faites chez les souris invalidées pour le gène de la PTHrP et sauvées d'une mort précoce par expression transgénique de la PTHrP dans les chondrocytes, les fœtus souffrant de cette maladie montrent un défaut voire une absence de développement des glandes mammaires et des dents ⁽⁹⁾. Les défauts génétiques du RPTH1 observés dans cette maladie incluent une délétion (résidus 373-383), une mutation en position 132 (proline en leucine, P132L), et la délétion d'un G en position 1122 (résultant en un décalage du cadre normal de lecture et la synthèse d'une protéine tronquée au delà du résidu 364) ⁽⁹⁾. La transfection de cellules COS-7 par des vecteurs d'expression contenant ces divers mutants du RPTH1 montrent en effet une réduction significative de l'action de la PTH sur la production d'AMPc, par rapport à des cellules transfectées par le RPTH1.

Ces deux formes de chondrodysplasie révèlent clairement l'importance du RPTH1 pour le développement normal non seulement du squelette mais également d'autres organes chez l'homme.

3.2 Le RPTH2

Généralités

Le RPTH2 a été cloné en 1995 par Usdin et coll. ⁽⁴⁷⁾ à partir de cortex de rat. Chez l'homme, lorsque l'on compare sa séquence avec les autres membres des récepteurs de classe II, on constate une identité de séquence respectivement de 51%, 42%, 40%, 37% et 33% avec le RPTH1 (**Fig. I.7**), le récepteur de la sécrétine, le récepteur 1 du VIP, le récepteur 2 du VIP et le récepteur de la calcitonine ⁽⁷⁴⁾. Les homologies de séquence diminuent encore avec les autres membres des récepteurs de classe II, et pratiquement plus d'homologie n'existe entre le RPTH2 et les membres des autres classes de récepteur. Chez l'homme, le gène du RPTH2 est localisé dans la bande 33 du chromosome 2 ⁽⁸⁴⁾.

Distribution

Les techniques classiques de biologie moléculaire et cellulaire ont été utilisées pour déterminer la distribution tissulaire et cellulaire du RPTH2. Si le RPTH1 est exprimé dans un large spectre de cellules, l'expression du RPTH2 est essentiellement retrouvée dans le cerveau (septum, hypothalamus et moelle épinière essentiellement), le pancréas (cellules D sécrétrices de somatostatine) et de manière intéressante, le système cardiovasculaire (toutes les régions du cœur surtout les cardiomyocytes, CMLV et cellules endothéliales dans les vaisseaux), et ce aussi bien au niveau de l'ARNm que de la protéine ⁽⁸⁵⁾. Le RPTH2 est également présent dans d'autres sites mais de manière plus discrète et plus localisée que seules les techniques fines de localisation cellulaire ont permis de mettre en évidence (hybridation *in situ*, RT-PCR, immunohistochimie). Ainsi, il a été détecté (ARNm et/ou protéine) dans l'os et le cartilage (chondrocytes essentiellement), les testicules (sperme et épидидyme), les ovaires, le système endocrinien (glandes thyroïdiennes, parathyroïdiennes et surrénales), dans le système gastro-intestinal (cellules sécrétrices de mucus, de gastrine et de somatostatine essentiellement) ⁽⁸⁵⁾ ainsi qu'au niveau rénal, dans certaines cellules situées au pôle vasculaire glomérulaire pouvant appartenir à l'appareil juxtaglomérulaire, ce qui est contradictoire à sa large distribution dans les vaisseaux qui a pu être mise en évidence par le même groupe d'investigateurs ^(85, 86). Cependant cette localisation ciblée du RPTH2 dans les cellules juxtaglomérulaires sécrétrices de rénine suggère que ce récepteur puisse être impliqué dans la libération rénale de rénine, et donc notamment dans la régulation de la pression artérielle.

Cependant, cela ne semble pas être le cas chez le rat comme notre laboratoire a pu le montrer récemment ⁽⁸⁷⁾.

Ligands

Contrairement au RPTH1 qui lie avec approximativement la même affinité PTH et PTHrP, le RPTH2 ne lie que la PTH. Les expériences effectuées sur des peptides chimères de la PTH et de la PTHrP ont permis de montrer que la substitution de l'His⁵ de la PTHrP par l'Ile⁵ de la PTH transformait la PTHrP en un agoniste à la fois du RPTH1 et du RPTH2. Inversement, une PTH où l'Ile⁵ a été remplacée par l'His⁵ de la PTHrP, n'active plus le RPTH2 ^(88, 89). Le résidu en position 5 de la PTH est donc essentiel pour l'activation des voies effectrices du RPTH2. En outre, le remplacement de la Phe²³ de la PTHrP par le Trp²³ de la PTH transforme la PTHrP en un ligand du RPTH2. Gardella et coll. ⁽⁸⁸⁾ ont ainsi créé une PTHrP modifiée aux positions 5 et 23 ([Ile⁵,Trp²³]PTHrP(1-36)), qui est capable de se fixer et d'activer le RPTH2 avec une affinité de l'ordre de 10nM.

La question de savoir si la PTH est le ligand endogène du RPTH2 s'est naturellement posée, notamment en raison du fait que ce récepteur est fortement exprimé dans le cerveau, un organe où très peu de PTH est présente. Ceci a conduit à l'identification en 1999 par Usdin et coll. ⁽⁹⁰⁾ d'un peptide de 39 acides aminés, le peptide tubéroinfundibulaire, ou TIP 39 (pour « tubuloinfundibar peptide » de 39 aminoacides), à partir d'extraits hypothalamiques de bœuf. Le gène du TIP39 est localisé sur le chromosome 19 chez l'homme et 7 chez le rat ⁽⁹¹⁾. La comparaison des séquences primaires de la PTH(1-34)/PTHrP(1-36) et du TIP39 n'a montré qu'une faible homologie entre ces deux types de peptides. Il était déjà bien établi que PTH et PTHrP sont issues d'un ancêtre commun. Les études phylogénétiques récentes ont permis de montrer que le TIP39 dérive lui aussi de cet ancêtre commun, mais que ces peptides forment des groupes distincts ayant chacun ses particularités phylogénétiques spécifiques ⁽⁹¹⁾.

Encore peu d'études se sont consacrées à déterminer la distribution du TIP39, notamment dans les sites où est exprimé le RPTH2. Récemment, John et coll. ⁽⁹¹⁾ ont montré par Northern blot que l'ARNm de 4,5 kb du TIP39 murin est fortement exprimé dans les testicules et plus faiblement exprimé dans le cerveau, le foie, le rein et le cœur. Par contre, d'autres auteurs ont montré que l'expression du TIP39 était la plus forte dans le cerveau ⁽⁹²⁾. Dans ce travail, une expression particulièrement abondante dans le cerveau de souris a été localisée dans les aires impliquées dans la régulation de l'activité motrice et dans la perception de la douleur ⁽⁹¹⁾.

Systèmes effecteurs couplés et rôles potentiels

Le RPTH2 est couplé au système AC/AMPC/PKA et/ou au système PLC/IP3-DAG/PKC suivant le type cellulaire ^(47, 88, 93, 94). Ainsi, dans les cellules rénales embryonnaires humaines (HEK-293) ou les cellules COS-7 en culture transfectées par le RPTH2 humain, le couplage se fait principalement avec l'AC avec des valeurs de CE_{50} inférieures à la nM et à un moindre degré avec la PLC, visualisée par une élévation faible et retardée dans le temps des taux intracellulaires de calcium ^(47, 88, 93, 94). Dans les cellules rénales de porc (LLC-PK₁), l'activation du R-PTH2 exprimé par transfection conduit à la stimulation de la PLC et à une libération de calcium à partir du réticulum endoplasmique ⁽⁹³⁾.

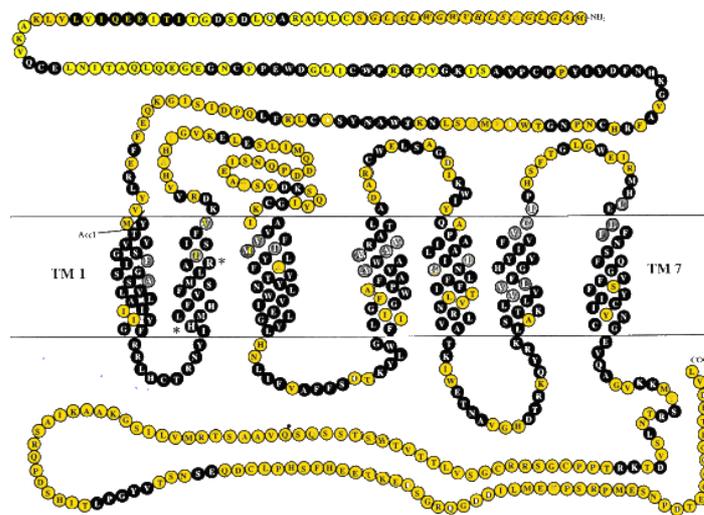


Figure I.7. Structure primaire du récepteur PTH2 humain.

Le R-PTH2 est composé de sept hélices transmembranaires (TM 1 à TM 7). Les cercles noirs représentent les acides aminés conservés par rapport à la séquence du RPTH1. Sont également représentés en cercles jaunes, les résidus non conservés entre les RPTH1 et les RPTH2. D'après Turner et coll. ⁽⁹⁵⁾.

4. Effets biologiques de la PTHrP

Il faut rappeler que contrairement à la PTH, dont la synthèse est confinée aux glandes parathyroïdiennes et quelques sites du cerveau, la PTHrP est exprimée non seulement par un grand nombre de tumeurs mais également par tous les tissus normaux et ce aussi bien au cours de la vie embryonnaire et fœtale que chez l'adulte ⁽¹⁾. Dans les conditions normales, les taux circulants de PTHrP sont indétectables avec les moyens actuels. L'expression quasi-ubiquitaire de la PTHrP suggère que la protéine agit essentiellement selon un mode auto/paracrine. Nous verrons cependant dans le chapitre I.6 qu'à côté de son mode d'action auto/paracrine, la

PTHrP est également susceptible d’agir par une voie intracrine et que dans certaines conditions physiologiques et pathologiques, un rôle endocrine de la PTHrP a pu être démontré (Fig. I.8).

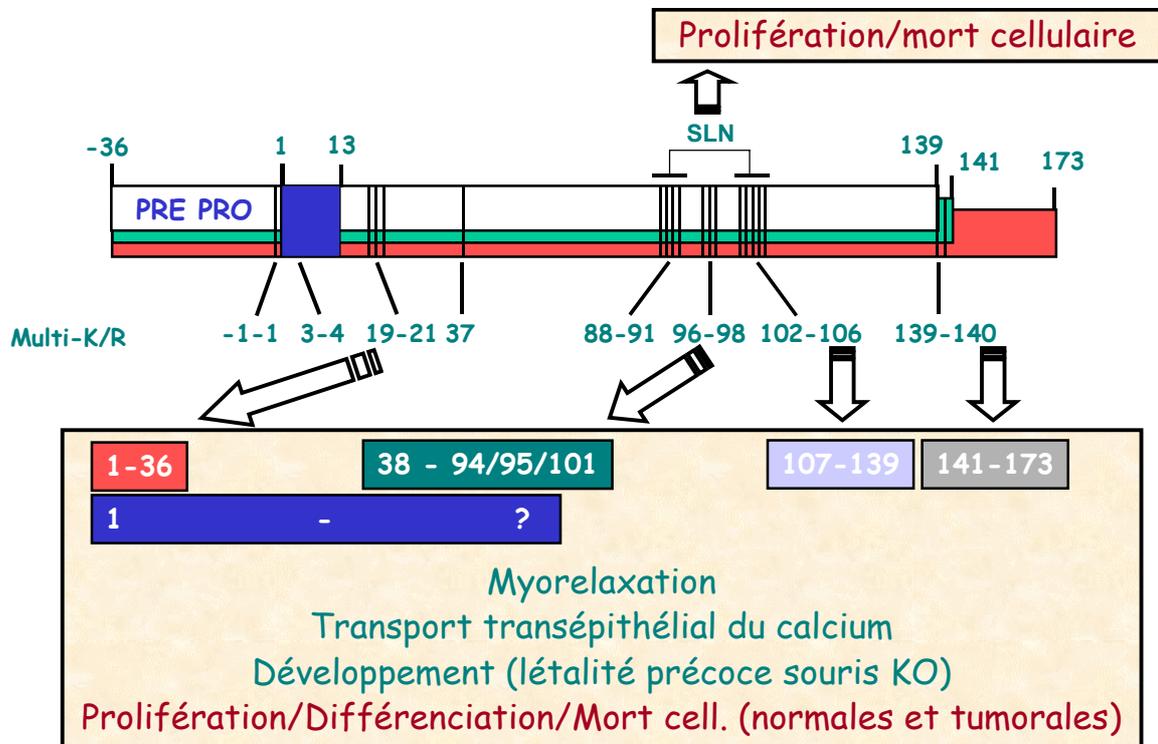


Figure I.8 : rôles biologiques de la PTHrP

- la myorelaxation des muscles lisses vasculaires et extra-vasculaires (fragments N-terminaux)
- La régulation du transport trans-épithélial du calcium dans le rein, le placenta et la glande mammaire (fragments intermédiaires)
- Rôle majeur au cours du développement (létalité précoce *in utero* des souris invalidées pour le gène de la PTHrP ou du RPTH1)
- Régulation de la prolifération, de la différenciation cellulaire et de la mort cellulaire (tous les fragments)

Les séquences multi-basiques présentes dans la région intermédiaire de la molécule servent non seulement de sites de protéolyse post-traductionnels mais également de SLN permettant à la molécule d’être dirigée vers le noyau régulant ainsi la prolifération et la mort cellulaire par des mécanismes encore inconnus (cf. chapitre I.6).

4.1 La PTHrP dans les tissus fœtaux

Durant la vie fœtale, chez toutes les espèces animales, incluant l’homme, la PTHrP et le RPTH1 sont très largement exprimés en suivant un schéma spatial et temporel précis. Ceci a été bien démontré dans des tissus et des organes aussi divers que l’épithélium des bronches, les follicules pileux, la peau, les muscles lisses, les dents, le foie, le rein et l’os^(1, 96, 97). La voie de signalisation du RPTH1 sert de mécanisme local de différenciation de l’endoderme.

En outre, la PTHrP pourrait jouer un rôle dans le développement et la différenciation de l'embryon en phase de préimplantation. En effet, l'addition de PTHrP et d'acide rétinoïque à des cellules F9 de tératocarcinome (cellules utilisées comme modèle de développement embryonnaire normal) induit la différenciation de ces cellules en un phénotype endodermique pariétal ^(96, 98, 99), un effet mettant en jeu des interactions complexes entre l'activation de la PKA et du système des MAPKs. La PTHrP et le RPTH1 sont exprimés chez la souris dans les premiers jours post-coïtum, dès le stade de huit cellules ^(96, 99), faisant du couple PTHrP/RPTH1 l'un des premiers couple ligand/récepteur apparaissant durant la phase de post-implantation. L'ARNm de la PTHrP est détecté au jour embryonnaire 4 chez le rat et 60 chez l'homme. Les résultats obtenus chez les souris transgéniques ou invalidées pour le gène de la PTHrP ou du RPTH1 supportent indiscutablement un rôle pour le couple PTHrP/RPTH1 dans la croissance de îlots pancréatiques, des follicules pileux, de la glande mammaire, des mammelons, du système cardiovasculaire, de l'os et des dents ^(1, 9, 45, 30, 96, 46, 100, 101, 102). Quelques aspects développementaux de la PTHrP sont développés ci-dessous :

Chez l'homme

Plusieurs travaux supportent un rôle de la PTHrP dans l'homéostasie materno-fœtale du calcium. Cependant, le fait qu'un grand nombre de tissus fœtaux exprime la PTHrP suggère fortement que le rôle de cette molécule ne se limite pas au métabolisme phospho-calcique. Comme évoqué ci-dessus, l'expression de la PTHrP pendant la vie fœtale chez l'homme est visible au deuxième mois de grossesse ⁽¹⁰³⁾ dans divers organes tels que le poumon, le foie, le pancréas, l'estomac, les intestins, les glandes parathyroïdiennes, l'épiderme, le muscle squelettique et le rein. La production de PTHrP dans le système nerveux central se limite au plexus choroïdien mais à partir de la douzième semaine, l'expression s'étend à la moelle épinière ⁽¹⁰⁴⁾. Dès la vingtième semaine, l'expression de la PTHrP est également observée dans le système cardiovasculaire ⁽¹⁰⁴⁾. La présence de PTHrP dans les muscles squelettiques et dans les muscles lisses de divers tissus suggère un rôle pour la PTHrP dans la mobilité tissulaire et dans le développement des membres du fœtus. La PTHrP est également présente dans les tissus du système urogénital du fœtus humain incluant les tubules distaux et les canaux collecteurs du rein, les glomérules jusqu'à la douzième semaine de grossesse, les tubes du mésonephros et du métanephros, les gonades et la medulla et le cortex des glandes surrénales ^(103, 104, 105). Par ailleurs, la PTHrP immunoréactive est également détectée de façon transitoire dans le mésenchyme de la colonne vertébrale, avant la formation du cartilage, puis réapparaît plus tard dans les grands chondrocytes matures. Les ostéoblastes sont le siège d'une

fixation fortement positive et la présence de PTHrP dans les régions d'ostéogénèse est renforcée par sa localisation dans les épiphyses osseuses et la calotte crânienne de fœtus humain de 18 à 20 semaines ^(104, 105, 106).

Modèles génétiquement modifiés

Il est important de mentionner les études sur les souris dont le gène de la PTHrP a été invalidé qui démontrent le rôle primordial de la PTHrP dans le développement du squelette. Ces souris meurent *in utero* ou à la naissance de chondrodysplasie caractérisée par une ossification prématurée et inappropriée ⁽¹⁰⁷⁾. Sur le plan histologique, les plaques de croissance osseuse de ces souris présentent une ossification enchondrale et périenchondrale prématurée et un nombre restreint de chondrocytes prolifératifs ^(107, 108, 109). Ces données suggèrent que l'absence de PTHrP est à l'origine d'une différenciation accélérée des chondrocytes, l'ossification prématurée conduisant à une chondrodysplasie. La PTHrP agirait ainsi comme un frein envers la différenciation des chondrocytes durant la vie embryonnaire permettant un développement normal du squelette. Les fonctions du RPTH1 ont également été recherchées en invalidant son gène chez la souris ⁽¹¹⁰⁾. Dans ce cas, la majorité des souris meurent en mi-gestation, un phénotype non observé chez les souris invalidées pour le gène de la PTHrP. Par contre, les souris qui survivent sont caractérisées elles aussi, comme les souris invalidées pour le gène de la PTHrP, par une différenciation accélérée des chondrocytes dans l'os. La mise en évidence d'un rôle crucial pour le couple PTHrP/RPTH1 dans la croissance du squelette est renforcée par l'étude récente de Lee et coll. ⁽¹⁰⁶⁾ montrant par hybridation *in situ* chez le rat que l'ARNm du RPTH1 est exprimé dans l'os d'une manière spécifique du type cellulaire et de la période durant le développement du squelette. Très récemment, des études réalisées chez les souris invalidées soit pour le gène de la PTHrP, soit pour celui de la PTH, ou des deux gènes ont révélé qu'en réalité PTHrP et PTH sont tous deux nécessaires pour un développement normal du squelette au cours de la vie fœtale et que la PTH exerce des actions essentielles à l'interface cartilage-os ⁽¹¹¹⁾. Si les conséquences de l'ablation du gène de la PTHrP ou de celui du RPTH1 sur le développement osseux ont pu être bien caractérisées malgré la létalité précoce de ces souris, il n'en est rien concernant les conséquences sur d'autres processus biologiques. De même et bien entendu, aucune étude fonctionnelle n'a pu être réalisée sur ces modèles. Afin de palier à ces inconvénients, Wysolmerski et coll. ⁽¹¹²⁾ ont « sauvé » les souris invalidées pour le gène de la PTHrP de la mort précoce par expression transgénique de la PTHrP dans les chondrocytes. Ces souris vivent quelques semaines après la naissance, bien que dans des conditions plutôt difficiles. Cependant, ce modèle a permis de mettre en

évidence un rôle crucial de la PTHrP notamment dans le développement de la glande mammaire, des follicules pileux et des dents.

Systeme cardiovasculaire

L'implication du système PTHrP/RPTH1 sur le développement cardiovasculaire a également pu être mise en évidence à partir de souris double transgéniques surexprimant à la fois la PTHrP et le RPTH1 dans les CML. En effet, ces souris meurent aux jours 9-10 de gestation d'une hypertrophie ventriculaire cardiaque et de malformations du réseau vasculaire.

En résumé, l'ensemble de ces travaux confirme le rôle crucial de la PTHrP dans le développement et la croissance du fœtus. A ce titre il est intéressant également de mentionner l'étude de Wlodek et coll. ⁽¹¹³⁾ qui ont montré l'existence d'une relation de cause à effet entre la restriction de croissance et la faible concentration en PTHrP dans le fluide amniotique chez le rat spontanément hypertendu (SHR) comparativement aux animaux normotendus, pouvant impliquer la PTHrP comme un agent important de régulation de la croissance.

4.2 La PTHrP dans les tissus adultes

Un nombre impressionnant de travaux font état de la présence de l'ARNm de la PTHrP et/ou de PTHrP immunoréactive dans un large spectre de tissus normaux adultes de poissons, d'oiseaux et de mammifères en plus des tumeurs, soulignant le caractère ubiquitaire de cette protéine. Volontairement je ne détaillerai pas ici l'ensemble des types cellulaires qui expriment la PTHrP car cela sortirait du cadre de cette introduction. Je me contenterai de citer les grands systèmes biologiques et les rôles potentiels de la PTHrP dans ces systèmes tels qu'ils ont pu être déduits par des approches physiologiques, pharmacologiques et par l'étude des souris génétiquement modifiées. Ainsi la PTHrP est présente :

Dans les tumeurs

Un grand nombre d'études biochimiques, immunohistochimiques et moléculaires montrent la présence de PTHrP aux niveaux de l'ARNm et de la protéine dans un large éventail de tumeurs aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* ⁽¹⁾ qu'elles soient associées à une hypercalcémie ou non. En plus des tumeurs d'origine épithéliales, les ARNms de la PTHrP ont été identifiés dans les néoplasmes de tissus endocrines ^(114, 115, 116, 117, 118), dans les tumeurs de la peau ^(119, 120) et dans les lymphomes induits par les cellules T infectées par le virus de type I de la leucémie des

cellules T humaines ^(121, 122). L'HHM est également trouvée dans plusieurs modèles de tumeurs animales incluant le rat (lignée tumorale de cellules de Leydig, Rice-500) ^(123, 124) et le chien (lymphosarcome canin, LSA+, et adénocarcinome apocrine canin, CAC-8) ^(125, 126, 127). Dans chacun de ces derniers modèles, l'ARNm de la PTHrP est fortement exprimé bien que l'hypercalcémie semble résulter de l'action de plusieurs substances également sécrétées par les tumeurs. Le rôle crucial de la PTHrP dans l'HHM a été bien démontré et cela a permis de dégager de nouvelles voies en terme de contrôle de l'hypercalcémie dans l'HHM mais également dans d'autres désordres ostéolytiques. Cependant, cela ne constitue qu'un aspect des propriétés de la PTHrP dans les cancers. En effet, la mise en évidence de propriétés complexes apparentées aux facteurs de croissance pour la PTHrP et le fait que son expression ou sa surexpression soient observées quelque soit la calcémie au moins dans certains cancers argumentent la possibilité que cette protéine puisse être impliquée également dans la croissance et la dissémination métastatique d'un certain nombre de cancers. En accord avec cette possibilité, il est bien décrit dans divers types cellulaires que l'expression de la PTHrP est sous le contrôle de plusieurs facteurs de croissance et angiogéniques comme le TGF- β (pour « tumoral growth factor » beta), l'EGF (pour « epidermal growth factor »), le PDGF (pour « platelet-derived growth factor ») et le VEGF (pour « vascular endothelial growth factor ») ^(15, 45). A l'inverse, la PTHrP elle-même stimule l'expression d'un certain nombre de ces facteurs et agit également comme un facteur angiogénique tout au moins sur les cellules endothéliales et au niveau de l'os ^(15, 37, 128). Prises ensemble, ces données révèlent que la PTHrP interagit avec de nombreux facteurs de croissance et angiogéniques. Au sein des tumeurs, à côté de son activité hypercalcémiant, la possibilité existe donc que la PTHrP puisse participer localement au contrôle du développement et de la croissance des tumeurs. En effet, des études récentes sur les cancers du sein, de la prostate et des poumons convergent vers une implication cruciale de la PTHrP dans la croissance et la dissémination métastatique et donc vers la possibilité que la PTHrP puisse être une cible de développement de nouvelles thérapeutiques.

Dans l'os et le squelette

L'inactivation du gène de la PTHrP ou du RPTH1 chez la souris a considérablement argumenté le rôle crucial du système PTHrP/RPTH1 dans la formation du squelette. En effet, l'inactivation du gène de la PTHrP chez la souris se traduit en une chondrodysplasie suite à la diminution de la prolifération des chondrocytes ainsi qu'une mauvaise différenciation des

chondrocytes dans la plaque de l'épiphyse. Ces résultats suggèrent une implication de la PTHrP dans la maturation des chondrocytes ⁽¹²⁹⁾. Cet effet est le résultat d'interactions fines de la PTHrP avec le système hedgehog et les TGF- β ^(130, 131, 132). La régulation de l'expression de la PTHrP varie quand à elle suivant le type cellulaire. Ainsi, contrairement aux chondrocytes, la 1,25 dihydroxyvitamin D3 réprime *in vivo* et *in vitro* l'activité du promoteur dans les ostéoblastes. En outre, la colocalisation de la PTHrP et du RPTH1 dans les ostéoblastes et les chondrocytes suggère un mode auto/paracrine de la PTHrP. Cependant, bien que la majeure partie des effets de la PTHrP passe par l'interaction du fragment N-terminal de la PTHrP avec le RPTH1, de récentes données suggèrent une action intracrine de la PTHrP. En effet, la lignée CFK2 de chondrocytes transfectées par la PTHrP montre un marquage positif à la fois dans le nucléole et dans la voie sécrétrice ⁽¹³³⁾.

Dans le système nerveux central

L'expression de la PTHrP a pu être montrée dans de nombreuses régions du cerveau. Des expériences d'hybridation *in situ* chez le rat ont montré la présence d'ARNm de la PTHrP dans l'hippocampe, le cervelet et le cortex cérébral ^(134, 135). La régulation de l'expression de la PTHrP a été étudiée sur des cultures primaires de cervelet de rat néonatal ⁽¹³⁶⁾ et ont montré une régulation similaire aux autres neuropeptides. Ainsi, dans le système nerveux central, la PTHrP modulerait notamment la différenciation des astrocytes ⁽¹³⁷⁾, la sécrétion hypothalamique d'arginine vasopressine ⁽¹³⁸⁾ ainsi que la pression artérielle (action hypertensive) par activation du système nerveux sympathique.

Dans la peau et le follicule pileux

Le carcinome squameux étant le prototype du carcinome produisant de la PTHrP, il n'est pas surprenant que les kératinocytes furent les premières cellules étudiées pour leur sécrétion de PTHrP. La PTHrP serait présente dans toute les composantes de l'épiderme, allant de la couche basale à la couche granulaire ^(139, 119, 120) et les follicules pileux ^(140, 141). La PTHrP régulerait la croissance et la différenciation des kératinocytes, mais la signalisation intracellulaire diffère quelque peu des autres territoires comme le rein et l'os. En effet, l'activation du RPTH1 conduit à une augmentation de calcium cytosolique sans activation de l'adénylate cyclase ⁽¹⁴²⁾.

Ainsi, la PTHrP régulerait le développement et la formation du poil ^(1, 139, 143, 144). A cet égard, les antagonistes du RPTH1 sont actuellement testés en clinique pour retarder les alopecies déclenchées par la chimiothérapie anticancéreuse ⁽¹⁴⁵⁾.

Dans le sein et la glande mammaire

En 1988, Tiede et coll. ⁽¹⁴⁶⁾ montraient chez le rat que la succion induisait une augmentation rapide et transitoire de l'ARNm de la PTHrP et de protéine dans la glande mammaire en lactation. Cette augmentation de PTHrP est en fait induite par l'augmentation de prolactine dans le sérum suite à la succion. La PTHrP ainsi produite est sécrétée dans le lait, où elle est retrouvée à des concentrations 10000 fois plus élevées que dans la circulation ^(147, 33, 148, 149, 150). Il est apparu que cette augmentation de la concentration de PTHrP dans le lait était déterminante pour la durée de lactation ^(151, 152, 153, 154). Il est également important de signaler que l'augmentation de PTHrP est importante pour l'augmentation de la concentration de calcium dans le lait, ceci se faisant au détriment de la masse osseuse de la mère ⁽¹⁵⁵⁾. Trois grands rôles pour la PTHrP dans la glande mammaire ont pu être mis en évidence : (i) la PTHrP est impliquée dans le transport de calcium de la mère au fœtus, (ii) dans la régulation du débit sanguin mammaire et du tonus myoépithélial durant l'allaitement de part ses propriétés relaxantes sur les muscles lisses ^(156, 148), (iii) et également dans la croissance et le développement de la glande mammaire en-dehors de la période de lactation ⁽¹⁰⁰⁾.

Dans le poumon

La PTHrP jouerait un rôle dans la production de surfactants par les cellules alvéolaires de type II. La PTHrP endogène exercerait également un effet inhibiteur sur la croissance et la différenciation des cellules de type II par une voie auto/paracrine ⁽¹⁵⁷⁾. Des travaux récents suggèrent l'implication des leptines dans la stimulation paracrine de la maturation des cellules de type II par la PTHrP ⁽¹⁵⁸⁾.

Dans le foie

De nombreuses études ont rapporté la présence de PTHrP dans le foie ^(159, 105, 160). Ainsi Campos et coll., ont observé un fort marquage au niveau des hépatocytes de rats fœtaux, et ce plus particulièrement au 18^{ème} jour de gestation alors qu'elle est beaucoup plus marginale chez l'adulte ⁽¹⁵⁹⁾. Cette présence de PTHrP dans les hépatocytes est également retrouvée dans les fœtus humains ⁽¹⁰⁴⁾ supportant la thèse que la PTHrP pourrait jouer un rôle régulateur de la

différenciation et de la prolifération des hépatocytes ^(161, 162, 163), bien que cet effet reste encore à être démontré. La PTHrP pourrait être réexprimée au cours de la régénération hépatique et participer à la capacité du foie à se régénérer ⁽¹⁾.

Dans le système endocrine

Chez l'homme et le rat, la PTHrP immunoréactive est décelée dans de nombreux tissus endocriniens chez l'homme et le rat, incluant le pancréas, les glandes thyroïde et parathyroïdiennes, les glandes surrénales, les testicules, la prostate et les ovaires. Bien que le rôle de la PTHrP ne soit pas connu dans la plupart des composantes de ce système, les données obtenues dans le pancréas et les glandes parathyroïdiennes révèlent à nouveau l'implication de la PTHrP dans la croissance cellulaire. Ainsi, au niveau des glandes parathyroïdiennes, bien qu'en infime quantité, la concentration en PTHrP est 10 fois plus importante chez le fœtus que chez l'adulte ⁽¹⁶⁴⁾. Elle y jouerait un rôle majeur dans la régulation de la sécrétion de calcium durant la gestation ⁽¹⁶⁵⁾, son organe cible étant le placenta où elle intervient au niveau du transport calcique materno-fœtal ⁽¹⁾. La PTHrP y exercerait également un effet anti-prolifératif et un effet stimulateur de la libération de PTH sur les cellules oxyphiles. Dans le pancréas, la PTHrP et son récepteur sont exprimés au niveau des îlots de Langerhans par les cellules α , β , δ et PP qui produisent respectivement le glucagon, l'insuline, la somatostatine et le polypeptide pancréatique ^(115, 166). Une surexpression de PTHrP dans les cellules β , chez des souris transgénique, induisant une augmentation de la masse et du nombre des îlots pancréatiques produisant une hypoglycémie insulino-dépendante ⁽¹⁶⁷⁾. Dans la glande pituitaire, le marquage le plus intense est observé au niveau des cellules produisant la prolactine et l'hormone de croissance ⁽¹¹⁸⁾. Concernant la thyroïde, peu de données sont décrites. Il a été montré que la PTHrP est présente dans les cellules épithéliales folliculaires, sans que son rôle ait pu être déterminé ^(118, 161). Dans les glandes surrénales, la PTHrP est présente chez l'homme adulte au niveau du cortex et plus précisément dans les cellules de la zone réticulée, et à un moindre degré dans la zone glomérulée (cellules produisant l'aldostérone) ⁽¹¹⁸⁾. D'un point de vue fonctionnel, peu d'informations sont décrites concernant les effets de la PTHrP au niveau des surrénales, les ovaires et les testicules où la PTHrP a été décrite morphologiquement, sans qu'aucune fonction précise ait pu lui être attribuée à ce jour ⁽¹⁾.

5. La PTHrP dans le système cardiovasculaire et rénal (Fig. I.9)

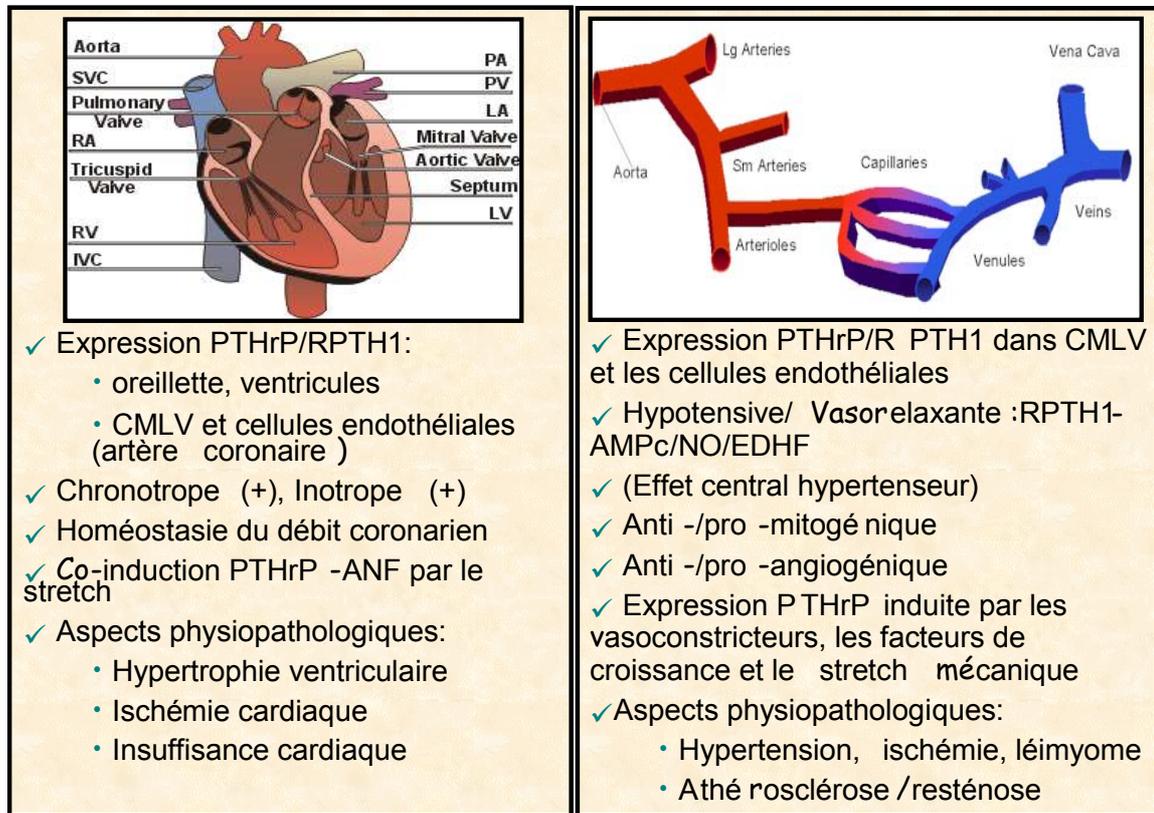


Figure I.9. La PTHrP dans le système cardiovasculaire.

Sont rassemblées dans cette figure les principales propriétés de la PTHrP dans le système cardiovasculaire normal et pathologique.

5.1 Effets cardiaques

La PTHrP dans le développement cardiaque

La PTHrP joue un rôle primordial dans le développement cardiaque. En effet, la genèse de souris doublement transgéniques surexprimant à la fois la PTHrP et le RPTH1 se trouve être létale dès le 9^{ème} jour du développement embryonnaire. Ces souris révèlent une hypertrophie du cœur, des contractions ventriculaires non synchronisées et des anomalies vasculaires. L'analyse histologique montre une réduction de la paroi des ventricules, l'absence de trabécules et de grands espaces entre les cardiomyocytes⁽¹⁶⁸⁾. De même, l'étude des souris invalidées pour le RPTH1, qui est létale *in utero* du fait de nombreuses malformations, notamment osseuses ont révélé une mort massive des cardiomyocytes suite à des

malformations mitochondriales. Ainsi chez ces souris, la principale cause de létalité est la dégénérescence du cœur ⁽¹⁶⁹⁾. Toutes ces données sont en faveur d'un rôle central de la PTHrP dans le développement et les fonctions cardiaques aussi bien chez le fœtus que chez l'adulte. Cependant, le rôle joué par ce système au niveau cellulaire et moléculaire dans le développement cardiovasculaire n'a pas encore été déterminé.

La PTHrP dans le cœur

Deftos et coll., ont montré que la PTHrP était exprimée dans le cœur à la fois dans les cardiomyocytes atriaux et à un degré moindre dans les cardiomyocytes ventriculaires ⁽¹⁷⁰⁾. Au niveau de l'atrium, la PTHrP est empaquetée dans des granules de sécrétion dense, colocalisée avec l'ANF (atrial natriuretic peptide).

Des travaux de plusieurs laboratoires ont montré que la plupart des effets cardiaques de la PTHrP ne sont pas mimés par la PTH. Par exemple, la PTHrP active l'adénylyl cyclase des cardiomyocytes ventriculaires avec comme conséquence un effet inotropes positifs. Cependant la PTH n'augmente pas l'amplitude de contraction des cardiomyocytes isolés et n'exerce pas d'effet inotrope positifs ⁽⁹⁾, suggérant une relation structure-activité un peu particulière pour la PTHrP sur les cardiomyocytes ventriculaires. En accord avec cette observation, la PTH(1-34) mais pas la PTHrP(1-34) stimule la PKC dans les cardiomyocytes ventriculaires. La différence entre les deux protéines pourrait être expliquée par la glutamine en position 29 de la structure primaire de la PTH qui remplace l'alanine chez la PTHrP ⁽⁹⁾. Ces observations suggèrent soit l'expression d'un type différent du récepteur soit un couplage particulier ligand/récepteur dans les cardiomyocytes.

En terme fonctionnel, la PTHrP ainsi exprimée dans le cœur exerce un effet chronotrope et inotrope positif. L'effet chronotrope positif s'exerce directement sur le nœud sinusal en facilitant la dépolarisation de ces cellules par une augmentation du courant I_f , réduisant ainsi la durée entre deux potentiels d'action ⁽¹⁷¹⁾.

L'effet inotrope de la PTHrP serait quand à lui indirect du fait d'une vasodilatation des artères coronaires, conduisant à une meilleure oxygénation du cœur ⁽¹⁷²⁾. En effet, l'effet inotrope positif de la PTHrP n'est pas observé sur des préparations de cœur *in vivo* dans des conditions où le débit coronarien est maintenu maximal par l'utilisation de donneurs de NO ⁽¹⁷²⁾. Le fait que les CMLV et les cellules endothéliales coronariennes expriment la PTHrP, amène la question de savoir si la libération locale de PTHrP affecte les fonctions cardiaques. Lorsque les cellules endothéliales coronariennes sont maintenues en culture statique, elles ne libèrent pas de PTHrP ⁽¹⁷³⁾. Cette observation pouvait être prise comme un indicateur que les

forces mécaniques générées par le flux sanguin (pression hydrostatique et/ou shear stress) contribuent à la libération de PTHrP à partir de ces cellules. Cela a récemment été démontré aussi bien *in vitro* sur des préparations de cœur isolés de rats que sur les cellules endothéliales coronariennes isolées et exposées à des déformations cycliques et *in vivo* chez le porc anesthésié ⁽¹⁷³⁾. Dans cette étude la libération de PTHrP était corrélée à l'augmentation du débit coronarien dans les préparations de cœur isolés et *in vivo* et, de la même manière, la libération de PTHrP des cellules endothéliales coronariennes en culture était corrélée à l'augmentation des déformations imposées aux cellules, indiquant que les forces mécaniques induites par le débit sanguin sont à l'origine d'une libération constante de PTHrP dans la circulation cardiaque. Ces résultats sont importants puisqu'ils montrent que la PTHrP participe à l'homéostasie du débit coronarien.

La PTHrP dans les pathologies cardiaques :

Hypertrophie ventriculaire

L'angiotensine II est connue pour stimuler l'expression de la PTHrP dans les CMLV. Etant donné que l'angiotensine II joue un rôle important dans la progression de l'hypertrophie ventriculaire, on peut spéculer que l'angiotensine II induit également l'expression ventriculaire de la PTHrP, qui pourrait alors agir comme un agent pro-hypertrophique. Certaines évidences pour un rôle pivot de la PTHrP au cours de l'hypertrophie ventriculaire viennent d'expériences réalisées sur les cardiomyocytes isolés. Dans ces cellules, la PTHrP exerce un effet hypertrophique qui inclut l'activation de la PKC par son domaine C-Terminal et de certaines kinases conduisant à l'accélération de la synthèse protéique et à la ré-expression de certaines protéines fœtales ^(174, 175). Cependant, des études récentes ont montré que le TGF β exogène sur les cellules endothéliales coronaires de rat et le TGF β endogène chez les souris transgéniques et chez le rat hypertensif, exerce un effet régulateur négatif sur l'expression de la PTHrP, un effet qui n'est pas corrélé avec l'hypertrophie cardiaque ⁽¹⁷⁶⁾. D'autres études seront nécessaires pour préciser le rôle joué par la PTHrP au cours de l'hypertrophie cardiaque.

L'insuffisance cardiaque

Des travaux d'Ogino et coll. ⁽¹⁷⁷⁾ ont récemment mis en évidence que les taux plasmatiques de PTHrP sont significativement augmentés chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque congestive. Pour ce faire, les taux plasmatiques de PTHrP ont été mesurés chez 64 patients atteints d'insuffisance cardiaque et ont montré une concentration en PTHrP significativement

plus élevée. Une corrélation entre la PTHrP carboxy-terminale et les taux plasmatiques de norépinéphrine, de l'ANF, l'angiotensine II et l'endothéline I a été mise en évidence. Une corrélation a également été trouvée entre les taux plasmatiques de PTHrP intacte et la fraction d'éjection cardiaque. Les concentrations plasmatiques de PTHrP mesurées au niveau du sinus coronarien étaient supérieures à celles mesurées dans l'arc aortique chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque congestive alors que ces taux étaient identiques chez les sujets contrôles. Cette étude montre que la PTHrP est produite par le myocarde et est élevée chez les patients insuffisants cardiaques mais suggère également que la PTHrP puisse participer à la modulation des performances cardiaques au cours de cette pathologie.

L'hypoxie et l'ischémie cardiaque

Les cellules endothéliales coronariennes libèrent de la PTHrP lorsque leur réserve en énergie est réduite et de la PTHrP est libérée par le cœur perfusé *in vitro* dans des conditions d'hypoxie ⁽¹⁷³⁾. Ces observations suggèrent que la libération de PTHrP par le cœur dans les conditions d'hypoxie est due au moins en partie à une libération par les cellules endothéliales et qu'elle y exercerait un rôle de modulateur des fonctions ventriculaires. Les mécanismes sous-tendant cette libération de PTHrP ne sont pas connus. Il est intéressant de noter que des travaux de Garcia-Ocana et coll. ⁽¹⁷⁸⁾ montraient qu'en condition hypoxique, l'expression de la PTHrP était stimulée dans les cellules épithéliales proximales. La PTHrP jouait alors un rôle mitogénique sur ces cellules, suggérant une implication de la PTHrP dans la réponse proliférative après déplétion des cellules en énergie. Ces résultats pourraient ainsi suggérer que la PTHrP puisse jouer un rôle similaire dans des conditions d'ischémie cardiaque.

En résumé, la PTHrP apparaît comme un régulateur important des fonctions et performances cardiaques. Cette conclusion est basée sur ses effets cardiaques à savoir inotropes et chronotropes positifs et sur son action sur le débit coronarien. Ces effets sont au moins en partie distincts de ceux de la PTH, suggérant que les effets de la PTHrP sur le cœur lui sont spécifiques ce qui diffère de ce qui est connu dans les autres cibles tissulaires de la PTH/PTHrP.

5.2 Effets hémodynamiques

Effets hypotenseurs/vasodilatateurs

La PTH est connue depuis longtemps pour exercer des effets sur le système cardiovasculaire. Au début des années 1900, les études de Collip et Clark ⁽¹⁷⁹⁾ ont montré que l'injection systémique chez le chien d'extraits des glandes parathyroïdiennes diminuait la pression artérielle systémique ⁽¹⁷⁹⁾. Depuis ces travaux, de nombreuses études sont venues établir le concept selon lequel la PTH exerce des activités hypotensives et vasodilatatrices et des effets cardiaques ^(1, 9, 28, 46, 175, 180). Cependant, bien que les effets cardiovasculaires de la PTH soient sans équivoques, leur signification physiologique est longtemps restée énigmatique. En effet, les concentrations plasmatiques physiologiques de la PTH sont de l'ordre de 1 à 10 pM soit 100 à 1000 fois plus faibles que les potentialités moyennes rapportées dans ces tissus. Il a ainsi été difficile de comprendre comment les taux physiologiques de PTH, synthétisés uniquement par les glandes parathyroïdiennes étaient susceptibles d'affecter le tonus cardiovasculaire. Les observations que les patients souffrant d'hyperparathyroïdisme primaire ont des taux élevés de PTH circulantes mais une pression artérielle augmentée qui retourne à la normale après parathyroïdectomie, laissent également perplexe quant à la possibilité d'un rôle relaxant pour la PTH. La découverte de la PTHrP en 1987 a permis de soulever le voile sur les interactions de la PTH avec le système cardiovasculaire et il est apparu très vite que c'est la PTHrP, et non la PTH, qui constitue le ligand endogène des actions mises en évidence initialement pour la PTH sur les muscles lisses, qu'ils soient vasculaires ou extra-vasculaires. Ceci s'est révélé vrai dans tous les sites d'actions dits non traditionnels de la PTH regroupant l'ensemble des organes hormis l'os et le tubule rénal qui eux constituent les sites d'action dits traditionnels de la PTH, où il existe une réelle action physiologique à l'origine des propriétés hypercalcémiantes et hypophosphaturiques de la PTH.

Les études menées durant la dernière décennie ont permis de mieux comprendre les fonctions physiologiques normales de la PTHrP. A côté de ses rôles dans le développement, la PTHrP est produite par le muscle lisse où la protéine fonctionne comme un régulateur de la contractilité et de la prolifération cellulaire. La PTHrP immunoréactive est ainsi détectée dans les muscles lisses extra-vasculaires incluant l'utérus, la vessie, le système gastro-intestinal, l'estomac, le poumon, la trachée, la prostate, les muscles caverneux de la verge et les muscles érecteurs du poil chez diverses espèces animales, ainsi que dans l'oviducte de la poule avant la ponte ^(1, 9, 28, 46, 181). La PTHrP pourrait jouer entre autre, un rôle de facteur de compliance dans

ces divers organes. La PTHrP est également exprimée dans tous les lits vasculaires testés à ce jour chez de nombreuses espèces animales. La protéine est produite de manière prédominante dans le muscle lisse des vaisseaux bien que son expression ait également été montrée dans les cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo*. La PTHrP a été montrée comme mimant parfaitement l'ensemble des propriétés hypotensives et vasorelaxantes de la PTH dans tous les lits vasculaires testés incluant le cœur, le rein, le placenta, et la glande mammaire ^(1, 9, 28, 46). Dans ces travaux, la PTHrP exerce ses effets via son interaction avec le RPTH1. A ce niveau, il est important de signaler que les effets relaxants de la PTHrP et de la PTH sont obtenus uniquement avec les fragments contenant la partie N-terminale des protéines (fragments N-terminaux et protéine native) définissant une spécificité structurale pour l'action vasorelaxante contenue dans la région structurellement homologue entre la PTH et la PTHrP. Le RPTH1 est exprimé dans les lits vasculaires, et la relaxation d'anneaux aortiques en réponse aux fragments N-terminaux de la PTHrP, s'accompagne d'une augmentation de l'AMPc ^(1, 9, 28, 46, 182, 183). La relaxation en réponse à la PTH de bandelettes aortiques *in vitro* est potentialisée par les inhibiteurs de phosphodiesterase et par la forskoline ^(184, 185, 186, 187). La stimulation de la PKA par l'AMPc est associée à une réduction du calcium cytosolique et à une atténuation de l'activité de la chaîne légère de la myosine ⁽¹⁸⁸⁾. Ces résultats ont révélé la dépendance vis-à-vis du système adénylyl cyclase des effets vasorelaxants et vasodilatateurs de la PTH/PTHrP.

A côté de la voie de l'AMPc, d'autres voies ont également été impliquées dans les actions vasorelaxantes de la PTH et de la PTHrP. Déjà en 1971, les travaux de Parsons et Robinson ⁽¹⁸⁹⁾ suggéraient une intervention du calcium dans l'action vasculaire de la PTH. Ces auteurs constataient une diminution du calcium 45 dans les tissus non calcifiés (muscle, intestin, foie, peau), dix minutes après administration intraveineuse simultanée de calcium radioactif et de PTH. Quelques années plus tard, Schleiffer et coll. ⁽¹⁹⁰⁾ évaluèrent l'impact de l'hormone sur les flux transmembranaires de calcium et ont montré que l'administration de fortes doses d'extraits parathyroïdiens (1,0 unité USP/ml) détermine une dépression de l'influx et une augmentation de l'efflux de calcium, avec pour effet la diminution du pool total de calcium intracellulaire. Les résultats obtenus par Pang et coll. ^(191, 192) et Yang et coll. ⁽¹⁹³⁾ avec la PTH suggère que l'hormone agit par une inhibition de l'entrée du calcium dans les CMLV. Par conséquent, l'hormone se comporterait comme un inhibiteur calcique. D'autres auteurs depuis, ont conforté la propriété de la PTH à agir comme un inhibiteur calcique sur divers lits vasculaires ^(194, 195). Cette propriété peut constituer l'un des mécanismes par lequel PTH et

PTHrP antagonisent les effets vasculaires d'agents vasoconstricteurs tels que l'angiotensine II. Dans le même ordre d'idée, il a également été montré que la PTH-(1-34) inhibe la contraction et l'entrée de calcium 45 induite par la vasopressine dans les CMLV par un mécanisme AMPc-dépendant ^(191, 192, 193).

L'adénylyl cyclase et les flux transmembranaires du calcium ne constituent que deux aspects des mécanismes rendant compte de l'action vasculaire de la PTH/PTHrP. Les travaux au sein du laboratoire ont permis de montrer pour la première fois que l'action vasodilatatrice de la PTHrP implique également la voie de la NO synthase ⁽¹⁹⁶⁾. Dans ces études, nous avons pu montrer chez le lapin et le rat *in vitro* et *in vivo*, que l'action vasodilatatrice rénale de la PTHrP passe en partie via la stimulation de la voie de la NO synthase. Il est intéressant de mentionner que chez le lapin, la dépendance vis-à-vis du système NO synthase n'était pas additif avec la stimulation de la voie de l'adénylyl cyclase et était également obtenu après destruction de l'endothélium suggérant que la PTHrP vasodilate le rein via des interactions complexes entre les deux systèmes second messagers et indépendamment de la présence d'un endothélium intact. Très récemment, Kalinowski et coll. ⁽¹⁹⁷⁾ ont pu démontrer que les fragments amino-terminaux (1-34) de la PTH et de la PTHrP, à des concentrations nanomolaires, stimulent la libération de NO à partir des cellules endothéliales via la stimulation du RPTH1 indépendamment de la stimulation de la PKC mais dépendamment de la voie de l'AMPc et du système calcium/calmoduline. Ces résultats contrastent cependant avec l'étude réalisée récemment par Sutliff et coll. ⁽¹⁹⁸⁾ chez la souris où la relaxation de l'aorte de souris en réponse à la PTHrP est dépendante de l'endothélium mais indépendante de la voie de la NO synthase et mettent en évidence une nouvelle voie stimulée par la PTHrP qui est celle de la libération d'un facteur hyperpolarisant à partir de l'endothélium (EDHF, pour « endothelium-derived hyperpolarizing factor ») à l'origine de l'action relaxante de la PTHrP. Parallèlement, la relaxation de la veine porte par la PTHrP était indépendante de l'endothélium. Ce travail met ainsi en évidence une nouvelle voie de signalisation de la PTHrP au niveau vasculaire et conforte le fait que l'effet vasoréducteur de la PTHrP est non seulement dépendant de l'espèce animale considérée mais également du lit vasculaire considéré au sein de la même espèce.

Effets hypertenseurs

Tout aussi important sont les travaux qui rapportent que l'injection intracérébroventriculaire de la PTHrP chez le rat conscient augmente la pression artérielle ⁽¹⁹⁹⁾. Cet effet est inhibé par

un α -bloquant, documentant ainsi un effet presseur de la PTHrP mettant en jeu des voies sympathiques. La signification physiologique de cet effet de la PTHrP n'a pas été élucidée, mais s'oppose théoriquement à l'action hypotensive bien connue et bien documentée de la PTHrP endogène libérée localement ou injectée en systémique. La présence de PTHrP dans plusieurs régions du cerveau permet de suggérer que cette action pourrait jouer un rôle dans la régulation fine de la pression artérielle. Avec l'étude récente de Yamamoto et coll. ^(138, 200, 201) qui montre que l'injection intracérébroventriculaire de PTHrP(1-34) stimule l'expression de l'arginine vasopressine, un puissant vasoconstricteur, dans les noyaux supra-optiques de l'hypothalamus chez le rat conscient avec comme conséquence une augmentation des taux plasmatiques de ce vasoconstricteur, cela suggère que l'action centrale de la PTHrP est une propriété qu'il sera nécessaire de prendre en considération à l'avenir. Le fait que cet effet n'était pas mimé par la PTH et n'était pas antagonisé par un antagoniste des RPTH1 suggère que cette propriété de la PTHrP est unique et est obtenue via la stimulation d'un récepteur distinct du RPTH1, reconnaissant la région amino-terminale de la protéine. Il est clair que ces résultats intéressants nécessiteront d'être validés par d'autres expérimentations.

Il est intéressant de mentionner l'apport des souris transgéniques dans la compréhension des effets cardiovasculaires du couple PTHrP/RPTH1 chez l'animal entier. Les souris transgéniques surexprimant soit la PTHrP soit le RPTH1 dans les muscles lisses ont une pression artérielle systémique en accord avec les propriétés myo-relaxantes de la PTHrP dans ce tissu ^(202, 168). Les résultats obtenus suggèrent que la sur-expression locale de PTHrP non seulement désensibilise les lits vasculaires à l'action relaxante de la PTHrP mais réduit également la relaxation induite par l'acétylcholine et probablement à d'autres vasodilatateurs.

5.2.1 Effet sur l'hémodynamique rénale

Expression

Les études menées chez diverses espèces animales depuis les espèces primitives jusqu'à l'homme montrent que tous les compartiments fonctionnels du rein expriment la PTHrP (**Fig. I.10**). Ainsi, les explorations par immunohistochimie et immunofluorescence incluant les propres travaux du laboratoire ont permis de localiser son expression dans les tubules proximaux, distaux et collecteurs, la *macula densa*, les podocytes glomérulaires, la capsule de Bowman et l'ensemble de l'arbre vasculaire intrarénal ^(9, 97, 203, 204, 205, 206).

La présence de sites de liaison au niveau des tubules rénaux et des artéριοles glomérulaires isolées a été démontrée très tôt ⁽¹⁸³⁾. Au niveau rénal, le RPTH1 est transcrit à partir du promoteur P1, ce qui est spécifique de cet organe étant donné qu'il n'est actif dans aucun autre organe ⁽²⁰⁷⁾ suggérant qu'il existe à ce niveau une régulation spécifique du RPTH1. La localisation anatomique rénale détaillée de l'ARNm du R-PTH1 chez le rat a été étudiée par Lee et coll. ⁽²⁰⁸⁾ par les techniques d'hybridation *in situ* et par Northern Blot. Les auteurs ont constaté un marquage très intense des tubules proximaux contournés et droits, de la portion corticale de la branche ascendante large de l'anse de Henlé, des tubules contournés distaux et des podocytes glomérulaires. Par contre, il semble n'y avoir qu'un faible marquage dans la branche ascendante fine de l'anse de Henlé, dans la portion médullaire de la branche ascendante large de l'anse et dans les canaux collecteurs. La présence de transcrits du R-PTH1 dans ces régions tubulaires est en accord avec celle de la PTH et de la PTHrP. Par immunohistochimie sur des tissus de souris, Amizuka et coll. ⁽²⁰⁷⁾ montrent une expression étendue du R-PTH1 dans les cellules épithéliales corticales et médullaires. La surface des podocytes glomérulaires et les tubules collecteurs est également très marquée. Au niveau vasculaire, à la fois les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales expriment fortement le R-PTH1. Il est important de signaler ici que l'expression de plusieurs variants de l'ARNm du RPTH1 a été démontrée dans le rein suggérant que plusieurs isoformes du RPTH1 sont susceptibles d'exister dans cet organe. Cependant, la signification physiopathologique de l'existence de ces diverses isoformes n'a pas encore été élucidée.

Le rein, cible privilégiée de l'action relaxante de la PTHrP

Le lit vasculaire rénal est un des sites privilégiés des actions de la PTHrP sur les hémodynamiques régionales. En effet, le rein est l'organe où la densité des RPTH1, impliqués dans les réponses vasodilatatrices de la PTHrP, est la plus importante ^(57, 209). La PTHrP et la PTH se lient avec une haute affinité dans ces vaisseaux et de façon spécifique et saturable ⁽²¹⁰⁾. En injection intraveineuse, chez le volontaire sain ou chez le rat anesthésié, le lit vasculaire rénal est la première cible de l'action vasodilatatrice de la PTHrP(1-36) ^(211, 212). En effet, chez l'homme, la PTHrP (1-36) augmente de façon dose-dépendante le débit plasmatique rénal de plus de 50%, et n'induit qu'une très faible réponse vasodilatatrice sur les autres lits vasculaires régionaux et au niveau veineux. Enfin, aucun effet sur la pression sanguine artérielle moyenne n'a été noté dans cette étude aux doses utilisées de PTHrP (0,9 à 14,9 nmol.min⁻¹) ⁽²¹²⁾. Cette puissante action vasodilatatrice sélective sur les vaisseaux rénaux pourrait avoir une valeur thérapeutique, notamment dans le cadre de traitements où le but est

justement de toucher préférentiellement le lit vasculaire rénal, sans influencer le versant systémique.

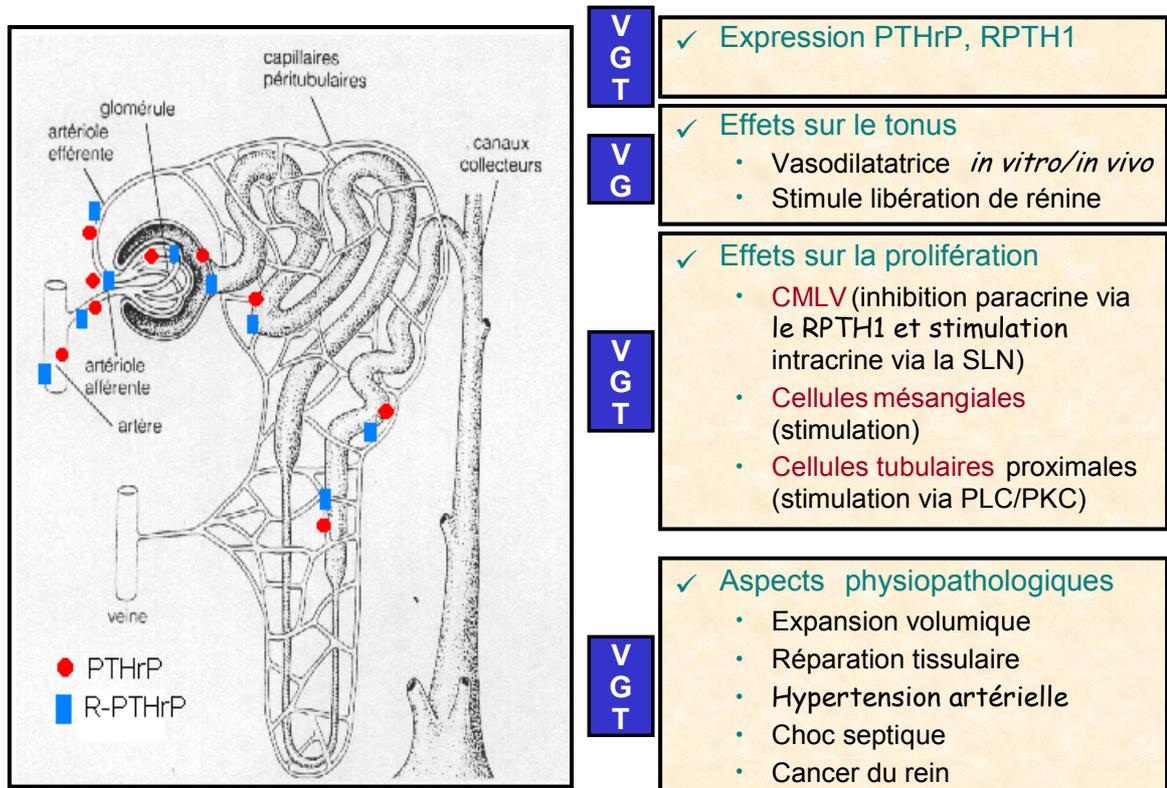


Figure I.10. La PTHrP dans le rein.

Sur le schéma de gauche sont représentés les sites d'expression de la PTHrP (rond rouge) et du RPTH1 (rectangle bleu) le long du néphron. La PTHrP et le RPTH1 sont exprimés dans les trois compartiments tissulaires du rein : les vaisseaux intrarénaux (V), les glomérules (G), (cellules mésangiales et podocytes) et les tubules (T). La PTHrP exerce des actions relaxantes sur les vaisseaux et les glomérules (V et G) et manifeste des actions anti- et/ou pro-mitogénique dans les trois compartiments V, G et T. Enfin, le système PTHrP/RPTH1 est impliqué dans la pathogenèse de diverses atteintes rénales par ses actions sur le tonus et/ou la prolifération des cellules constituant les trois compartiments tissulaires.

Actions sur le tonus glomérulo-vasculaire

Les propriétés relaxantes de la PTHrP(1-36) au niveau rénal ont été démontrées sur l'artère rénale isolée de lapin ⁽²¹³⁾, le rein isolé perfusé de diverses espèces animales (rat, lapin) ^(196, 214, 215) et les artérioles rénales isolées de rat ⁽²¹⁶⁾. Dans le modèle du rein hydronéphrotique de rat, permettant la visualisation *in situ* des artères intrarénales la PTHrP(1-36) vasodilate les vaisseaux préglomérulaires avec des effets plus marqués sur les artères interlobulaires et les artérioles afférentes et augmente le débit sanguin rénal ⁽²¹⁷⁾. Chez le rat normal anesthésié, l'infusion intrarénales de PTHrP(1-36) augmente le débit sanguin rénal, le taux de filtration glomérulaire et la diurèse ⁽²¹⁸⁾. Chez l'homme, à des doses n'affectant pas la pression

artérielle systémique, la PTHrP augmente de plus de 50% le débit plasmatique rénal, faisant de la PTHrP un des agents vasodilatateurs les plus puissants au niveau du rein. La PTH(1-34) a été rapportée comme étant équipotente à la PTHrP(1-36) ^(214, 219, 220) et ses effets vasodilatateurs sont inhibés par les antagonistes connus des RPTH1, montrant que les actions vasodilatatrices rénales des peptides sont obtenues par interaction avec les RPTH1. Il en résulte une stimulation de l'adénylyl cyclase avec production d'AMPc ^(214, 203). Les études du laboratoire chez le lapin ont révélé qu'à côté de l'AMPc la stimulation de la NO synthase est également impliquée dans la vasodilatation rénale mais indépendamment de la présence d'un endothélium intact ^(203, 196).

En dépit des propriétés vasodilatatrices rénales puissantes de la PTHrP, sa fonction physiologique n'est pas complètement élucidée. Les antagonistes des RPTH1 n'affectent pas le débit sanguin rénal basal ni chez l'animal anesthésié ni dans le modèle du rein isolé perfusé que les animaux soient normotendus ou hypertendus, suggérant que la PTHrP n'affecte pas le tonus vasculaire rénal dans les conditions basales ^(214, 215, 221). Les récents résultats du laboratoire supportent un rôle aussi bien tonique que trophique pour le système PTHrP/RPTH1 au cours de l'hypertension génétique chez le SHR, le modèle animal de l'hypertension essentielle humaine. L'observation importante faite chez les souris transgéniques surexprimant la PTHrP ou le RPTH1 dans le tissu musculaire lisse ^(168, 202) est une réduction de la pression artérielle systémique, suggérant que le système PTHrP/RPTH1 est capable de réduire la résistance vasculaire.

Il est également intéressant de mentionner que les podocytes expriment également la PTHrP et le RPTH1. Ainsi, des études récentes ont montré dans les podocytes en culture que la PTHrP(1-36) active la voie de l'adénylyl cyclase/AMPc mais pas celle du calcium intracellulaire via son interaction avec le RPTH1 ⁽²²²⁾. Cependant, peu de choses sont connues à ce niveau, tant au niveau de ses fonctions qu'au niveau de la stimulation de son expression.

Action sur la libération de rénine

Notre laboratoire a également joué un rôle pionnier dans la mise en évidence des propriétés stimulatrices de la rénine de la PTH et de la PTHrP directement à partir des cellules juxtaglomérulaires ^(221, 223, 224, 225). Dans ces études, la potentialité de la PTH était inférieure à celle de la PTHrP d'environ une décade n'allant pas dans le sens d'une interaction avec le RPTH1. Le paradoxe calcique, qui veut que ce soit une diminution du calcium intracellulaire et non pas une augmentation qui stimule la sécrétion, s'est également révélé être vrai pour la

libération de rénine induite par la PTH et la PTHrP. Il est intéressant de mentionner que la *macula densa*, qui participe au contrôle de la libération rénale de rénine, exprime également la PTHrP⁽²⁰³⁾ allant là aussi dans le sens d'une implication de la PTHrP dans le contrôle de la libération de rénine. Enfin, étant donné que les vasoconstricteurs et les forces mécaniques stimulent l'expression de la PTHrP, la PTHrP pourrait agir pour limiter l'inhibition de la libération de rénine en réponse aux agents vasoconstricteurs et aux forces mécaniques.

5.3 Effets trophiques

CML rénovasculaires

Très peu d'études concernent la recherche de l'action de la PTHrP sur la prolifération des CMLV intrarénales. En réalité, seuls les travaux émanant de notre laboratoire ont permis de définir certaines propriétés de la PTHrP sur la prolifération de ces cellules. Le laboratoire a développé une technique permettant l'obtention des CMLV provenant des artères intrarénales, essentiellement des artères arciformes et interlobulaires chez le rat⁽²²⁶⁾. Cela dans le but primordial de pouvoir bénéficier de cellules provenant des vaisseaux qui sont justement ceux affectés par l'hypertrophie/hyperplasie au cours de l'hypertension génétique chez l'homme et l'animal, et qui sont responsables du maintien d'une pression artérielle élevée dans cette pathologie. L'obtention de ces cellules nous a permis ainsi d'étudier le comportement de ces cellules en culture et notamment en terme de prolifération en réponse à la PTHrP exogène et endogène, aussi bien sur les cellules obtenues de rats normotendus que de rats hypertendus ou au cours du stretch mécanique qui sera développé plus loin. Le laboratoire a pu montrer grâce à ce modèle que le schéma de régulation auto/paracrine et intracrine observé antérieurement dans les CMLV A10⁽²²⁷⁾ était entièrement transposable aux cellules rénovasculaires issues de rats normotendus. Par contre, et de manière très intéressante les effets auto/paracrine et intracrine observés chez le rat normotendu étaient inversés dans les cellules issues de rat hypertendus SHR.

Cellules mésangiales

Malgré la controverse existante concernant l'expression de la PTHrP dans les cellules mésangiales et le type de récepteur à la PTHrP exprimé par ces cellules, quelques publications ont révélé que la PTHrP exerce une action proliférative sur ces cellules chez diverses espèces incluant l'homme^(204, 228, 229). Ainsi, dans leur étude Soifer et coll.⁽²²⁸⁾ montraient que la PTHrP stimule deux à trois fois la prolifération des cellules mésangiales de rat en culture. La

PTHrP exercerait ses effets via la stimulation d'un récepteur couplé aux protéines G et via la stimulation de la production d'AMPC⁽²²⁹⁾. Cependant, l'étude par RT-PCR de l'expression du RPTH1 n'a pas confirmé l'existence du RPTH1 suggérant que la PTHrP exerce ses effets par stimulation d'un récepteur distinct. Quoi qu'il en soit et quel que soit le récepteur mis en jeu, ces études révèlent que les cellules mésangiales sont sensibles à l'action proliférative de la PTHrP par une voie auto/paracrine. L'implication d'une voie intracrine n'a quant à elle jamais été recherchée.

Cellules tubulaires

Les cellules tubulaires expriment la PTHrP et le RPTH1. Dans leurs travaux, Garcia-Ocana et coll.^(230, 178) ont montré que la PTHrP stimule fortement la prolifération des cellules tubulaires proximales en culture de diverses espèces. Cette action était inhibée par les antagonistes connus des RPTH1 et par les anticorps anti-PTHrP, soulignant le caractère auto/paracrine de l'action proliférative de la PTHrP. L'implication de la voie de la PKC dans l'action proliférative de la PTHrP dans ce type cellulaire a également pu être démontrée.

En résumé, le rein constitue une cible privilégiée des actions de la PTHrP. La PTHrP et le RPTH1 sont exprimés dans les trois compartiments vasculaires, glomérulaires et tubulaires du rein. La PTHrP exerce des actions sur le tonus vasculaire et glomérulaire du rein. De manière très intéressante, les trois compartiments du rein sont également sensibles aux effets anti-prolifératifs et/ou prolifératifs de la PTHrP. Ces propriétés sont importantes car elles confortent l'existence d'un rôle pour la PTHrP dans le maintien des fonctions rénales.

6. La PTHrP et les cellules musculaires lisses

6.1 Expression

Les études menées durant la dernière décennie ont permis de mieux comprendre les fonctions physiologiques normales de la PTHrP. A côté de ses rôles dans le développement, la PTHrP est produite par le muscle lisse où la protéine fonctionne comme un régulateur de la contractilité et de la prolifération cellulaire. La PTHrP immunoréactive est ainsi détectée dans les muscles lisses vasculaires et extra-vasculaires incluant l'utérus, la vessie, le système

gastro-intestinal, l'estomac, le poumon, la trachée, la prostate, les muscles caverneux de la verge et les muscles érecteurs du poil chez diverses espèces animales ainsi que dans l'oviducte de la poule avant la ponte^(1, 9, 45, 46, 181). La PTHrP pourrait jouer entre autre, un rôle de facteur de compliance dans ces divers organes. La PTHrP est également exprimée dans tous les lits vasculaires testés à ce jour chez de nombreuses espèces animales. La protéine est produite de manière prédominante dans le muscle lisse des vaisseaux bien que son expression ait également été montrée dans les cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo*.

Comme il a été mentionné ci-dessus, la PTHrP et le RPTH1 sont exprimés dans l'ensemble du système vasculaire aussi bien dans les CMLV que les cellules endothéliales que ce soit dans les artères, les veines et les lymphatiques^(1, 9, 45). La nature « cytokine-like » de la PTHrP est illustrée par l'induction rapide et la disparition toute aussi rapide de l'ARNm de la PTHrP après stimulation des CMLV par le sérum rappelant ce qui est connu pour cytokines et des gènes précoces^(1, 9, 45, 46).

Stimulation par le sérum et les vasoconstricteurs

Les travaux de Pirola et coll, ont montré que l'ajout de 10% de sérum au milieu de culture des CMLV stimule rapidement l'expression de l'ARNm de la PTHrP⁽²³¹⁾. Ainsi, l'angiotensine II stimule l'expression de la PTHrP avec un pic d'expression de 6 à 10 fois après 4h. L'étude de la transcription par « nuclear run off » a montré une augmentation de 3 fois de la transcription du gène de la PTHrP 1 heure après traitement par l'angiotensine II. Parallèlement à cette augmentation de la transcription, des expériences sur la stabilité de l'ARNm de la PTHrP ont révélé une stabilisation de l'ARNm, sa demi-vie passant alors de 56 min à 150 min. Cette stabilisation de l'ARNm de la PTHrP est possible du fait de la présence de motifs AUUUA dans la région 3' non traduite, une séquence impliquée dans la déstabilisation des ARNm des gènes précoces et cytokines. Il est également intéressant à signaler ici qu'il existe une région répondant au sérum, localisée sur le gène de la PTHrP entre -1.05 et -0.3kb du site d'initiation de la transcription. Cette augmentation de l'expression de la PTHrP est partiellement dépendante de la stimulation des produits de la cyclo-oxygénase et de l'activation de la PKC⁽²³¹⁾.

Ainsi, l'expression de la PTHrP est stimulée par les vasoconstricteurs tels que l'angiotensine II, l'endothéline, la sérotonine, la noradrénaline, la bradykinine et la thrombine pour ne citer que les plus puissants.

Stimulation par les forces mécaniques

La PTHrP est également induite dans les CML en réponse aux forces mécaniques s'exerçant sur la paroi des vaisseaux ou des organes creux ^(1, 232, 233, 234, 235, 236). Sur les muscles lisses extravasculaires, de nombreux travaux ont montré qu'une distension mécanique de l'organe induisait une augmentation de l'expression de la PTHrP. Daifotis et coll. ⁽²³⁷⁾, ont ainsi observé qu'au cours de la grossesse, l'expression de la PTHrP augmente dans l'utérus pour atteindre un pic 48h avant l'accouchement. Physiologiquement, cette augmentation de PTHrP correspond au moment où l'utérus arrête de grandir alors que le fœtus continue à grandir. Il en résulte une augmentation de l'étirement du muscle lisse utérin, qui est à l'origine du pic d'expression de la PTHrP. Des expériences d'étirement du muscle lisse utérin par gonflement d'un ballon ou une distension avec un cathéter augmentent considérablement l'expression de PTHrP suggérant que le pic de PTHrP avant l'accouchement est dû à une mécanotransduction ⁽²³⁷⁾. Des résultats similaires ont été obtenus sur vessie, l'oviducte de poule, l'intestin, la trachée montrant qu'une distension mécanique stimulait l'expression de la PTHrP ^(232, 235, 238, 239, 240, 241, 242).

Au niveau vasculaire, les travaux de Noda et coll. ⁽²³³⁾ montraient que le stretch mécanique sur des CMLV aortiques en combinaison avec de l'angiotensine II induisait fortement l'expression de la PTHrP. Cependant, dans ces expériences, le stretch seul ou l'angiotensine II seul n'augmentait pas l'expression de la PTHrP. Les auteurs concluaient à un effet synergique entre le stretch mécanique et l'angiotensine II. Cette augmentation de l'expression de la PTHrP était dépendante de la PKC mais n'impliquait pas les canaux calciques mécanosensibles de la membrane plasmique ⁽²³³⁾. Au même moment, Pirola et coll., ⁽²³⁶⁾ montraient qu'une distension mécanique de l'aorte de rat par un gonflement d'un ballonnet ou l'oscillation du milieu de culture, reproduisant l'effet du flux sanguin sur la paroi des vaisseaux induisant une augmentation de l'expression de la PTHrP entre 2 et 24h avec ici aussi une potentialisation de cet effet en combinaison avec l'angiotensine II. L'ajout de 10^{-6} M de colchicine diminuait partiellement l'augmentation de l'expression de la PTHrP en réponse aux forces mécaniques, suggérant une implication du réseau microtubulaire dans la transduction du signal conduisant à la stimulation de l'expression de la PTHrP ⁽²³⁶⁾. Ainsi ces 2 travaux montrent qu'une distension mécanique des CMLV stimule l'expression de la PTHrP, qui jouerait alors un rôle de facteur de compliance ou d'un agent trophique impliqué dans le remodelage vasculaire. Cependant ce dernier aspect ne fut pas développé jusqu'à présent et nous y reviendrons longuement dans mes travaux dans l'exposé de mes travaux.

Stimuli pathologiques

L'expression de la PTHrP est également augmentée en réponse à des stimuli pathologiques comme l'athérosclérose, la resténose après angioplastie et l'hypertension artérielle ^(243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 233, 251, 236, 231, 252).

Athérosclérose et resténose après angioplastie

Les travaux de Nakayama et coll. ⁽²⁴⁸⁾ ont montré que les lésions athérosclérotiques surexpriment la PTHrP. Des marquages immunohistologiques pour la PTHrP ont été réalisés sur des coronaires de 76 patients atteints d'athérosclérose à différents stades. Les marquages ont montré une très forte surexpression de PTHrP dans les CMLV de ces lésions par rapport à des coronaires saines. Le taux de PTHrP était étroitement corrélé avec la sévérité et de sténose de ces lésions. Par ailleurs, Ozeki et coll., ⁽²⁵¹⁾ ont recherché par la technique de protection à la RNase et par hybridation *in situ* l'expression de la PTHrP dans les resténoses après angioplastie sur des coronaires de rat et d'homme. Les résultats montrent une surexpression de 4 à 6 fois de la PTHrP dans la néointima des lésions resténotiques par rapport aux portions saines. Ces résultats montrent clairement que les lésions vasculaires induisent l'expression de la PTHrP. Cependant, son rôle n'est pas encore clairement défini et nécessite des investigations supplémentaires.

Hypertension artérielle

L'hypertension artérielle stimule également l'expression de PTHrP. L'étude de Noda et coll. ⁽²⁵⁰⁾ chez les rats spontanément hypertendus (SHR) montrait par Northern Blot une surexpression d'environ 2,5 fois de PTHrP dans l'aorte à 18 semaines par rapport à son contrôle normotendu. Par contre à 4 semaines, un âge où l'hypertension n'est pas encore établie aucune différence n'est observée entre les différentes souches de rats. Le traitement avec un inhibiteur des récepteurs AT1 de l'angiotensine II diminuait la pression artérielle ainsi que le niveau d'expression de PTHrP. Cet effet est imputable à la diminution de la pression artérielle, donc des forces mécaniques, cependant nous ne pouvons exclure un effet synergique avec l'angiotensine II comme il a pu être démontré *in vitro*.

6.2 Voie de transduction dans les CMLV

Avec l'étude de Wu et coll. ⁽²⁵³⁾ montrant que ni la bPTH-(1-34) ni divers fragments N-, C-terminaux ou intermédiaires de la PTHrP n'ont d'effets détectables sur les taux de

calcium cytosolique dans une culture primaire de cellules aortiques de rat, ces données indiquent que différents mécanismes de transduction du signal existent parmi divers types de CMLV. De tels mécanismes divergents pourraient représenter un moyen par lequel la PTH et la PTHrP utilisent un récepteur commun pour assurer diverses fonctions (telles que la croissance, la différenciation cellulaire ou la vasorelaxation) dans différents types musculaires lisses vasculaires. Ainsi, de ces diverses études il ressort que si la PTH et la PTHrP sont capables d'inhiber l'entrée de calcium dans les CMLV de diverses origines, en revanche elle ne sont pas capables par elles-mêmes d'affecter les taux intracellulaires de calcium. Si on se rappelle que le RPTH1 est susceptible d'être couplé à l'adénylyl cyclase via les protéines Gs et Gi et à la voie de la PLC via la protéine Gq. Ces résultats suggèrent soit que le RPTH1 n'est pas couplé aux protéines Gq dans les CMLV soit que les protéines Gq ne sont pas en quantité suffisante dans les CMLV pour permettre à la PTHrP d'être couplée à la voie de la PLC. La réponse est venue des travaux de Maeda et coll. ⁽²⁵⁴⁾ qui ont montré en utilisant les CMLV de la lignée A10 que l'incapacité de la PTHrP à stimuler l'augmentation de calcium intracellulaire dans les CMLV est due à un manque de couplage du RPTH1 avec les protéines Gq dans les CMLV. En effet, après co-transfection des cellules A10 avec le RPTH1 et soit la protéine G α q, G α 11 ou G α 14, la PTHrP devenait capable de stimuler la voie de la PLC et d'augmenter les taux intracellulaires en IP3. Ces travaux démontrent que le RPTH1 est capable de stimuler la voie de la PLC via la protéine Gq dans les CMLV mais que les taux en protéine Gq sont insuffisants pour permettre à la PTHrP d'exercer des actions via la stimulation de cette voie dans les CMLV. Connaissant les propriétés relaxantes de la PTH et de la PTHrP sur les CMLV, ces résultats ne sont pas étonnants car une augmentation de calcium dans les CMLV est généralement accompagnée d'une contraction de ces cellules.

6.3 Effets sur la prolifération des CMLV

6.3.1 Inhibition autocrine/paracrine de la prolifération

Les données faisant état d'une stimulation de l'expression de l'ARNm de la PTHrP dans des cas pathologiques tels que l'athérosclérose ou la resténose après angioplastie suggèrent que la PTHrP pourrait jouer un rôle non-vasoactif notamment sur la régulation de la prolifération cellulaire. Comme je l'ai évoqué plus haut, les caractéristiques de l'ARNm de la PTHrP sont proches de celles observées pour les ARNm des cytokines et des protooncogènes suggérant un rôle pro-mitogénique de la PTHrP. En réalité, et à côté de leurs effets toniques,

les fragments N-terminaux de la PTHrP ainsi que ceux de la PTH et les formes natives des protéines ajoutées aux milieux de culture, inhibent de 30 à 40% la prolifération des CMLV quiescentes par interaction avec le RPTH1^(202, 255, 246). Les fragments intermédiaires et carboxy-terminaux sont inactifs⁽²⁴⁶⁾.

La PTHrP atténue la synthèse d'ADN stimulée par le sérum ou le PDGF ainsi que la migration dans des cultures primaires de CMLV aortiques. Cet effet est inhibé par la PTHrP(7-34), un antagoniste des RPTH1 montrant qu'il s'agit là d'une interaction auto/paracrine de la PTHrP avec son récepteur⁽²⁵⁵⁾. Cette inhibition est retrouvée dans les CMLV aortiques en culture⁽²⁵⁴⁾ et inhibe la prolifération des CMLV A10 transfectées avec le RPTH1 même en présence de sérum. Comme explicité ci-dessus, les effets anti-mitogéniques de la PTHrP requièrent la région N-terminale de la molécule et sont mimés par le DbAMPc et par la forskoline, suggérant la dépendance vis-à-vis du système adénylyl cyclase/AMPc de ses effets.

Dans leur travaux, Stuart et coll.⁽²⁵⁶⁾ ont recherché le mécanisme intime de l'effet anti-mitogénique de la PTHrP dans les CMLV A10. Dans cette étude, les investigateurs ont pu montrer que la PTHrP, en augmentant la production intracellulaire en AMPc induit un arrêt en milieu de phase G1 du cycle cellulaire. Cet effet était reproduit par le DbAMPc et induisait une augmentation de cycline D1 sans modifier les taux de sa kinase associée (cdk4) ou du couple cycline E / cdk2. Ce blocage en phase G1 était secondaire à l'inhibition de l'activité de la cycline D1 et à l'induction de l'expression de la protéine p27^{kip1} qui en retour inhibe la phosphorylation du produit du gène du rétinoblastome Rb, lequel libère normalement le facteur de transcription E2F qui stimule la synthèse des gènes nécessaires à la phase S.

Utilisant la méthode du FACS (« fluorescence-activated cell sorting »), Okano et coll.⁽²⁵⁷⁾ ont révélé que la PTHrP était enrichie en phase G2/M dans les CMLV, une caractéristique qui fut également observée dans la lignée cellulaire HaCat de kératinocytes humains et ce aussi bien au niveau du messenger de la PTHrP que de la protéine elle-même⁽²⁵⁸⁾. La PTHrP inhibe également d'environ 40% la migration des CMLV *in vitro* induite par le sérum ou par le PDGF via son interaction avec le RPTH1⁽²⁵⁵⁾. Ces données suggèrent que les effets de la PTHrP sur la prolifération et la migration des CMLV puissent avoir une signification physiopathologique *in vivo* dans les conditions où la prolifération et la migration des CMLV sont altérées.

Mécanisme de l'inhibition de la prolifération par la stimulation de l'AMPc

Le mécanisme par lequel l'AMPc va inhiber la prolifération cellulaire est bien documenté (**Fig. I.11**). Ainsi, la PTHrP interagit avec le RPTH1, un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G. Il en résulte une activation des protéines G α s et une formation d'AMPc par l'adénylate cyclase, qui sera dégradé plus tard par les phosphodiesterase (PDE). L'AMPc va alors activer la PKA constituée de 2 unités catalytiques et de 2 unités régulatrices. L'activation des sous unités catalytiques de la PKA va entraîner une phosphorylation de différentes cibles dans le cytosol, le cytosquelette, la membrane et le noyau contenant la séquence consensus X-Arg-Arg-X-Ser-X. A côté de cette activation de la PKA, l'AMPc peut également agir d'une manière PKA indépendante sur différents substrats en interagissant avec des facteurs d'échanges de nucléotides guanines : Epac1 et 2. Ceci est par exemple le cas pour la petite protéine G Rap 1 impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire ^(259, 259, 260) ou encore Ras. Ainsi, l'AMPc peut activer différentes petites protéines G d'une façon PKA-indépendante.

L'induction de la prolifération par des facteurs mitogéniques tels que le PDGF induisent 2 voies signalétiques majeures dans les CMLV au début de la phase G1 : une activation de la voie des MAPK/ERK et de la voie de la PI3K ⁽²⁶¹⁾. L'inhibition de la voie MAPK/ERK se fait par inhibition de l'activation de Raf par l'AMPc, il s'en suit une inhibition de la voie MAPK/ERK/MEK. L'activation de la voie de la PI3K est également cruciale pour la prolifération des CMLV ⁽²⁶²⁾. La PI3K se lie directement aux récepteurs des facteurs de croissances par son domaine SH2, son activation est requise pour la progression de la cellule en phase G1 ⁽²⁶³⁾ et active différentes serine/thréonine kinases dont la PKB/AKT, S6K1, P21... Cette voie est également inhibée par l'AMPc. La transition entre les phases G1 et S est gouvernée par de nombreux complexes cyclines/kinases dont les couples cycline D/cdk4 et cycline E/cdk2. Parmi les substrats connus de ces complexes se trouve le retinoblastome Rb qui une fois phosphorylé libère et active le facteur de transcription E2F induisant les gènes requis pour la réplication de l'ADN. A ce niveau, l'AMPc va inhiber la PI3K, laquelle est requise pour l'expression de la cycline D1 et pour l'activité du complexe cycline D1/cdk4 ⁽²⁶⁴⁾. Par ailleurs, l'inhibition de la PI3K induit la protéine inhibitrice p27kip1 par stabilisation post-transcriptionnelle ⁽²⁵⁶⁾ inhibant ainsi l'activité de la cdk2.

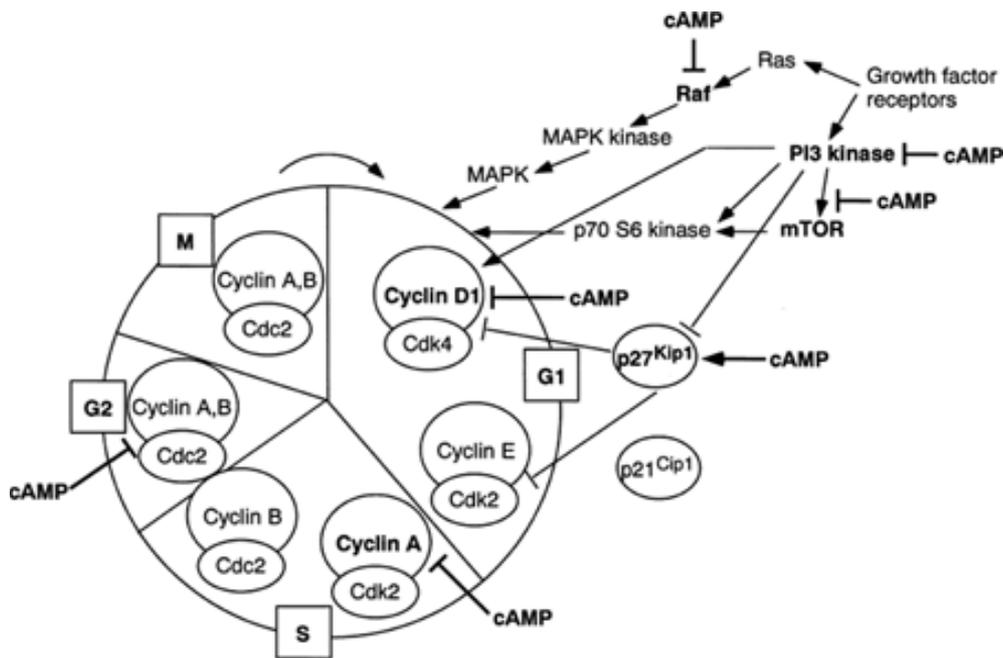


Figure I.11 : voie de signalisation de l'inhibition de la prolifération par l'AMPc

Sur ce schéma est représenté la voie mitogénique activée par les facteurs de croissances dans les CMLV. Les différents points d'inhibition de cette voie par l'AMPc sont représentés à la fois dans le cytoplasme et le noyau. Au niveau du cytoplasme, cette voie est inhibée au niveau de Raf, de la PI3K et de mTOR. Au niveau du noyau, différentes cdk sont inhibées par l'AMPc par dérégulation de certaines cyclines et induction d'inhibiteurs de cdk tel que p27kip1. (D'après Koyama, 2001⁽²⁶⁵⁾)

6.3.2 Stimulation intracrine

A coté de son inhibition par la voie autocrine/paracrine que je viens de détailler, la PTHrP stimule la prolifération de ces mêmes cellules via la translocation nucléaire de la protéine vers le noyau (**Fig. 12**). La mise en évidence de ce phénomène a été faite par Thierry Massfelder⁽²²⁷⁾ lors de son séjour post doctoral. Pour ce faire, des cellules A10, qui sont une lignée clonale de cellules aortiques de rat ont été transfectées avec la PTHrP(1-139) humaine. Ces clones présentaient une croissance de 3 à 5 fois supérieure aux cellules non transfectées. Cet effet fut dans un premier temps surprenant car les précédentes études montraient toujours que la PTHrP exerce un effet anti-mitogénique sur les CMLV par l'interaction avec le RPTH1 et la stimulation de la voie de l'AMPc/PKA. Différents fragments ont alors été testés dont les (1-36), (1-86), (1-108), (1-141), (38-94), (67-86), (107-138), et (109-138), ainsi que les PTH(1-34) et (1-84) pour leur capacité à modifier l'incorporation de la thymidine tritiée dans les cellules A10. Parmi ces peptides, et en accord avec la littérature, seuls ceux contenant la région N-terminale de la protéine inhibaient l'incorporation de thymidine avec une diminution de la densité cellulaire. Cet effet était maximum pour la PTHrP(1-36) et diminuait avec la longueur du fragment N-terminal. Les fragments dépourvus de la région N-terminale étaient

sans effet. Les connaissances de l'époque suggéraient alors soit qu'il existait des PTHrP structurellement différentes de celles testées ci-dessus qui pouvaient être responsables de la prolifération accrue des cellules transfectées, soit que la PTHrP surexprimée agissait selon un mode intracrine afin de stimuler directement la prolifération de ces cellules, grâce notamment à une SLN présente dans la région intermédiaire de la molécule dont la présence avait été décrite peu de temps auparavant ⁽²⁶⁶⁾. Des co-cultures cellules A10 sauvages et de cellules A10 transfectées avec la PTHrP ou le vecteur seul, des mises en culture de cellules A10 non transfectées dans un milieu conditionné provenant de cellules transfectées avec la PTHrP native, ont montrées que le phénotype prolifératif des cellules transfectées n'était pas le résultat d'une action auto/paracrine de la PTHrP. En effet, la prolifération des cellules A10 sauvages n'était affectée ni dans les expériences de co-culture ni dans celles utilisant le milieu conditionné des cellules transfectées avec la PTHrP.

Afin de tester l'hypothèse d'une action intracrine de la PTHrP, des études de mutagenèse dirigée ont été effectuées sur la région SLN 88-106, notamment des délétions des régions multibasiqes 88-91 et 102-106. La transfection de ces mutants dans les cellules A10 ont permis de démontrer de manière très intéressante non seulement que la séquence SLN est en réalité une séquence bipartite de localisation nucléaire (régions multibasiqes 88-91 et 102-106) mais également qu'elle est directement responsable de l'accélération du cycle cellulaire observée dans les cellules transfectées avec la PTHrP native. En effet, les clones obtenus des cellules A10 transfectées avec la PTHrP soit délétée de la région (88-91), soit de la région (102-106), soit délétée des deux régions multi-basiqes, ne montraient aucune accélération de leur prolifération. Au contraire ces clones proliféraient même plus lentement que les cellules contrôles, probablement en raison d'une sécrétion importante de PTHrP à activité anti-proliférative sur ces cellules. L'étude par immunofluorescence a révélé que la PTHrP était détectée dans le noyau dans 6 % des CMLV transfectées avec la PTHrP native contre 0.3 % dans les cellules contrôles non transfectées ou transfectées avec le vecteur seul. Ainsi, l'ensemble de ces résultats démontre que la PTHrP endogène est capable de stimuler la prolifération des CMLV par translocation nucléaire via une SLN bipartite dépendamment du cycle cellulaire. L'observation que le marquage nucléaire était observé principalement dans les cellules en division ou en voie de se diviser suggère que cette translocation nucléaire a lieu au niveau des phases G2/M du cycle cellulaire. Afin d'évaluer l'importance du ciblage nucléaire *in vivo*, des souris prégnantes homozygotes normales ou invalidées pour le gène de la PTHrP ont reçu en intra péritonéale de la bromodeoxyuridine (BrdU) au 19^{ème} jour de gestation, au cours des 6h qui précédaient leur sacrifice. Les embryons ont ensuite été traités

pour analyse histologique du marquage au BrdU afin de révéler les cellules qui étaient en mitose au cours de la période de marquage. Chez les embryons normaux, 87% des CML aortiques étaient marquées par le BrdU contre seulement 72% ($p < 0.05$) chez les embryons invalidés pour le gène de la PTHrP. Ces résultats révèlent que la PTHrP est requise *in vivo* pour la prolifération des CMLV aortiques durant la vie embryonnaire et fœtale et que l'effet prolifératif noyau-dépendant prédomine sur l'effet antiprolifératif RPTH1-dépendant.

Cependant, bien qu'il ait été montré que la PTHrP stimule la prolifération par voie intracrine, les mécanismes et les régions impliquées restaient inconnues. Les travaux de De Miguel et coll. ⁽²⁶⁷⁾ ont permis d'éclaircir le 2^{ème} point : des transfections des CMLV A10 ont été réalisées avec les différents fragments de PTHrP et il y pu être montré que la SLN était nécessaire et suffisante pour la translocation de la protéine vers le noyau, mais à elle seule, elle n'est pas capable de stimuler la prolifération. Cet effet est dépendant de la présence de la région C-Terminale de la protéine qui aurait des fonctions de transactivation pour stimuler la prolifération de ces cellules une fois dans le noyau.

Une récente étude de Fiaschi-Teash et coll. ⁽²⁶⁸⁾ a montré que la transfection par la PTHrP augmentait dramatiquement le nombre de cellules en phase S et G2/M du cycle cellulaire. Cet effet est dépendant de la phosphorylation de résidus serines et thréonines aux positions Ser¹¹⁹, Ser¹³⁰, Thr¹³² et Ser¹³⁸ de l'extrémité C-terminale de la PTHrP et est associé à la phosphorylation du rétinoblastome Rb, une protéine clé pour le passage de la phase G1 à S comme nous avons pu le voir précédemment.

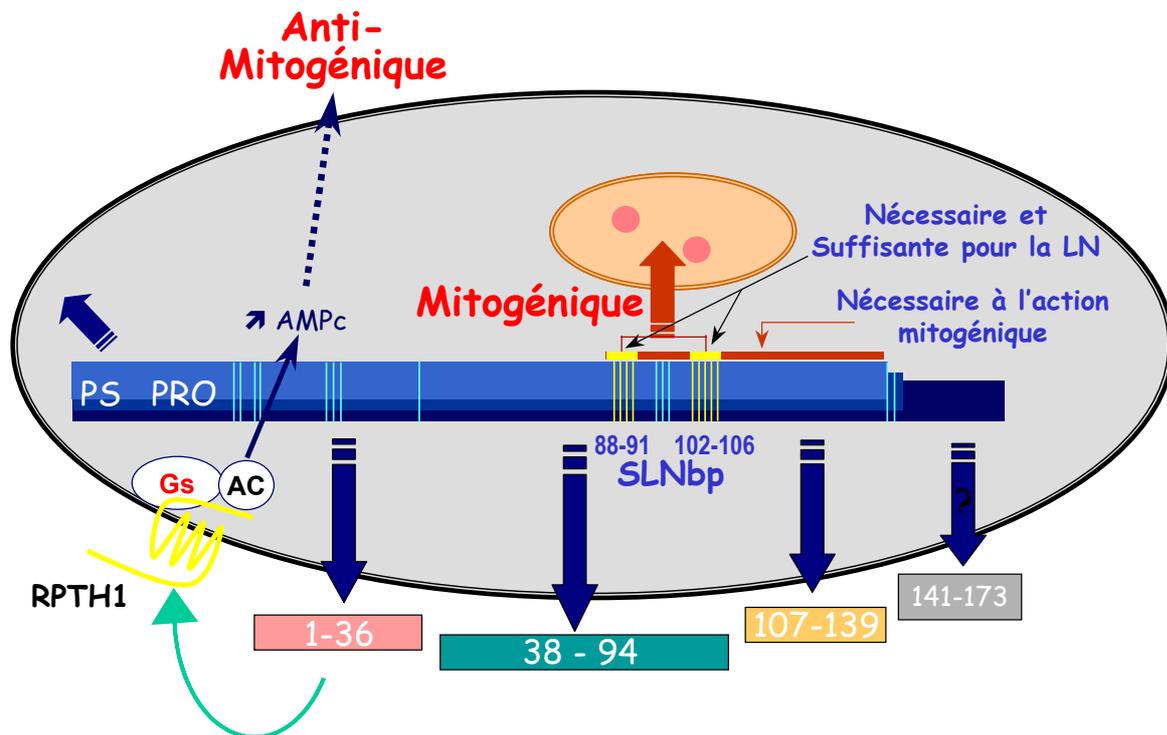


Figure I.12. Effet paradoxal de la PTHrP sur la prolifération des CMLV.

Lorsque la PTHrP emprunte la voie auto/paracrine, elle inhibe la prolifération des CMLV par son interaction avec son récepteur : le RPTH1 et stimulation de la production de l'AMPc (cf. **Fig. I.11**). D'autre part, la PTHrP stimule la prolifération par translocation nucléaire de la protéine vers le noyau via l'importine β et ceci grâce à sa séquence bipartite de localisation nucléaire. Il a récemment été montré que la partie C-Terminale est nécessaire pour cet effet mitogénique.

7. Mécanisme du ciblage nucléaire de la PTHrP

La compréhension des mécanismes par lesquels la PTHrP, à peine synthétisée, est capable d'accéder au cytoplasme et de là au noyau est actuellement un territoire de recherche très actif. Afin de pouvoir être ciblée vers le noyau, une protéine normalement destinée à être sécrétée comme la PTHrP doit soit être internalisée vers le cytoplasme une fois sécrétée et être importée dans le noyau soit ne pas être sécrétée du tout en court-circuitant l'une des étapes de la voie sécrétrice, et rester dans le cytoplasme en évitant les processus de dégradation afin de pouvoir être importée vers le noyau (**Fig. I.13**).

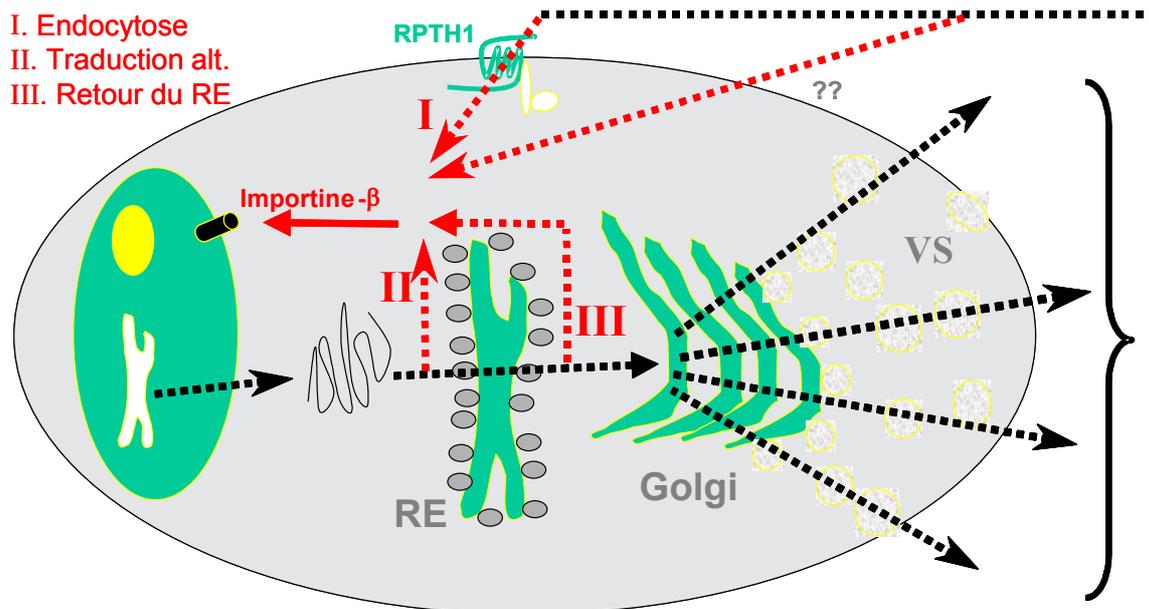


Figure I.13. Mécanismes hypothétiques du ciblage nucléaire de la PTHrP.

Trois voies ont été décrites pour expliquer comment la PTHrP, une protéine normalement destinée à être sécrétée, peut se retrouver dans le cytoplasme à l'issue de sa synthèse, et de là accéder au noyau pour y exercer ses actions dites intracines. La première voie (I) est celle de l'endocytose, qui décrit la possibilité pour la PTHrP, une fois sécrétée de retourner dans le cytoplasme soit via son récepteur, le RPTH1, soit via des récepteurs non encore identifiés. La deuxième voie (II) met en jeu une traduction alternative démarrant au niveau d'un codon initiateur non AUG comme par exemple l'un des codons CUG présent dans la séquence prépro de la PTHrP. La conséquence de cette traduction alternative est la néosynthèse d'une isoforme de la PTHrP avec un peptide signal non fonctionnel ne permettant pas à la PTHrP de passer dans le réticulum endoplasmique (RE) et de suivre la voie normale de sécrétion, à savoir transport vers l'appareil de Golgi et l'empaquetage dans des vésicules de sécrétion (VS). La PTHrP se retrouverait ainsi dans le cytoplasme avec la possibilité, si elle n'est pas dégradée par le protéasome, d'être transloquée dans le noyau. Enfin, une troisième voie (III) est le transport rétrograde depuis le RE via une protéine spécifique de cette structure. Bien que des arguments existent pour ces 3 mécanismes, il semble que l'utilisation de l'une ou l'autre de ces voies soit spécifique du type cellulaire considéré.

7.1 Accès au cytoplasme

Endocytose

Le mécanisme par lequel une protéine sécrétée peut accéder au cytoplasme après sécrétion peut impliquer des voies dépendantes de l'endocytose. Un tel mécanisme a été documenté pour un certain nombre de protéines, incluant des membres de la famille des « fibroblast growth factors » ou FGFs, du « platelet-derived growth factor » ou PDGF ou encore de l'angiogénine^(209, 269, 270). Bien que l'endocytose du RPTH1 avec dégradation du récepteur ait pu être démontrée^(76, 271) d'autres études ne supportent pas ce concept. Par exemple dans les cellules CHO (pour « chinese hamster ovary ») transfectées par le RPTH1, Amizuka et coll.

⁽¹³³⁾ ont montré qu'il n'y avait pas de marquage nucléaire de la PTHrP dans les cellules transfectées même après addition de PTHrP dans le milieu de culture. On peut rappeler ici les résultats de Joun et coll. ⁽²⁷²⁾ qui ont mis en évidence une isoforme du RPTH1 ne contenant pas de peptide signal et qui serait donc localisée préférentiellement dans le cytoplasme. De ce résultat, il est tentant de spéculer que la PTHrP puisse être ciblée vers le noyau cellulaire après liaison avec cette variante intracellulaire du RPTH1. Une telle voie n'est pas sans précédent et a notamment pu être décrite pour le FGF-2 ⁽²⁷³⁾. Si cette isoforme s'avère être celle présente dans le noyau, la possibilité existe également qu'elle puisse servir de partenaire à la PTHrP pour exercer ces actions nucléaires. L'endocytose de la PTHrP sécrétée peut également s'effectuer via un récepteur distinct du RPTH1. La démonstration que la PTHrP(1-141) native sécrétée à partir des cellules COS-1 transfectées par la PTHrP subit une internalisation puis est ciblée ensuite vers le nucléole des cellules supporte largement ce concept ⁽²⁷⁴⁾. De manière intéressante dans ces travaux, l'endocytose de la PTHrP était dépendante de la SLN mais indépendante du RPTH1. Cependant, les observations que la forme native de la PTHrP n'est pas la forme majeure de sécrétion de la PTHrP dans les cellules et tissus ^(17, 275) ne plaide pas en faveur d'un tel mécanisme. Ainsi, la question reste ouverte que ce soit la SLN ou tout autre motif de la PTHrP qui soit reconnu à la surface cellulaire permettant à la PTHrP d'accéder au cytoplasme puis au noyau. Cette question pourtant fondamentale risque d'être difficile à résoudre car l'ensemble des données exposées ci-dessus semblent indiquer que plusieurs mécanismes sont susceptibles d'intervenir en fonction des formes sécrétées de la PTHrP et donc en fonction du tissu et/ou type cellulaire considéré.

Initiation alternative de la traduction

D'autres études suggèrent que la PTHrP n'est en fait pas sécrétée avant d'être ciblée vers le noyau. Un premier mécanisme possible est l'épissage alternatif de l'ARNprém de la PTHrP qui conduirait à une forme d'ARNm de la protéine ne possédant pas la séquence signal nécessaire au ciblage vers la voie sécrétrice. Etant donné qu'une telle isoforme d'ARNm de la PTHrP n'a jamais été documentée et gardant à l'esprit qu'une localisation nucléaire de la PTHrP est également observée dans les cellules transfectées avec l'ADNc de la PTHrP, ne contenant pas de séquences introniques, il semblerait qu'une telle hypothèse ne soit pas vraisemblable ^(266, 227). Un second mécanisme possible pouvant expliquer un ciblage de la PTHrP vers le noyau est l'initiation alternative de la traduction soit au niveau de codons AUG (codant pour une méthionine, M) différents du codon AUG initiateur soit au niveau de codons

non AUG, et en particulier aux niveaux de codons CUG (codant pour une leucine, L) ou GUG (codant pour une valine, V). En accord avec cette possibilité, de Vagner et coll. ⁽²⁷⁶⁾ ont démontré qu'une traduction alternative de l'ARNm du FGF-2 est initiée à 3 codons CUG en amont du codon AUG. Dans cette étude la traduction de l'ARNm du FGF-2 conduisait ainsi non seulement à la formation d'une isoforme initiée au codon AUG initiateur classique et destinée à être sécrétée mais également à 3 isoformes initiées aux codons CUG qui quant à eux étaient ciblés vers le noyau, résultant en des effets biologiques distincts. Selon les travaux de Kozak ^(277, 278, 279, 280), l'initiation alternative de la traduction survient essentiellement lorsque le contexte d'initiation, autour du codon AUG initiateur, n'est pas optimal. Si on examine les séquences nucléotidiques autour du codon initiateur AUG (en -36) de la PTHrP, on se rend compte que ce codon n'est pas dans un contexte optimal et ne serait donc pas très efficace pour initier la traduction. Le fait qu'un ciblage nucléaire de la PTHrP est observé dans les cellules transfectées par le cDNA de la PTHrP suggère que si la PTHrP nucléaire est le résultat d'une traduction alternative, celle-ci doit intervenir sur des codons présents en aval du codon AUG initiateur. Dans cette hypothèse, une initiation de la traduction à des codons présents dans la séquence signal conduirait à la synthèse de protéines tronquées au niveau de la séquence signal incapables de passer dans le réticulum endoplasmique et donc d'être engagées dans la voie sécrétrice. Ces formes tronquées seraient donc simplement traduites et libérées dans le cytosol avec un accès vers le noyau via la SLN. L'ADNc de la PTHrP ne contient pas de codons AUG additionnels. Par contre, suivant l'espèce considérée, la région prépro de la PTHrP contient 4 codons CUG (en -35, -32, -25 et -22) et 3 codons GUG (en -24, -17 et -10) présents en aval du codon initiateur AUG (-36) et pouvant servir à initier la traduction. Amizuka et coll. ⁽¹³³⁾ ont abordé cette question en transfectant les cellules CHO par toute une série de mutants codant pour des formes tronquées de la PTHrP traduite à partir des divers codons CUG. Ils ont montré par cette approche que toutes les formes initiées à partir des codons CUG étaient localisées spécifiquement dans les nucléoles, alors que le mutant codant pour la forme native de la PTHrP était localisé dans le cytoplasme au niveau de l'appareil de Golgi, mais également, et de manière un peu surprenante, dans le noyau des cellules. De ces résultats, il apparaît que le peptide signal de la PTHrP n'est pas suffisant pour cibler toutes les molécules de PTHrP vers la voie sécrétrice résultant en une accumulation nucléaire partielle de la PTHrP. Cependant, une traduction alternative à partir de codons présents en aval du codon initiateur serait très inhabituelle car selon les études de Kozak, dans les ARNm eucaryotiques seuls les codons en amont du AUG initiateur sont utilisés dans ce but ^(277, 278, 279, 280). Dans la séquence de la PTHrP, plusieurs codons alternatifs de traduction

sont dans des contextes nucléotidiques favorables et sont très conservés à travers les espèces, spécifiquement les codons CUG en -35, -32 et -25 et le codon GUG en -10. En outre, la structure secondaire de la séquence prépro, riche en GC (environ 70%) de la PTHrP favoriserait l'attachement des ribosomes au moins au niveau de certains de ces sites alternatifs de la traduction. Les récents travaux de Nguyen et coll. ⁽²⁸¹⁾ ont révélé que dans les cellules COS-1 transfectées par la PTHrP, 3 isoformes d'environ 25kDa de la PTHrP sont retrouvées dans le noyau. Ces isoformes ont une taille supérieure à la protéine mature mais inférieure à la forme prépro de la protéine et contiennent le propeptide et les régions amino-terminales et carboxy-terminales suggérant que ces isoformes contiennent une partie de la séquence prépro. La PTHrP nucléaire était retrouvée également par transfection des cellules avec la PTHrP mutée sur le codon d'initiation (AUG en AUC) démontrant qu'elles proviennent d'une traduction alternative de la PTHrP aux niveaux de codons alternatifs en aval du site classique d'initiation AUG. Des expériences complémentaires ont permis de montrer que les formes nucléaires de la PTHrP sont générées sans passage par le réticulum endoplasmique. Cette étude argumenterait l'hypothèse selon laquelle les formes nucléaires de la PTHrP proviennent de la traduction alternative de l'ARNm à des sites non-AUG présents dans la séquence prépro en aval du site d'initiation AUG. Cette caractéristique ferait de la PTHrP le seul exemple d'une protéine pouvant être générée à partir de codons situés en aval du site classique d'initiation de la traduction chez les eucaryotes. Chez les procaryotes au moins deux exemples d'un tel processus ont été décrits chez deux membres d'un petit groupe de protéases caséinolytiques, la famille des Clp ⁽²⁸¹⁾. Bien que des homologues de cette famille sont retrouvés chez les eucaryotes dont l'homme, une telle initiation de la traduction à des sites non AUG en aval du site d'initiation n'a pas été décrite.

Passage rétrograde du réticulum endoplasmique

Un troisième mécanisme pouvant expliquer la présence nucléaire de la PTHrP sans sécrétion préalable de la protéine est le passage rétrograde de la protéine depuis le réticulum endoplasmique vers le cytoplasme par des protéines de transport spécifiques ^(282, 283). En accord avec cette possibilité, Meerovitch et coll. ^(21, 19) ont montré que la pro-PTHrP peut accéder au cytosol depuis le réticulum endoplasmique. En outre, il faut noter que cette possibilité de transport rétrograde de la PTHrP pourrait également expliquer une partie des résultats obtenus par Amizuka et coll. ⁽¹³³⁾ décrits ci-dessus. En effet, dans les cellules CHO transfectées par la PTHrP native traduite à partir du codon initiateur AUG, la PTHrP est détectée aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau cellulaire. Amizuka et coll. ⁽¹³³⁾

montraient également dans ces mêmes cellules que les formes de la PTHrP traduites à partir de codons alternatifs non AUG étaient localisées spécifiquement dans le noyau. Ainsi, la possibilité existe que diverses voies de ciblage nucléaire puissent co-exister dans un même type cellulaire. Il faut garder à l'esprit cependant que dans leurs études, Amizuka et coll. ⁽¹³³⁾ n'ont pas déterminés les formes de PTHrP présentes dans le noyau. Et si l'on se réfère aux résultats obtenus par Nguyen et coll. ⁽²⁸¹⁾ décrits ci-dessus montrant que les formes nucléaires de la PTHrP contiennent une partie de la séquence prépro et pas seulement la séquence pro, il semble que la voie d'une traduction alternative soit celle utilisée par la PTHrP. Cette voie explique que la PTHrP native puisse se retrouver aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau.

7.2 Accès au noyau

Une fois dans le cytosol, la PTHrP a accès au noyau. Cependant, la PTHrP a été montrée comme étant une cible du protéasome cytoplasmique qui garni la face cytosolique du réticulum endoplasmique. Le protéasome est un complexe multi-protéasique présent dans divers compartiments cellulaires permettant la dégradation de diverses protéines ou familles protéiques. Il en est ainsi des protéines erronées, siège d'erreurs traductionnelles par exemple, et qui sont normalement destinées à être sécrétées mais également des facteurs de croissance et des protéines impliquées dans la régulation de cycle cellulaire comme les cyclines, dont le « turn-over » doit être rapide et spécifique pour satisfaire les diverses étapes du cycle cellulaire. La dégradation protéasomique requiert la liaison de multiples radicaux ubiquitines sur la protéine (poly-ubiquitinylation) destinée à être dégradée. Or, Meerovitch et coll. ^(21, 19) ont montré que la prépro-PTHrP est ubiquitinylée et dégradée par le protéasome. Par la suite, le même groupe montrait non seulement que la pro-PTHrP peut accéder au cytosol depuis le réticulum cytoplasmique (transport rétrograde évoqué ci-dessus) mais également que la pro-PTHrP associée à la face cytosolique du réticulum endoplasmique est alors la cible du protéasome. Cette propriété fait de la PTHrP le seul exemple d'une protéine sécrétée cible de l'action protéolytique ubiquitine-dépendante du protéasome. Ainsi, pour être ciblée vers le noyau, la PTHrP qui se trouve dans le cytosol doit échapper à la dégradation par le protéasome cytosolique. En somme, au moins 3 voies cellulaires sont en compétition pour la PTHrP: la voie sécrétoire, la voie nucléaire et la voie du protéasome.

La SLN des protéines destinées à être ciblées vers le nucléoplasme est reconnue par des protéines réceptrices au niveau du cytosol appelées importines ou karyophérines ⁽²⁸⁴⁾. Le

plus souvent, une importine α reconnaît la SLN de la protéine destinée à être transloquée vers le noyau. Ce complexe se lie alors à une importine β et l'ensemble est transporté à travers le pore nucléaire vers le nucléoplasme, un processus dépendant notamment d'une petite protéine G, la protéine Ran, et nécessitant de l'énergie fournie sous forme de GTP. C'est le mode de transport nucléaire à la fois le plus fréquent et le mieux connu. Il concerne des protéines comme les facteurs de transcription myc ou NF-kB ou des protéines rétrovirales comme l'antigène grand T de SV40 qui toutes contiennent une SLN. Plus rarement, la SLN se lie directement à l'importine β 1. La cycline E ou certaines protéines ribosomiques sont par exemple dans ce cas. Les travaux dans ce domaine ont permis de révéler que la PTHrP aussi fait partie des protéines à SLN qui se lient directement à l'importine β 1, sans que l'importine α soit requise⁽²⁸⁵⁾. Les interactions PTHrP-importine β 1 ont récemment été mises en évidence au niveau moléculaire par l'utilisation de diverses techniques de liaison et de divers mutants de substitution au niveau des résidus alanine de la PTHrP et de divers mutants de délétion de l'importine β 1⁽²⁸⁶⁾. Dans ces études, la région 83-93 (KTPGKKKKKGK) de la PTHrP est révélée comme étant absolument essentielle à l'interaction avec l'importine β 1 et la région 71-82 (TNKVETYKEQPL) comme étant requise pour une interaction avec une haute affinité. La région 380-643 de l'importine β 1 est quant à elle requise pour l'interaction avec la PTHrP. Les observations que l'interaction de la PTHrP avec l'importine β 1 est réduite en présence de la protéine Ran quand celle-ci est liée au GTP mais pas quand elle est liée au GDP est en accord avec l'idée que l'interaction de l'importine β 1 avec le complexe Ran-GTP est impliquée dans la libération de la PTHrP du côté nucléaire. Il est intéressant de noter que l'interaction de la PTHrP avec l'importine β 1 implique non seulement une séquence appartenant à la SLN telle qu'elle a été mise en évidence mais également une séquence en amont de cette SLN. En outre il s'agirait là d'un rare exemple d'une interaction de l'importine β 1 avec des séquences non riches en résidus arginine, et en l'occurrence ne contenant dans le cas de la PTHrP aucun résidu arginine dans les séquences de reconnaissance. Récemment, le transport de la PTHrP vers le noyau a été montré comme étant dépendant de l'intégrité du réseau microtubulaire *in vitro* et *in situ* indiquant que le cytosquelette joue également un rôle important dans la translocation nucléaire de la PTHrP⁽²⁸⁷⁾. Dans cette étude, l'importine β 1, mais pas l'importine α , était montrée comme augmentant significativement l'association de la PTHrP avec les microtubules, renforçant l'implication cruciale de l'importine β 1 dans le passage nucléaire de la PTHrP. Il est intéressant de garder à l'esprit qu'à côté de la SLN classique telle qu'elle est décrite dans ces travaux, d'autres études récentes suggèrent que la

PTHrP contient également d'autres séquences agissant comme des SLN, tout au moins actifs dans certains types cellulaires. Ainsi, le motif tétrabasiqye 147-150 (KKKK), qui n'est présent que dans une des isoformes de la PTHrP et spécifique à l'homme, agirait comme une SLN dans les chondrocytes ⁽⁴⁴⁾. L'effet intracrine de la PTHrP dépendant de cette séquence serait impliqué dans la modulation de la synthèse de collagène et du contenu extracellulaire en phosphate.

Si les mécanismes moléculaires d'entrée de la PTHrP dans le noyau commencent à être bien décrits, très peu de données sont disponibles quant aux mécanismes sous-tendant l'export nucléaire de la PTHrP. Les premières études réalisées par Lam et coll. ⁽²⁸⁸⁾ dans une lignée cellulaire immortalisée de kératinocytes humains HaCaT révélaiet que la PTHrP est phosphorylée par le complexe CDC2-CDK2 (complexe impliquant la cycline B et régulant la transition G2-M du cycle cellulaire, CDK pour « cyclin-dependent kinase ») sur le résidu thréonine en position 85, juste en amont de la SLN classique, et que cette modification régule la distribution nucléo/cytoplasmique de la PTHrP au profit du cytoplasme, comme cela a pu être montré pour d'autres protéines. Ainsi dans l'étude de Lam et coll. ⁽²⁸⁸⁾ la mutation du résidu thréonine 85 (T85) en résidu alanine (A85) résultait en une localisation spécifiquement nucléaire de la PTHrP alors que sa mutation en résidu acide glutamique (Glu85), pour mimer un résidu phosphorylé, résultait par contre en une localisation cytoplasmique. Cette étude est importante concernant les possibles propriétés biologiques de la PTHrP dans le noyau car, à côté de la régulation du cycle cellulaire, les cyclines et les CDKs interviennent également dans le contrôle transcriptionnel. On sait par ailleurs que la PTHrP contient toute une série de résidus susceptibles d'être phosphorylés par diverses kinases impliquées notamment dans la régulation du cycle cellulaire, mais aucune donnée spécifique n'est disponible concernant l'existence de PTHrP phosphorylée à d'autres résidus que la thréonine 85. En tous les cas l'étude de Lam et coll. ⁽²⁸⁸⁾ révèle que la phosphorylation de la PTHrP est dépendante du cycle cellulaire, ce qui est en accord avec d'autres données accumulées dans divers types cellulaires, comme les chondrocytes ou les CMLV. Par contre, leurs résultats mettent en avant un fait troublant: en effet, dans cette étude la PTHrP serait exportée du noyau en phase G2-M. Or dans les CMLV, les études du laboratoires montrent que la translocation nucléaire est dépendante du cycle cellulaire, mais indiquent que la PTHrP est importée dans le noyau justement à cette période du cycle cellulaire. Quoiqu'il en soit, il ressort de ces données contradictoires que la phosphorylation de la PTHrP, peut être réalisée par des kinases différentes selon le type cellulaire, puisse être impliquée dans l'export et/ou l'import nucléaire de la PTHrP. Très récemment, la question des mécanismes de l'export nucléaire de la PTHrP

a été abordée de manière fine par Lam et coll. ⁽²⁸⁹⁾. Dans cette étude, l'utilisation de techniques de fluorescence dans les cellules vivantes a permis de montrer que la PTHrP est exportée du noyau par un mécanisme impliquant le voie CRM (pour « chromosomal region maintenance ») 1/exportin 1, également impliquée dans l'export nucléaire de phosphatases spécifiques des MAPKs. Cette étude est la seule disponible actuellement décryptant au niveau moléculaire l'export nucléaire de la PTHrP. L'ensemble de ces études met en avant le fait que le passage cytoplasme – noyau de la PTHrP est un phénomène régulé dans les deux sens, et clairement signifie une importance biologique particulière de la présence nucléaire de la PTHrP.

7.3 Fonctions nucléaires possibles de la PTHrP

Les diverses données exposées ci-dessus indiquent que la PTHrP utilise diverses voies pour être ciblée vers le noyau non seulement suivant le type cellulaire mais également pour un même type cellulaire suivant la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve la cellule. A l'heure actuelle, bien que les données s'accumulent concernant les événements conduisant au ciblage nucléaire de la PTHrP, il reste encore un long chemin à parcourir pour définir le ou les rôles que la PTHrP pourrait jouer au sein du noyau pour contrôler la vie cellulaire.

7.4 Prolifération et apoptose cellulaire

Dans les kératinocytes HaCaT en culture, la PTHrP est localisée dans le compartiment nucléaire/nucléolaire en phase G1 puis est redistribuée vers le cytoplasme quand les cellules sont en division active ⁽²⁵⁸⁾. Au contraire, dans les CMLV A10 non transfectées ou transfectées par la PTHrP, la PTHrP immunoréactive est retrouvée préférentiellement dans les noyaux des cellules en division ou sur le point de se diviser, correspondant aux phase G2 et M du cycle cellulaire ⁽²²⁷⁾.

Dans les chondrocytes en culture, l'entrée de la PTHrP dans le noyau retarde l'apoptose induite par la privation de sérum ⁽²⁶⁶⁾. Dans les CMLV, elle induit la mitogenèse et la prolifération cellulaire ^(227, 246). De plus, l'expression et la translocation nucléaire de la PTHrP sont dépendantes du cycle cellulaire. Dans les kératinocytes ⁽²⁵⁸⁾ et dans les CMLV ^(227, 257) l'expression de la PTHrP est élevée dans les cellules en division (phase G₂/M du cycle cellulaire) et faible dans les cellules quiescentes (G₁). De plus, la PTHrP est localisée dans le nucléole des cellules quiescentes (G₀/G₁) et se redistribue dans le cytoplasme dans les

cellules en division (G_2/M). Plus important encore, les agents mitogènes stimulent l'expression de la PTHrP à condition que celle-ci soit en phase G_1 , avant que la division cellulaire ne commence ⁽²⁵⁸⁾. En accord avec ces observations, et comme précisé précédemment, la PTHrP est un substrat du complexe CDC2-CDK2 qui régule la progression du cycle cellulaire de la phase G_1 à G_2/M . Dans le cas des CMLV, comme nous l'avons vu précédemment, l'effet prolifératif de la PTHrP endogène obtenu après transfection est diamétralement opposé à l'effet anti-prolifératif de la PTHrP lorsque celle-ci est introduite en exogène, des effets qui s'inversent dans les CMLV au cours de l'hypertension.

A noter que l'expression d'isoformes de la PTHrP contenant la SLN a également été montrée comme inhibant l'apoptose des cellules cancéreuses de la prostate ^(290, 291). Par contre un effet stimulateur a été observé sur l'apoptose des cellules épithéliales intestinales IEC-6 ⁽²⁹²⁾. Ainsi, il semble que l'action de la PTHrP nucléaire sur la survie soit dépendante du type cellulaire considéré.

7.5 La biogénèse des ribosomes

Etant donné le rôle majeur du nucléole dans la transcription et la maturation de l'ARN ribosomique (ARNr), ainsi que dans l'assemblage des complexes ribonucléiques ^(293, 294), la présence de la PTHrP dans cet organite a rapidement suggéré un rôle dans la biogénèse des ribosomes. La capacité de la prépro-PTHrP et de la PTHrP mature à se lier avec haute affinité à l'ARN total et la dépendance de cette interaction vis-à-vis d'une SLN intacte était un premier argument en faveur de cette hypothèse ⁽²⁹⁵⁾. Plus convainquant encore, la PTHrP promeut la quiescence de chondrocytes en culture en réponse à la privation de sérum en inhibant la synthèse d'ARNr, un effet également dépendant d'une SLN intacte ⁽²⁹⁵⁾. Dans leurs travaux récents, Aarts et coll. ⁽²⁹⁶⁾ ont montré dans les chondrocytes en privation de sérum donc en conditions favorisant l'apoptose que la transfection par la PTHrP ou l'exposition des cellules par la PTHrP contenant la SLN préservait les cellules de l'apoptose en induisant une dérégulation de la synthèse des ARN ribosomiques et en diminuant le nombre de polysomes actifs. Ces effets étaient obtenus indépendamment du RPTH1.

8. Cibles nucléaires potentielles de la PTHrP : la culline 3

Un des enjeux actuels dans le domaine de la PTHrP est l'identification de ses cibles nucléaires. Bien que les effets intracrines de la PTHrP sur la prolifération ou la mort cellulaire aient été clairement démontrés, le devenir de la PTHrP dans le noyau reste un mystère. Des travaux de Aarts et coll.,⁽²⁹⁵⁾ montraient bien que la PTHrP pouvait interagir dans le noyau avec des ARN grâce au motif GXKKXXK, mais sans aller plus loin dans ses investigations. D'autre part, comme nous l'avons déjà vu, Fiaschi-Taesch et coll.,⁽²⁶⁸⁾ ont montré que la PTHrP nucléaire était associée à une augmentation du pourcentage de cellules en phase S et G2/M ainsi qu'à une phosphorylation de Rb. Cependant, ces données indiquent uniquement une activation du cycle cellulaire et ne renseignent pas sur les cibles nucléaires de la PTHrP. Des expériences d'expressions différentielles de gènes entre des cellules transfectées par la PTHrP vs PTHrP(Δ NLS), réalisées par Thierry Massfelder durant son séjour post-doctoral, rapportaient une série de transcrits surexprimés ou réprimés sans qu'ils ne soient possible à l'époque de les associer à un gène précis. Avec les progrès sur le séquençage du génome, il est à présent devenu possible d'identifier un certain nombre de ces fragments. Parmi eux, une protéine sur laquelle peu de données sont encore disponibles dans la littérature mais présentant des propriétés intéressantes : la culline 3.

Les différentes étapes du cycle cellulaire sont régies par des complexes protéiques associant des cyclines et des kinases (les CDK) lesquels vont moduler l'activité de protéines dont des facteurs de transcription permettant ainsi la progression de la cellule dans le cycle cellulaire. Parmi ces complexes, la Cycline E et la CDK2 régulent le passage de la phase G1 à S du cycle cellulaire. La vie des cyclines est régie par 2 phénomènes cruciaux : leur synthèse et leur dégradation afin qu'elles puissent exercer un effet rapide et transitoire. La dégradation des cyclines est dépendante du protéasome par un mécanisme d'ubiquitylation. Dans le cas de la cycline E, deux voies de dégradation sont mises en jeu, faisant intervenir des complexes protéiques différents. Ces voies de dégradation se distinguent par le fait que la cycline E est soit libre, soit complexée avec la CDK2. La cycline E complexée avec la CDK2 va être phosphorylée au niveau du résidu Thr³⁸⁰ et agir positivement sur le cycle cellulaire. Une fois la cycline E phosphorylée, elle va pouvoir être la cible de la culline 1 qui va la polyubiquitiner, et par conséquent la conduire au protéasome pour être détruite. D'autre part,

la cycline E libre, c'est-à-dire non complexée avec la CDK2 va pouvoir être polyubiquitinilée par le complexe E3 ubiquitine-ligase formé notamment par la culline 3 ⁽²⁹⁷⁾. L'élaboration d'un modèle transgénique pour la culline 3 ou le gène a été invalidé par Singer et coll., ⁽²⁹⁷⁾ est létal avant le 7,5 jour du développement embryonnaire suite à des malformations ou absence de tissus extra embryonnaires. Cette invalidation conduit à une accumulation de cycline E et engendre des effets différents selon le type cellulaire sur la régulation de la phase S. Ainsi au niveau de l'ectoderme extra-embryonique dans lequel les cellules effectuent des cycles mitotiques classiques, les investigateurs observent une forte augmentation du pourcentage de cellules en phase S alors que dans les cellules du trophoectoderme, lesquelles effectuent des endocycles, il y a blocage au niveau de l'entrée en phase S.

La structure du complexe E3 ubiquitine-ligase formé par la culline 3 a été appréhendée et il en ressort que le choix des substrats par les différentes cullines est dicté par des adaptateurs spécifiques (**Fig. I.14**). Ainsi la culline 1 interagit avec un module adaptateur Skp-1 faisant le lien entre d'une part la culline 1 et d'autre part d'un membre de la famille des F-Box protéines par l'intermédiaire de son domaine F-Box en N-Terminal et qui interagit en C-Terminal avec les différents substrats. La culline 2 interagit quand à elle avec le module adaptateur EloC, faisant le lien avec la famille des BC-protéines dont le VHL en fait partie et qui va ubiquitiniler HIF α , régulant ainsi la stabilité de l'ARNm de la PTHrP ⁽²⁹⁸⁾. La culline 3 recrute directement ses substrats sans faire appel à une protéine adaptatrice et ceci par l'intermédiaire de la famille des BTB protéines contenant un domaine BTB interagissant directement avec la culline 3. D'autre part de ces protéines BTB, des domaines comme MATH ou Kelch interagissent avec les substrats ^(299, 300, 301).

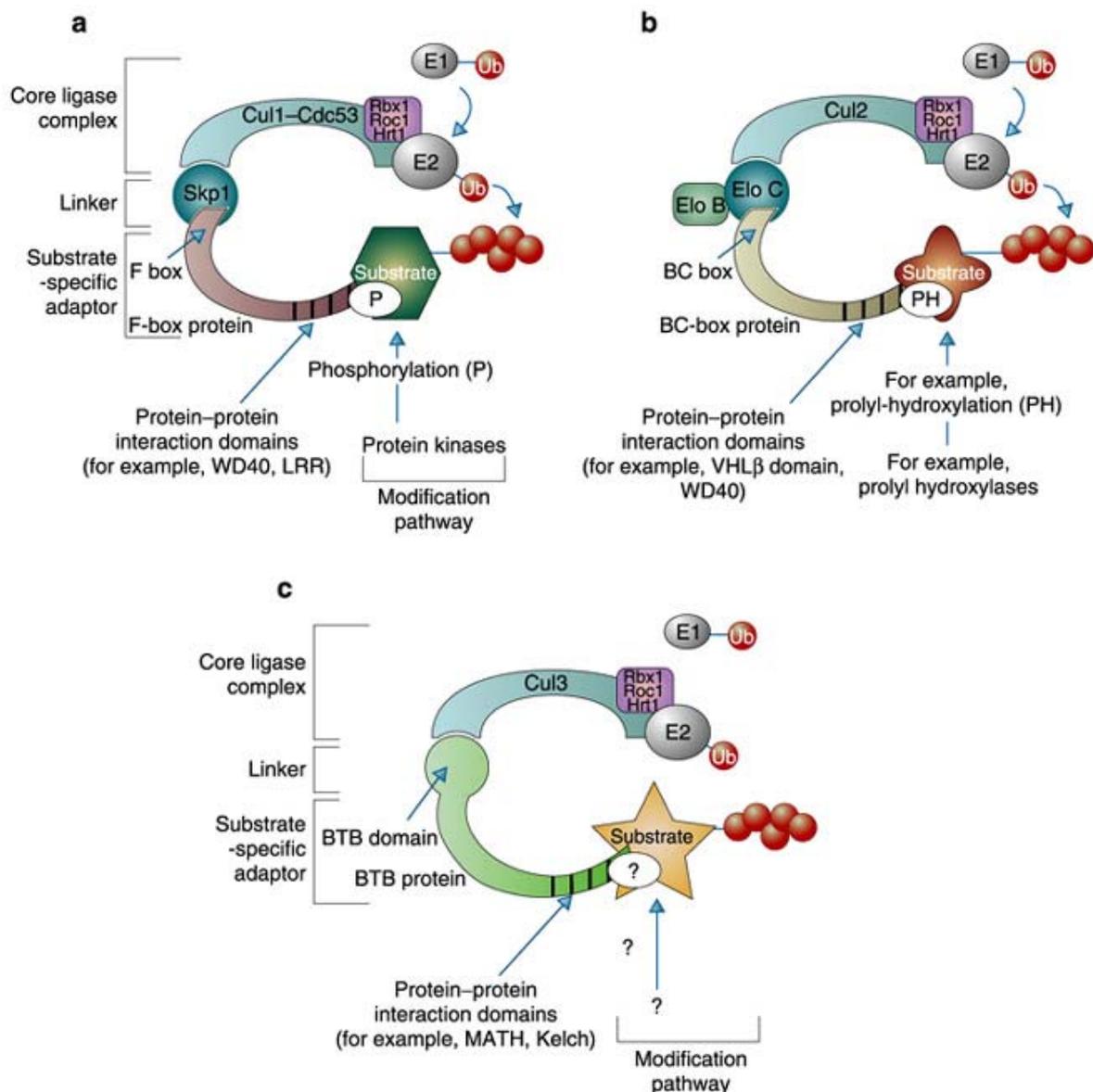


Figure I.14. Représentation de la structure des différentes ubiquitine ligase.

En a, b et c sont représentés respectivement les complexes ubiquitine ligase comprenant la culline 1, 2 et 3. Le complexe comprenant la culline 1 ou encore appelé complexe SCF est composé de la culline 1 qui interagit avec Skp1 qui fait le lien avec un membre de la famille des F-Box protéines qui interagira avec les différents substrats à ubiquitiner. Le complexe comprenant la culline 2 est composé de la culline 2 qui interagit par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice EloC avec des BC-Box protéines tel que le VHL par son domaine SOCS-Box. Parmi les substrats de ce complexe se trouve le HIF α qui a récemment été montré comme régulant le taux de PTHrP (Massfelder, 2004). Le complexe comprenant la culline 3 présente une organisation particulière par rapport aux précédents complexes dans le sens où il ne possède pas de protéine adaptatrice et la culline 3 interagit directement par un domaine BTB avec des protéines telles que MATH lui présentant directement le substrat (d'après Krek, 2003 et Pintard et coll., 2003).

Mise à part la cycline E, d'autres cibles de la culline 3 ont très récemment pu être mises en évidence, notamment grâce à la découverte des domaines d'interactions BTB de la culline 3. Ainsi, la protéine MEL-26 appartenant à la famille des BTB protéines est un adaptateur entre la culline 3 et la protéine MEI-1 impliqué dans la dégradation des microtubules^(301, 300). Des travaux de Cullinan et coll.,⁽³⁰²⁾ et Kobayashi et coll.,⁽³⁰³⁾ ont montré que le facteur de transcription Nrf2 était une cible de la culline 3 *via* la protéine adaptatrice Keap1-BTB. Nrf2 est un facteur de transcription régulant l'expression de gènes antioxydants et d'enzymes de détoxification de phase 2, stimulant ainsi la survie cellulaire suite à un stress oxydatif. Dans des conditions normoxiques Nrf2 est inactif, lié à Keap1 et dégradé par polyubiquitinylation par la culline 3. En réponse à un stress oxydatif, le complexe Nrf2-Keap1 se dissocie et Nrf2 et s'accumule dans le noyau où il agira sous forme de dimère en tant que facteur de transcription sur des gènes impliqués dans l'homéostasie du potentiel redox. Au niveau du noyau, les dimères de Nrf2 vont interagir avec les ARE (pour « Antioxydant Réponse Élément ») présents sur les gènes des enzymes de détoxifications et des protéines de protections^(304, 302, 305, 306). Par ailleurs, Cullinan et coll.,⁽³⁰²⁾ montraient qu'une diminution de l'expression de la culline 3 résultait en une expression constitutive plus élevée des gènes cibles de Nrf2, mettant en évidence une fonction de régulateur négatif de la culline 3 sur l'expression de Nrf2. On peut ainsi facilement spéculer sur l'importance de la culline 3 dans les mécanismes de détoxifications par son action sur Nrf2 et son rôle potentiel sur des mécanismes de cancérogenèse.

D'autre part, Zhang et coll.,⁽³⁰⁷⁾ ont montré que les complexes covalents ADN topoisomérase I – ADN étaient la cible du protéasome par l'intermédiaire de la culline 3. Ces complexes covalents ADN topoisomérase I – ADN sont les lésions initiales produites par certains anti-tumoraux comme les camptothécins (CPTs). Ces drogues stimulent la dégradation des ADN topoisomérase I par polyubiquitinylation via la culline 3. L'inhibition du protéasome ou de la culline 3 prévient la dégradation de ces complexes stimulant ainsi la mort cellulaire induite par les CPT. Ainsi les cellules résistantes aux CPTs présentent une surexpression de culline 3. Ces données montrent ainsi que la culline 3 est un important régulateur de la sensibilité cellulaire aux anti-tumoraux CPT.

De récentes études montrent également que la protéine RhoBTB2, un gène candidat suppresseur de tumeur situé sur le chromosome 8p21, une région fréquemment déletée dans les cancers. En effet, RhoBTB2 est déleté de façon homozygote dans 3,5% des cancers primaire de seins et son expression est réprimée dans 50% des lignées cellulaires cancéreuses

de sein ou de poumon. Sa fonction n'est pas encore déterminée à ce jour mais elle se lie à la culline 3 par son premier domaine BTB⁽³⁰⁸⁾.

Ainsi à travers toutes ces données, la culline 3 semble être un enzyme ayant un rôle majeur dans la régulation de la survie et de la prolifération cellulaire, notamment au niveau de la carcinogénèse et de la résistance aux drogues. Une interaction avec la PTHrP, qui nous le savons est surexprimée dans beaucoup de tumeurs, agissant sur la régulation de son expression, pourrait ouvrir de nouvelles perspectives tant en terme de recherche qu'au niveau de thérapies, notamment en terme de résistance aux traitements.

9. Le stretch mécanique dans les CMLV

9.1 Définition

Les forces mécaniques sont d'importants modulateurs de la morphologie et de la fonction cellulaire dans un grand nombre de variétés tissulaires et sont particulièrement importantes dans le système cardiovasculaire. Les CMLV font parties des constituants majeurs des vaisseaux, et sont notamment responsables du maintien de la structure et de la fonction des vaisseaux. Leurs hypertrophies, proliférations et/ou migrations contribuent au développement de l'athérosclérose, de l'hypertension et de la resténose conditions dans lesquelles les forces mécaniques sont largement modifiées. *In vivo*, les CMLV des parois vasculaires sont continuellement soumises à des forces mécaniques. Ces forces mécaniques sont de 2 types : d'une part le « shear stress » qui est une force qui s'exerce dans l'axe du vaisseau, consécutive aux frottements du flux sanguin sur la paroi et d'autre part l'étirement mécanique, ou stretch mécanique qui est une force qui s'applique perpendiculairement à l'axe du vaisseau et qui est la conséquence des battements cardiaques. C'est plus particulièrement sur cette 2^{ème} composante que nous allons nous pencher.

9.2 Influence sur le phénotype de CMLV

La façon dont les CMLV ressentent et traduisent un signal mécanique extra-cellulaire jusqu'au noyau de la cellule résulte en de nombreux changements en terme d'expression génétique (**Fig. I.15**). Dans des conditions de stretch mécanique physiologique, correspondant à environ 9-12% d'élongation, les CMLV adultes adoptent un phénotype contractile ou

synthétique. Elles sont quiescentes et contractiles, mais ne sont pas sensibles aux facteurs de croissances et aux molécules régulant la prolifération et la migration cellulaire. Ces cellules expriment alors de nombreuses protéines contractiles telles que des isoformes contractiles de la chaîne lourde de la myosine : SM-1 MHC et SM-2 MHC, et présentent une diminution de l'expression des isoformes non contractiles comme par exemple NM-A et NM-B ⁽³⁰⁹⁾ qui va de paire avec une augmentation de l'expression de h-caldesmon ⁽³¹⁰⁾ considéré comme un marqueur de différenciation des CMLV. En culture statique, les CMLV changent de phénotype pour adopter un phénotype dit synthétique avec une stimulation de la prolifération cellulaire et une diminution de l'expression des protéines contractiles.

Cependant en réponse à des altérations dues au stretch mécanique, de nombreuses protéines contractiles disparaissent graduellement et les cellules adoptent un phénotype dit intermédiaire ⁽³¹¹⁾. Il en résulte un remodelage des cellules et de la paroi vasculaire. Ainsi, les cellules deviennent plus sensibles aux facteurs de croissance et augmentent leur sécrétion protéique en réponse à une augmentation du stress mécanique comme une augmentation de la pression sanguine. Cette augmentation de la pression artérielle conduit à l'hypertrophie des CMLV ainsi qu'une hyperplasie entraînant une augmentation de la résistance périphérique vasculaire ^(312, 311).

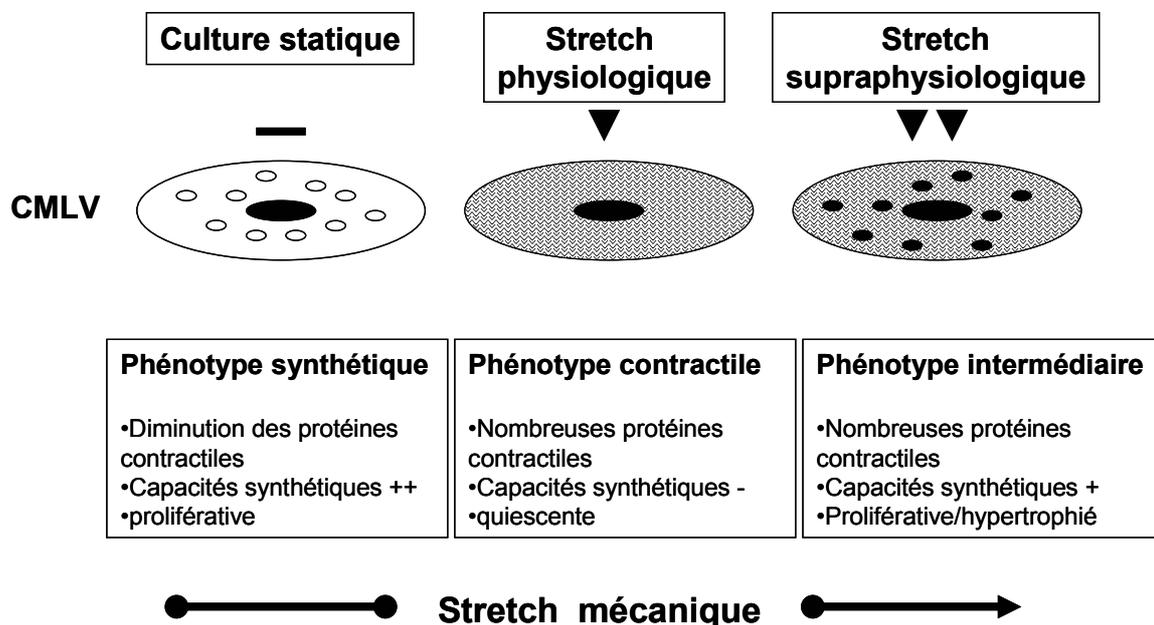


Figure I.15. Influence du stretch mécanique sur le phénotype des CMLV.

En culture statique, les CMLV adoptent un phénotype dit synthétique caractérisé par une prolifération cellulaire, une diminution des protéines contractiles et une forte capacité synthétique. Un stretch physiologique va maintenir les cellules quiescentes ainsi que l'expression des isoformes contractiles de certaines protéines. Lorsque le stretch augmente en intensité, les CMLV vont se remettre à proliférer et s'hypertrophier tout en gardant l'expression des protéines contractiles et en redéveloppant des capacités synthétiques.

9.3 Mécanisme d'action / voie de transduction

Dans les vaisseaux, les CMLV sont à l'état quiescent, c'est à dire qu'elles ont un phénotype contractile et sont peu sensibles aux facteurs de croissance. Cependant, la perturbation des forces mécaniques peut entraîner un changement de phénotype de ces CMLV. Elles perdent alors leurs propriétés contractiles, adoptent un phénotype prolifératif et deviennent sensibles aux facteurs de croissance. Ces perturbations des forces mécaniques sont transmises à la cellule par 4 types de mécanosenseurs ⁽³¹²⁾ :

Les récepteurs à tyrosine kinase :

Les récepteurs à tyrosine kinase tel que le récepteur au PDGF peuvent sous l'effet du stretch mécanique s'activer par autophosphorylation sur des résidus tyrosine et ainsi activer la cascade des MAPK qui ont un rôle de pivot dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Le stretch mécanique peut ainsi de lui même perturber la surface cellulaire et changer la conformation des récepteurs entraînant l'activation des voies de transduction en absence du ligand (**Fig. I.16**).

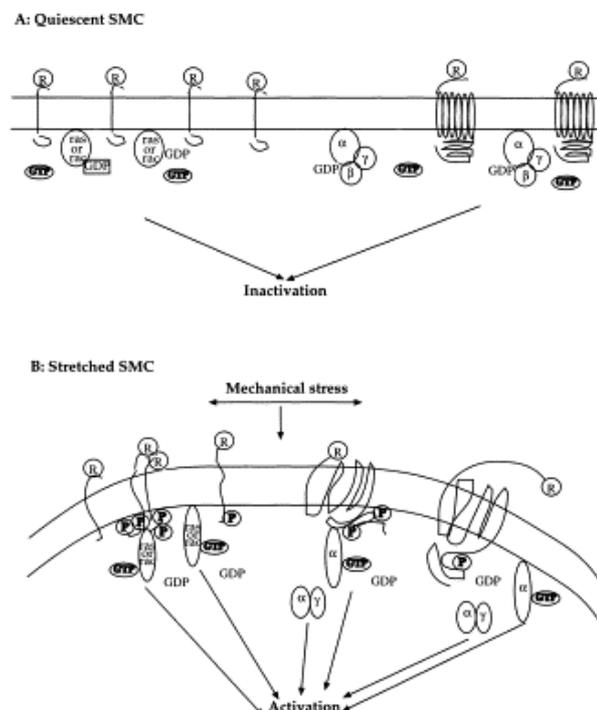


Figure I.16. Activation des récepteurs à tyrosine kinase et à protéine G par le stretch mécanique
Ce schéma propose le concept que les récepteurs aux facteurs de croissance et aux protéines G peuvent servir de mécanosenseurs dans les CMLV. Le stretch mécanique et la déformation des parois des cellules va induire une dimérisation et une activation des récepteurs aux facteurs de croissance tel que le R-PDGF par autophosphorylation et un changement conformationnel des récepteurs à 7 domaines transmembranaire permettant l'échange du GDP par du GTP des sous unités α des protéines G conduisant à l'activation des cibles en aval (D'après Li et coll., 2000).

Les intégrines :

In vivo, les CMLV sont entourées par la matrice extracellulaire (ou ECM). Dans les conditions physiologiques, la ECM peut bloquer la migration des CMLV de la média vers l'intima et influence le phénotype des CMLV dans des conditions normales. La modification de la ECM est associée au développement de maladies cardiovasculaires et cette réorganisation est influencée par les intégrines qui établissent des points de contacts focaux.

Au niveau des CMLV, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a été identifiée comme ayant un important rôle dans l'angiogénèse et le remodelage de la paroi vasculaire ⁽³¹³⁾. De nombreux ligands de la ECM peuvent s'y attacher *via* un motif RGD.

Ces intégrines ne sont pas uniquement des molécules d'adhésions, mais peuvent transmettre un stimuli extracellulaire en stimuli intracellulaire comme l'augmentation de Ca^{++}_{ic} ou la phosphorylation des résidus tyrosines de divers «non-récepteurs» tyrosine kinases tel que FAK (focal adhésion kinase) et Src kinase ou encore des protéines adaptatrices (Shc, Grb2, P130CAS et Crk). Cette activation va entraîner une réorganisation du cytosquelette et une migration des cellules, ainsi que l'activation de la voie Ras-Raf-MEK-MAPK qui entraîne la réponse mitogénique (**Fig. I.17**).

Le stretch mécanique entraîne une phosphorylation des protéines tyrosines kinases et une augmentation de synthèse d'ADN lorsque les cellules sont cultivées sur du collagène, de la fibronectine ou de la vitronectine mais pas sur l'élastine ou la laminine. Cet effet peut être bloqué par l'ajout de peptides RGD (Arg-Gly-Asp) ⁽³¹⁴⁾ ou des anticorps anti- β_3 ou $\alpha_v\beta_5$ ⁽³¹⁵⁾, vérifiant qu'il s'agit bien du résultat de l'interaction de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ avec les protéines de la matrice extracellulaire. La transcription et l'expression des gènes précoces tels que Egr1 et c-jun sont également sensibles à des perturbations mécaniques de la cellule dépendante de l'ECM ⁽³¹⁶⁾.

Ainsi, il est probable que l'habilité des cellules à ressentir les contraintes mécaniques et la réponse biochimique qui s'en suit dépend de la nature des interactions entre les intégrines et la matrice extracellulaire.

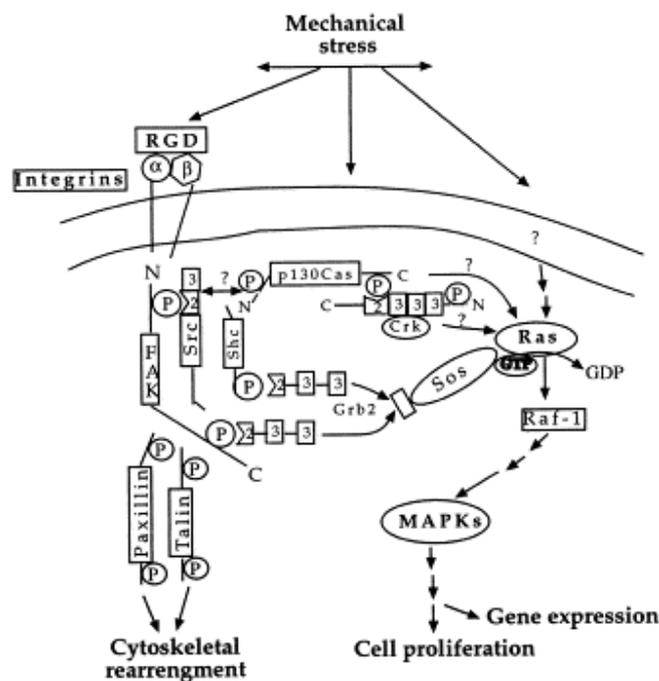


Figure I.17. Représentation schématique de l'activation de la cascade de signalisation par les intégrines dans les CMLV.

Les forces mécaniques perturbent la matrice extracellulaire et induit la dimérisation des sous unités α et β des intégrines lesquelles stimulent les FAK par autophosphorylation suivit de l'activation de Src, p130CAS, Shc et Grb2. Ceci résulte en une activation de la protéine G Sos stimulant la prolifération de la cellule. L'activation de FAK va induire la phosphorylation de diverses protéines du cytosquelette telles que la paxillin ou la talin permettant une réorganisation du cytosquelette (D'après Li et coll., 2000).

Les récepteurs à protéine G et protéines G :

Différents récepteurs aux protéines G tels que les récepteurs adrénergiques, muscariniques, à l'angiotensine II ou encore à l'endothéline sont connus pour réguler les réponses cellulaires, notamment au niveau de la prolifération cellulaire ⁽³¹²⁾.

La protéine Gq semble être importante dans le processus d'hypertrophie car la liaison de ligands tels que l'Angiotensine II ou l'endothéline activent cette protéine Gq et peut conduire à l'hypertrophie et l'hyperplasie de CMLV ⁽³¹⁷⁾. De plus, le blocage des protéines Gq/11 bloque la prolifération et diminue l'hypertrophie ventriculaire en réponse à une augmentation de la pression sanguine. Par ailleurs, l'inhibition des protéines Gq au niveau des cellules endothéliales entraîne une inhibition de l'activité ras-GTPase normalement induite par le shear stress. Le traitement des CMLV par la toxine pertussique, un inhibiteur des protéines Gi, bloque la voie des p38MAPK.

Prises ensemble, toutes ces données suggèrent ainsi que les protéines G sont impliquées dans la réponse cellulaire au stretch mécanique ⁽³¹²⁾ (**Fig. I.17**).

Les canaux ioniques :

Un stress mécanique provoque une augmentation transitoire de $\text{Ca}^{++}_{\text{ic}}$ et de Na^+ entraînant une dépolarisation de la cellule permettant de maintenir le muscle sous tension. Le stretch active des canaux cationiques non sélectifs. Le pic de $\text{Ca}^{++}_{\text{ic}}$ est dépendant de la libération de calcium par les stocks intracellulaires, mais dépend pour son initiation de l'entrée de calcium extracellulaire. Cette entrée de calcium se fait *via* des canaux Ca^{++} sensibles au stretch et par des canaux Ca^{++} VD. Cette activité des canaux sensibles au stretch est augmentée chez les SHR par rapport au WKY. Ainsi une altération de l'activité des canaux activés par le stretch mécanique pourrait contribuer à augmenter la réponse myogénique et provoquer l'hypertrophie et le remodelage de la paroi artérielle dans le cas de l'hypertension.

Des canaux K^+ semblent également participer aux mécanismes de transduction lors du stretch, tout comme l'échangeur Na^+/H^+ qui lors du stretch activerait Raf-1 kinase et MAPK ⁽³¹²⁾.

Ces différents mécanosenseurs vont, en réponse au stretch mécanique, activer des effecteurs tel que la PKC modulant ainsi l'activité de nombreuses cibles telles que les protéines du cytosquelette, les MAPKs et les facteurs de transcription ⁽³¹²⁾ (**Fig. I.18**).

Certaines études ^(318, 319) montrent que l'activation de la PKC est nécessaire à l'activation des MAPKs en réponse à des facteurs de croissances, cytokines, hormones ou au stress de l'environnement conduisant à l'hypertrophie, la migration, la prolifération, l'inhibition de la croissance ou encore l'apoptose. L'activation de P38-MAPK lors du stretch est fortement dépendante de la PKC et l'inhibition de la P38-MAPK inhibe la prolifération et l'apoptose ⁽³²⁰⁾. Cependant, l'inhibition de la PKC par la staurosporine n'altère pas la prolifération cellulaire suggérant une importance multifactorielle du stretch mécanique et l'implication possible de différentes PKC insensibles à la staurosporine ⁽³²¹⁾.

D'autre part, la voie des MAPK est toute particulièrement impliquée lors du stretch mécanique. L'activation des petites protéines G par le stretch entraîne l'activation des MEK kinases (14 membres différents chez les mammifères dont Raf, MEKK1-4, TAK1, PAK) qui vont activer les MEK en les phosphorylant sur des résidus Ser/Thr (7 membres différents) qui vont activer les MAPKs en les phosphorylant sur Tyr/Thr (12 membres différents) ⁽³¹²⁾.

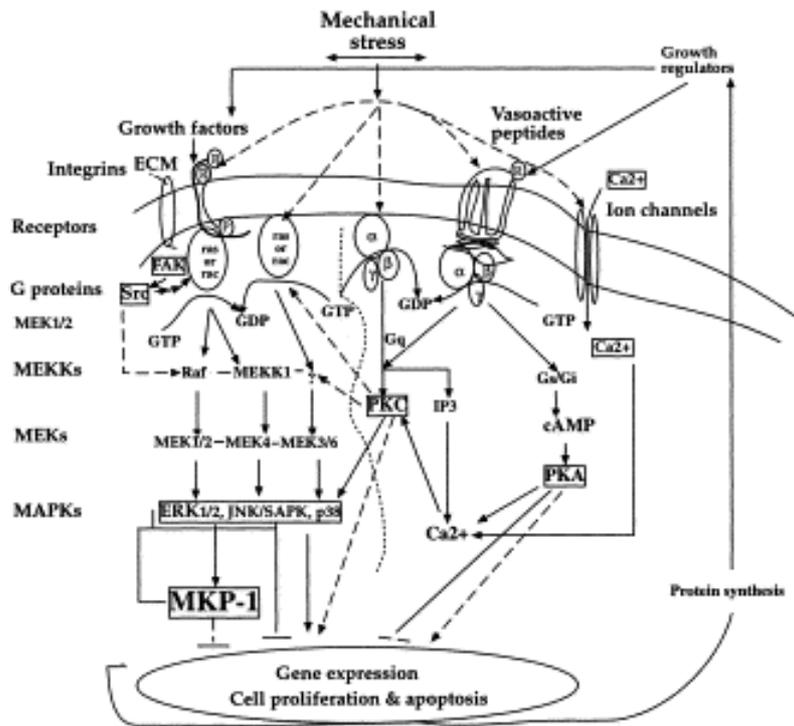


Figure I.18. Modèle d'activation de la transduction par le stretch mécanique dans les CMLV.

Le stretch mécanique résulte en une activation des récepteurs à tyrosine kinases, des récepteurs à protéines G, des intégrines et des canaux ioniques. Il en résulte une activation de Raf, des MEKs, PKCs et des MAPKs lesquelles vont moduler l'expression de certains gènes, de la synthèse protéique, de la prolifération et de la mort cellulaire. D'un autre coté, l'activation des MAPK va induire l'expression des MKP-1 et de la PKA lesquelles servent de régulateur négatif des MAPKs et des cyclines (D'après Li et coll., 2000).

Il existe cependant des systèmes de régulation par rétrocontrôle négatif, notamment par la MAPK phosphatase 1 qui est induite au niveau transcriptionnel par les facteurs de croissance et le stretch mécanique (**Fig. I.19**). Elle possède 2 activités catalytiques sur les résidus phospho-tyrosine et phospho-thréonine. Elle inactive ainsi ERK1/2, JNK, SAPK, P38MAPK et inhibe la synthèse d'ADN. Ainsi, la MPK1 est impliquée dans une boucle de régulation pour inactiver les MAPK après la stimulation par des mitogènes et pendant la réponse de la cellule face au stretch mécanique. L'inhibition de MEK1/2 ou de P38MAPK régule négativement de l'induction de MPK1. A la vue des données actuelles, il est concevable que le stretch mécanique induit l'activation de la voie des MAPKs qui entraîne soit la prolifération, soit l'inhibition de la croissance des CMLV. Cette variation de réponse serait dépendante d'une balance sur la possibilité des MAPK à activer directement la MPK1.

Par ailleurs, la PKA est également impliquée et peut inhiber la prolifération et la migration des CMLV. Elle inhibe la voie des MAPK/ERK par l'inhibition de Raf et inhibe

l'action des cyclines en diminuant le taux de cycline D1 et la production de cdk2. Elle est activée par le stretch mécanique ⁽³¹²⁾.

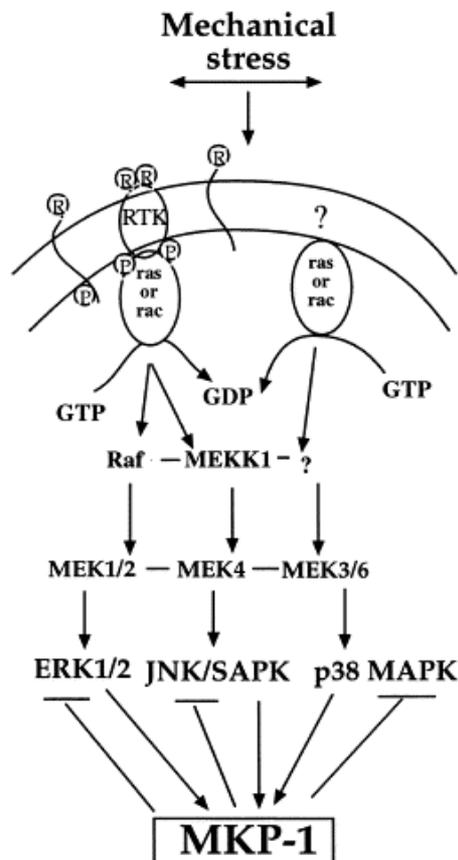


Figure I.19. Rétrocontrôle négatif des MAPK par MKP-1 en réponse au stretch mécanique dans les CMLV.

Une des cibles activées par les MAPK en réponse au stretch mécanique est la MPK-1, qui en retour va induire un rétrocontrôle négatif sur les MAPK en les déphosphorylant. Il en résulte un arrêt de la transduction du signal induit par le stretch mécanique (D'après Li et coll., 2000).

9.4 Induction de l'expression de gènes cibles

L'hypertrophie vasculaire qui est l'un des changements majeurs au niveau des vaisseaux dans des pathologies telles que l'hypertension artérielle, est caractérisée par une prolifération des CMLV et une accumulation de matrice extracellulaire. Outre la PTHrP comme nous l'avons déjà vu précédemment, l'expression de nombreuses protéines sont induites par le stretch mécanique. Ainsi, il a été rapporté que le stretch mécanique induit l'expression dans les CMLV du VEGF et du FGF-2 ^(322, 323), de HIF-1 α , ⁽³²⁴⁾, du système rénine angiotensine local et du PDGF et du TGF-beta1 par l'intermédiaire de l'angiotensine II ^(325, 326, 327), du récepteur PDGFbeta ⁽³²⁸⁾, de la pompe Na⁺-K⁺-ATPase ⁽³²⁹⁾, et le récepteur du facteur activé par les plaquettes : R-PAF par l'intermédiaire du facteur de transcription NF-kappaB ⁽³³⁰⁾.

Le stretch mécanique stimule également la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire telles que le collagène I, IV, la fibronectine qui jouent un rôle important dans le remodelage vasculaire et ceci par l'intermédiaire de l'angiotensine II et la stimulation du système rénine angiotensine local ^(331, 326, 332, 327). Il est également à noter syndecan-4, un protéoglycane héparane sulfate associé à la membrane et colocalisé avec les intégrines dans les points focaux d'adhésions et qui est augmenté par le stretch, et qui facilite ainsi probablement la locomotion cellulaire ⁽³³³⁾.

9.5 Effet sur la prolifération des CMLV

Suivant les travaux, les effets du stretch mécanique sur la prolifération des CMLV sont pour le moins contradictoires. En effet, certaines études rapportent une stimulation de la prolifération cellulaire, alors que d'autres, utilisant les mêmes conditions de stretch mécanique et le même type cellulaire rapportent une inhibition de la prolifération cellulaire, traduisant la complexité des mécanismes impliqués. Ainsi, Chapman et coll. ⁽³³⁴⁾ ont montré qu'un stretch mécanique de 10% à 1 Hz des CMLV induisait un arrêt du cycle cellulaire en inhibant la transition des phases G1/S. Cette inhibition est associée avec une diminution de la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome Rb et une augmentation de la kinase inhibitrice dépendante des cyclines p21 sans affecter les taux de p27. Par opposition, Iwasaki et coll. ⁽³³⁵⁾ démontrent que le stretch mécanique de 3 à 25% stimule la prolifération des CMLV et ceci par l'intermédiaire du récepteur à l'EGF et l'activation de ERK1/2. Il est intéressant de noter que dans chaque étude, les CMLV sont isolées à partir d'aorte thoracique de rat et seule la méthode utilisée pour l'obtention des cellules diffèrent, à savoir soit par la méthode en explant (Iwasaki), soit par digestion collagénasique (Chapman). Les différences de résultats pourraient venir de la méthode utilisée, cependant, d'autres études ne corroborent pas ce constat et rapportent soit une stimulation ^(336, 337, 310, 325, 338) soit une inhibition de la prolifération ^(337, 310, 339). En effet, Hipper et coll. ⁽³³⁹⁾ montrent qu'un stretch mécanique de 5% d'amplitude à 0,5 Hz inhibe la synthèse d'ADN de CMLV A10 et ceci sans affecter l'apoptose cellulaire alors que Li et coll. montrent une augmentation de 1,4 à 1,6 fois de la prolifération des CMLV soumises à un stretch mécanique de 10% à 0,5 Hz. Ainsi, nous observons des effets opposés sur la prolifération des CMLV aussi bien soumises à un stretch physiologique que supraphysiologique. Une autre hypothèse pouvant expliquer ces résultats contradictoires pourrait venir du fait qu'il existe au sein d'un même vaisseau de nombreux

phénotypes différents des CMLV^(340, 247) et qu'elles ne répondraient pas de la même manière au stretch mécanique.

10. Modèles antérieurs de souris transgéniques

10.1 Souris invalidées pour la PTHrP et le R-PTH1

Les souris invalidées pour la PTHrP et le R-PTH1 présentent une mortalité précoce à la naissance et *in utero* respectivement, consécutive à des malformations du squelette par une ossification prématurée des chondrocytes.

10.2 Souris « rescue »

Afin de contourner l'ossification prématurée des chondrocytes, des souris « rescues » ont été développées à partir des souris invalidées pour la PTHrP mais exprimant la PTHrP dans les chondrocytes⁽¹¹²⁾. Ceci a pu être réalisé par transfection d'une construction codant pour la PTHrP sous la dépendance du promoteur du collagène II. Ces souris survivent quelques semaines après la naissance mais présentent une grande fragilité. Malgré cette grande fragilité, ces souris ont permis de mettre en évidence un rôle important de la PTHrP dans le développement des glandes mammaires, des dents, des follicules pileux et du pancréas. Cependant, aucune étude n'a pu être réalisée sur le système cardiovasculaire, notamment en raison de la grande fragilité de ces souris.

10.3 Souris transgéniques surexprimant la PTHrP et/ou le R-PTH1 dans les CML (Clemens)

Afin d'explorer le rôle de la PTHrP dans le système cardiovasculaire, l'équipe de Clemens a développé des souris surexprimant la PTHrP et/ou le R-PTH1 sous la dépendance du promoteur SMP8, spécifiquement exprimé dans les CML^(202, 168, 169). La surexpression du R-PTH1 a été effectuée par injection dans l'oocyte de souris d'une construction plasmidique codant pour le R-PTH1 dont l'expression est sous la dépendance du promoteur SMP8 de l' α -actine. Le R-PTH1 est ainsi surexprimé dans tous les tissus exprimant l' α -actine comme les CMLV.

Comme nous l'avons déjà vu précédemment, la PTHrP est connue pour induire une relaxation par son fragment N-Terminal. Chez les souris transgéniques, la surexpression du R-PTH1 a pour effet de diminuer la pression artérielle et la fréquence cardiaque, et d'augmenter la réponse vasodilatatrice à la PTHrP exogène.

Des souris double transgéniques surexprimant à la fois le R-PTH1 et la PTHrP meurent au 9^{ème} jour du développement embryonnaire suite à des malformations cardiaques et des contractions ventriculaires non synchronisées. L'histologie de ces souris a également montré une diminution des parois ventriculaires, un manque de trabécules et des jonctions proéminentes entre les cardiomyocytes.

La surexpression de PTHrP dans les CMLV de souris a pour effet de diminuer la pression sanguine comparé aux souris sauvages ainsi que la réponse vasodilatatrice à la PTHrP. Cette désensibilisation est identique au niveau de l'aorte et de la veine porte, et de même, les souris transgéniques sont moins sensibles à l'action hypotensive de l'acétyl choline *in vivo* et *in vitro* indiquant qu'il s'agit ici probablement d'une désensibilisation des seconds messagers et des effecteurs commun à l'acétyl choline et la PTHrP.

10.4 Excision conditionnelle de la PTHrP dans les CML

Durant ma thèse, le laboratoire a tenté de générer des souris transgéniques pour la PTHrP tout en contournant les problèmes liés aux souris invalidées et à la fragilité des souris « rescue ». De ce constat est né l'idée de développer des souris faisant appel au système Cre/Lox conditionnel développé par l'équipe de D. Metzger de l'IGBMC. Pour mener à bien ces projets, deux types de souris sont utilisés :

D'une part, des souris Floxées pour la PTHrP, développées par l'équipe de Karaplis au Canada ⁽³⁴¹⁾ (**Fig. I.20**). En résumé, des souris Z/AP ont été utilisées, les cellules souches embryonnaires (ES) ont été prélevées de blastocystes et ont été mises en cultures. Ces cellules ont été transfectées par électroporation avec une construction d'ADN comprenant entre 2 séquences non transcrites (ntr) de la PTHrP l'exon 4 de la PTHrP codant pour la majeure partie de la protéine entouré de séquences lox P suivit d'un gène de résistance à la néomycine, d'une séquence lox P et d'une cassette de sélection négative à la thymidine kinase. Les cellules ES ayant intégrées le transgène dans leur génome par recombinaison homologue sont sélectionnées et le gène de résistance à la néomycine est alors excisé par recombinaison par le Cre recombinase. Les cellules ES ayant incorporées la construction désirée, c'est-à-dire uniquement l'exon 4 de la PTHrP entouré de séquences LoxP sont alors réimplantées dans des

blastocystes. Il en résulte des animaux chimériques qui seront recroisés pour obtenir des animaux transgéniques dans un premier temps hétérozygotes puis homozygotes.

D'autre part, des souris exprimant la Cre spécifiquement dans les CML et dont l'activité est conditionnelle ⁽³⁴²⁾ (**Fig. I.21**). Tout d'abord, il me semble important de mieux définir ce qu'est la Cre recombinase. Il s'agit d'un enzyme issu du phage Coli P1 qui code pour une recombinase de 38 kD de la famille des intégrases. Cet enzyme va recombiner des sites loxP qui sont une séquence de 36 paires de bases constituées de 2 palindromes de 13 paires de bases. Ces séquences loxP vont pouvoir être recombinées par la Cre recombinase et la séquence comprise entre les deux sites loxP va être circularisée et excisée.

La génération de ces souris a été réalisée par l'équipe de D. Metzger de l'IGBMC. Des cellules ES ont été obtenues à partir de blastocystes et ont été transfectées par électroporation avec un vecteur contenant entre 2 séquences non transcrites (ntr) du gène de SM22 α le gène codant pour la Cre recombinase fusionné à un récepteur aux stéroïdes muté (Cre^{ERT2}) ^(343, 344) et un gène de résistance à la néomycine; en aval de cette région se situe un gène de sélection négative : le gène de la thymidine kinase. Les cellules ayant subi une recombinaison homologue sont sélectionnées de la même manière que ci-dessus. Il en résulte des cellules ayant la Cre recombinase sous la dépendance du promoteur de la protéine SM22 α qui est le premier marqueur de différenciation des CML et qui est exprimé au stade embryonnaire dans le mésenchyme céphalique, le cœur (myocarde et péricarde), l'aorte et le sac vitellin et au stade post-natal et adulte dans les CMLV (artères, artérioles, veines), les CML extravasculaires (vessie, tractus gastrointestinal et poumons) et légèrement dans le cœur ^(345, 346, 347).

Ainsi, les animaux transgéniques expriment uniquement la Cre recombinase dans les cellules qui expriment la protéine SM22 α et dont l'activité est dépendante de la présence de tamoxifène.

En effet, la Cre recombinase est fusionnée à un récepteur muté aux hormones stéroïdes qui ne reconnaît plus les ligands endogènes, mais reconnaît le tamoxifène ⁽³⁴⁸⁾. Ainsi en présence de tamoxifène, il y aura dissociation de la Cre et du récepteur aux stéroïdes, permettant l'entrée de la Cre recombinase dans le noyau et exercer son activité par recombinaison des sites lox P. Mais étant donné qu'à haute dose le tamoxifène présente des effets secondaires négatifs, on utilise préférentiellement le 4-hydroxytamoxifène (OHT) qui active le récepteur à des concentrations plus basses.

Un autre exemple d'activation du système Cre-Lox est de fusionner la Cre recombinase à un récepteur de la progestérone muté dont 42 acides aminés sont délétés en C-terminal. Ainsi, le récepteur est incapable de lier la progestérone et ne lie que le RU 486, bien caractérisé pour ses propriétés anti-progestérone et anti-glucocorticoïde ⁽³⁴⁹⁾.

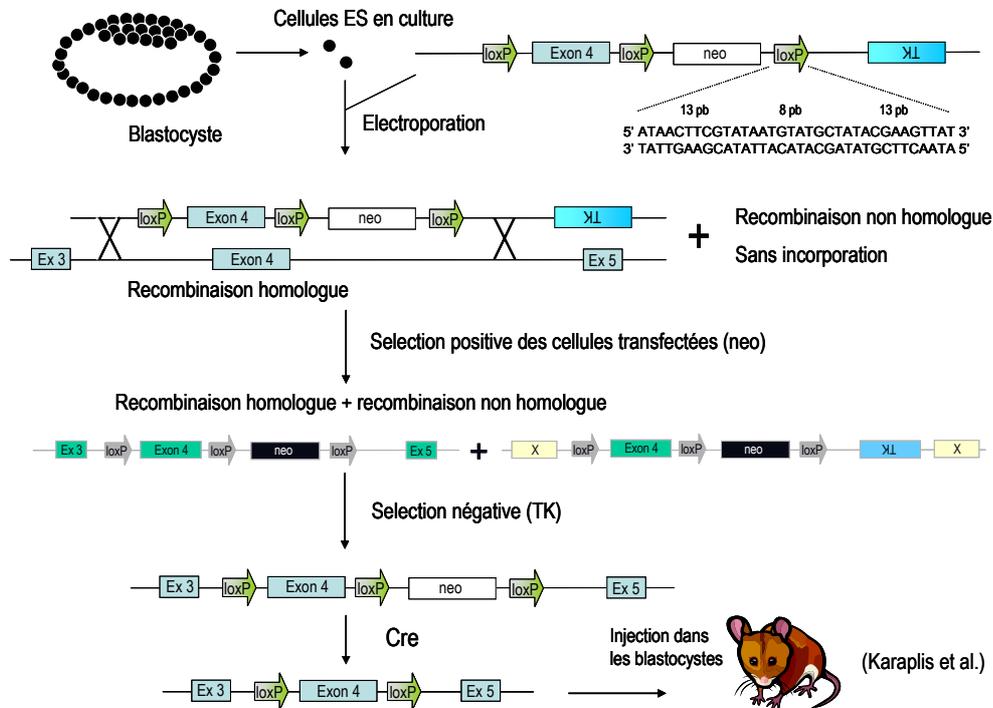


Figure I.20. Elaboration des souris dont l'exon 4 de la PTHrP est entourée de séquences LoxP.

Les cellules souches ES sont transfectées par électroporation par la construction possédant l'exon 4 de la PTHrP, des sites lox P, 2 ntr, des gènes de sélection. Les cellules transfectées sont sélectionnées par la résistance à la néomycine puis les recombinaisons homologues sont sélectionnées par le gène de résistance TK. Le gène de résistance à la néomycine est excisé par recombinaison par la Cre recombinase et les cellules présentant uniquement l'exon 4 de la PTHrP entourée par les séquences lox P sont injectées dans les blastocystes.

Obtention des souris dont la PTHrP peut être excisée de manière conditionnelle dans les CML

Ces souris sont obtenues par le croisement des 2 souches précédentes : d'une part les souris ayant l'exon 4 de la PTHrP floxée et d'autre part, les souris exprimant la Cre^{ERT2} spécifiquement dans les CML (**Fig. I.22**). Le croisement de ces 2 types de souris va générer des souris double transgéniques qui auront à la fois l'exon 4 de la PTHrP floxée (pour chaque allèle) et le gène de la Cre^{ERT2} sous la dépendance du promoteur SM22 α . Ainsi, dans les cellules exprimant la protéine SM22 α , il sera possible d'invalider le gène de la PTHrP en administrant un traitement au tamoxifène à ces souris (**Fig. I.22**). Ce traitement consiste à des administrations répétées de tamoxifène comme 5 X 0.1 mg en ip donne de bon résultats sans

entraîner d'effets secondaires. Ainsi, le tamoxifène va pouvoir activer la Cre recombinase dans les cellules qui l'expriment en se liant au récepteur muté aux stéroïdes, permettant à la Cre d'entrer dans le noyau et d'exercer son activité de recombinaison des sites Lox P et d'exciser l'exon 4 de la PTHrP.

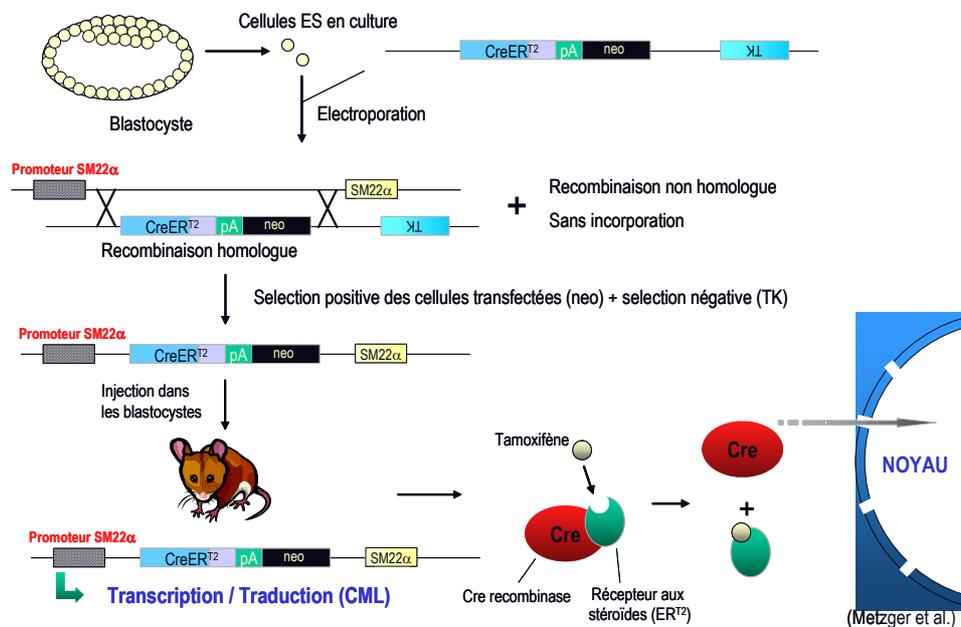


Figure I.21. Elaboration de la souris exprimant la Cre recombinase inducible par le tamoxifène. Des cellules souches ES sont transfectées par une construction contenant la Cre Recombinase fusionnée a un récepteur muté aux stéroïdes, un gène de résistance à la néomycine entouré de 2 ntr spécifique du gène de la protéine SM22 α , une cassette de sélection négative TK. Les cellules transfectées sont sélectionnées par leur résistance à la néomycine et les recombinaisons homologues sont sélectionnées par sélection négative par la TK. Les cellules sont ensuite injectées dans des blastocystes et les souris croisées jusqu'à l'obtention d'homozygotes. Ces souris exprimeront la Cre uniquement dans les cellules exprimant le SM22 α et sera active uniquement en présence de tamoxifène.

Malheureusement, l'établissement de ces souris transgéniques où la PTHrP pouvait être excisée spécifiquement dans les CML et de manière conditionnelle est pour le moment un échec. En effet, l'expression de la Cre recombinase est très faible voire nulle dans les CMLV suite à des problèmes d'expression du SM22 α ou de son environnement génique. De nouvelles lignées sont actuellement à l'étude, utilisant le promoteur SMP8 couplé à une Cre recombinase non inducible.

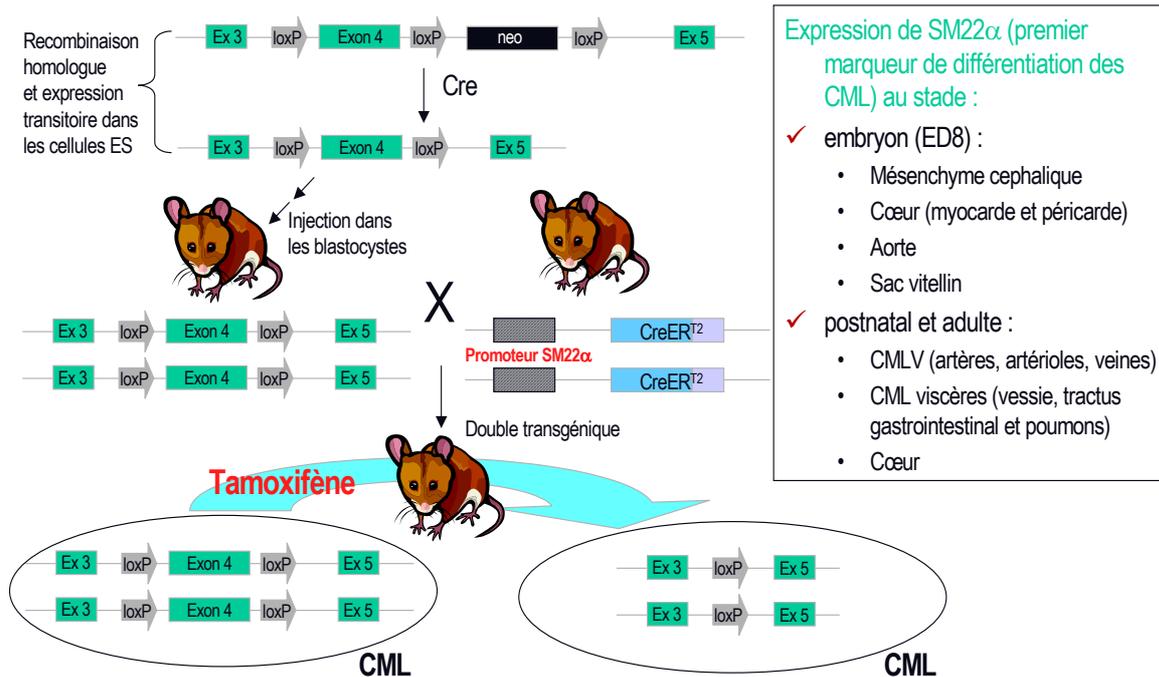


Figure I.22. Excision contrôlée du gène de la PTHrP dans les CML.

Les souris sont obtenues par le croisement de 2 lignées précédemment développées: d'une part les souris ayant l'exon 4 de la PTHrP floxée et d'autre part, les souris exprimant la Cre^{ERT2} spécifiquement dans les CML. Le croisement de ces 2 types de souris va générer des souris double transgéniques qui auront à la fois l'exon IV de la PTHrP floxée (pour chaque allèles) et le gène de la Cre^{ERT2} sous la dépendance du promoteur SM22 α . Ainsi, dans les cellules exprimant la protéine SM22 α , il sera possible d'invalider le gène de la PTHrP en administrant un traitement au tamoxifène à ces souris. Ce traitement consiste à des administrations répétées de tamoxifène, qui va activer la Cre-recombinase dans les cellules qui l'expriment en se liant au récepteur muté aux stéroïdes, permettant à la Cre d'entrer dans le noyau et d'exercer son activité de recombinaison des sites Lox P et d'exciser ainsi l'exon IV de la PTHrP. L'encart désigne les types tissulaires et cellulaires qui expriment la protéine SM22 α au stade embryonnaire, postnatal et adulte. A noter que la protéine SM22 α est le premier marqueur de différenciation des CML. Bien que l'expression de cette protéine soit retrouvée à certains sites extra-vasculaires au stade embryonnaire, son expression au niveau postnatal et adulte est confinée aux CML qu'elles soient vasculaires ou extra-vasculaires.

Objectifs

L'objectif de mon travail de thèse a été tout d'abord de m'inscrire dans la continuité des travaux du laboratoire sur la PTHrP et la prolifération cellulaire initiés par Thierry Massfelder au cours de son séjour postdoctoral aux Etats-Unis. Il avait été clairement démontré auparavant que la PTHrP inhibe la prolifération cellulaire dans les CMLV par l'interaction du fragment N-Terminal avec son récepteur commun à la PTH : le RPTH1. Cependant, le système PTHrP et prolifération a gagné en complexité depuis la mise en évidence de la voie intracrine qui stimule la prolifération cellulaire⁽²²⁷⁾. Ainsi, un système qui paraissait simple au départ est devenu extrêmement intéressant à étudier de part ses propriétés paradoxales, qui peuvent aboutir à des résultats opposés suivant la voie prédominante utilisée par la PTHrP, mais également suivant l'origine cellulaire comme en témoignent les travaux effectués sur les CMLV de rat SHR⁽²⁴⁶⁾. Durant ma thèse, je me suis concentré sur les effets de la PTHrP sur la prolifération cellulaire, la dissociation des effets observés entre la voie auto/paracrine et intracrine, ainsi que sur l'identification de cibles nucléaires de la PTHrP jusqu'alors inconnues.

- Dans un premier temps, mes travaux ont consisté à déterminer l'implication de la PTHrP sur la prolifération des CMLV soumises à un stretch mécanique. Deux études avaient préalablement montré que le stretch mécanique stimulait l'expression de la PTHrP dans les CML aortiques^(233, 236). Cependant, dans ces études, seul l'aspect tonique de la PTHrP avait été abordé, suggérant qu'elle y jouait un rôle de facteur de compliance face à une élévation de pression. Je me suis donc attaché à déterminer l'implication de la PTHrP induite par le stretch mécanique dans la prolifération des CMLV. Ce travail a donné lieu à une publication dans le *Journal of the American Society of Nephrology*.
- Les différentes études réalisées sur la PTHrP et la prolifération cellulaire font appel à une surexpression artificielle de PTHrP et posent la question de la signification physiologique des effets observés. Partant de ce constat, je me suis appliqué durant la seconde partie de ma thèse à établir un modèle de CLMV plus simple, n'exprimant plus la PTHrP.
- Un autre aspect développé en parallèle et qui me semblait très important est l'identification des cibles nucléaires de la PTHrP, qui restent jusqu'à présent inconnues et empêchent d'approfondir les recherches dans les systèmes impliquant

la voie intracrine de la PTHrP. Des cibles potentielles de la PTHrP ont pu être identifiées à partir d'études d'expression différentielle de gènes. Cependant, à cette époque, les séquences de nucléotides ne correspondaient à rien de connu. Les progrès du séquençage du génome ont rendu possible l'identification de certaines cibles dont la culline 3 sur laquelle je me suis particulièrement attardé.

Matériel et Méthodes

Chapitre II

Animaux

Onze rats mâle Wistar (Charles River Lab., St Aubin-les-Elbeuf, France) de 12 semaines, pesant 200 à 300g, avec libre accès à une nourriture standard et à l'eau du robinet ont été utilisés.

Isolement des arbres vasculaires intra-rénaux et des aortes thoraciques (Fig. 1)

La technique utilisée est celle décrite par Endlich et coll. ⁽²²⁶⁾. Les rats sont anesthésiés (pentobarbital, 50 mg/kg) et les reins et l'aorte thoracique prélevés. Pour l'obtention des arbres rénovasculaires les reins sont décapsulés, coupés en deux longitudinalement et la papille enlevée. Chaque moitié de rein est pressée contre un tamis en acier inoxydable dont l'ouverture des pores est de 300 µm. L'ensemble de l'arbre artériel composé essentiellement des artères interlobaires et arciformes est retenu à la surface de la grille tandis que les artérioles afférentes et les glomérules passent au travers du tamis avec une grande partie du parenchyme tubulaire. Les arbres vasculaires sont récupérés et placés sur un tamis de nylon de 100 µm d'ouverture de pore puis rincés énergiquement avec une solution NaCl 0.9% afin d'éliminer une partie des tubules et des glomérules adhérents. Une fois prélevées, les aortes thoraciques sont débarrassées des tissus connectifs, coupées longitudinalement puis découpées en petites portions.

L'isolement des arbres vasculaires intra-rénaux de souris est basé sur la technique développée pour le rat. Cependant, les vaisseaux rénaux de souris étant beaucoup plus fragile, des tamis dont les ouvertures de mailles sont de 200 µm et de 100 µm ont été utilisés et les reins ont été très délicatement pressés (**Fig II.1**).

Obtention et mise en culture des cellules musculaires lisses rénovasculaires (CMLRv) et des cellules musculaires lisses aortiques (CMLAo)

Les arbres vasculaires intrarénaux et l'aorte thoracique pré-purifiés selon la technique décrite ci-dessus, sont soumis à une digestion à la collagénase dans un tampon PBS (5 mmol/L KH₂PO₄, 2,7 mmol/L Na₂HPO₄, et 153,8 mmol/L NaCl) supplémenté de collagénase (*Clostridium histolyticum* type IA, Sigma, St Quentin Fallavier, France) à 0,6 mg/ml et d'inhibiteur de trypsine (Sigma) à 1 mg/ml, pendant 30 min à 37°C, sous agitation légère. Pour les arbres vasculaires intrarénaux, cette étape permet d'obtenir une préparation rénovasculaire pure à 81% ⁽²²⁶⁾.

Les arbres vasculaires intra-rénaux et les fragments d'aorte thoracique sont ensuite rincés au PBS stérile puis mis en culture selon la technique des explants. Pour cela les tissus

sont déposés dans des boîtes de culture à 6 puits, dont les puits ont été préalablement traités au collagène (collagène de rat de type I, Sigma) à 50µg/ml pendant 30 min à 37°C, dans du milieu DMEM (« Dulbecco's Modified Eagle Medium », Life Technologies, Cergy Pontoise, France) supplémenté de 30% de sérum de veau fœtal (FBS, Biowhittaker, Vervier, Belgique), et d'un mélange d'antibiotiques (pénicilline, 100U/mL et streptomycine, 0,1 mg/ml). Après migration d'un nombre suffisant de cellules hors des explants (environ 10 à 14 jours après la mise en explant), les cellules sont récupérées et sous-cultivées (passages) par digestion à la trypsine (Sigma). A partir de cette étape les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté de 10% de FBS et du mélange d'antibiotiques. Dans tous les cas, les cellules sont mises en culture à 37°C dans une atmosphère humide contenant 10% de CO₂ dans l'air et utilisées à des passages allant de 6 à 20.

Immunofluorescence

Les CMLRv et CMLAo sontensemencées dans des chambres de culture sur lame de verre dans du milieu DMEM contenant 10% de FBS jusqu'à 50% de confluence. Les cellules sont fixées par immersion des lames dans une solution d'acétone et de méthanol (1 :1 / vol :vol) dans la glace pendant 20 min. Les lames sont séchées à l'air et immergées dans une solution contenant, dans le tampon PBS, 0,2% de BSA et 0,1% de Triton X-100 (tampon PBST) pendant 20 min à température ambiante afin de saturer les sites de liaison non spécifiques de l'anticorps. Les lames sont ensuite incubées avec l'anticorps monoclonal de souris anti- α -actine couplé à la FITC (Sigma) dilué au 1:100 dans le tampon PBST pendant 3 heures en chambre noire pour le marquage de l' α -actine ou pour le marquage de la PTHrP avec un anticorps polyclonal anti-PTHrP Ab2 à une concentration de 5 µg/ml à température ambiante pendant 2 heures suivit d'une incubation avec un anticorps secondaire anti-lapin conjugué soit au FITC ou au TRITC est utilisé pour la détection de la PTHrP. Après lavage dans le PBST, les préparations sont recouvertes d'une solution anti-reflet (Biomedica, Foster City, CA, USA), surmontées d'une lamelle puis observées en microscopie à fluorescence.

Mesure de la prolifération cellulaire

Les CMLRv et les CMLAo sontensemencées dans des boîtes à 6 puits à raison de 4000 cellules/cm² dans du milieu DMEM contenant 10% de FBS. La prolifération cellulaire est mesurée à divers temps par comptage sur un hémocytomètre sur des périodes allant jusqu'à 14 jours, suivant le type d'expérimentation. La prolifération est exprimée soit en densité cellulaire (nombre de cellules/cm²) soit en PDT (pour « population doubling time »)

correspondant à la durée du cycle cellulaire au cours de la phase exponentielle de croissance (généralement entre 2 et 6 jours).

Protocole de stretch mécanique des cellules

Pour l'ensemble des expériences de stretch mécanique des CMLRv et des CMLAo nous avons sélectionné une lignée de CMLRv et une lignée de CMLAo dont la croissance reflète la moyenne de l'ensemble des lignées rénovasculaires ou aortiques.

Dans ces expériences, les CMLRv et CMLAo sontensemencées dans des boites de cultures à 6 puits à fond flexible (Flexcell, Dunn Laboratories, Asbach, Allemagne) à raison de 4000 cellules/cm² dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum. Après 2 jours de culture, les cellules sont rendues quiescentes par culture pendant 2 jours dans du milieu DMEM sans FBS contenant 0,1% de BSA. Les cellules sont ensuite cultivées dans du DMEM contenant soit du FBS à 10% (milieu avec sérum) soit la BSA à 0,1% (milieu sans sérum) et soumises ou non à un stretch mécanique. L'amplitude de déformation du fond des puits (stretch mécanique) était de 10% à une fréquence de 1 Hz; ce qui correspond à une déformation dite «physiologique». Ces expériences sont réalisées à l'aide d'un appareillage conçu au laboratoire (**Fig. II.2A et II.B**) appliquant successivement une pression négative et positive sur le fond des boites de cultures.

Transfection stable des CMLRv et CMLAo

Vecteur d'expression : Nous avons utilisé le plasmide pcDNA3 (Invitrogen –Life technologies, Cergy Pontoise, France) dans lesquels le cDNA complet de la PTHrP humaine (hPTHrP) est sous-cloné en orientation antisens (pcDNA3-AS :PTHrP) et en orientation sens (pcDNA3-PTHrP), le cDNA de la PTHrP muté pour la séquence de localisation nucléaire où les acides aminés 88-92 et 102-106 ont été délétés (pcDNA3-PTHrP(Δ NLS)), le cDNA de la PTHrP ou les 36 premiers acides aminés correspondant à la séquence signal ont été délétés (pcDNA3-PTHrP(Δ SP)). Ces constructions étaient soit disponibles au laboratoire soit construites. Dans les transfections contrôles, nous avons utilisé le pcDNA3 seul. Les plasmides utilisés pour la transfection des cellules de souris et codant pour la Cre recombinase étaient les plasmides pSG₅ et pBK-CMV obtenus par l'intermédiaire du Dr. METZGER de la clinique de la souris. Ces plasmides ont été cotransfectés avec le plasmide nu pcDNA3 contenant un gène de résistance pour la geneticin.

Protocole de transfection : Les CMLV sontensemencées dans des flacons de culture de 25cm² ou 75cm² dans du milieu DMEM supplémenté de 10% de FBS jusqu'à 50% de

confluence. Les cellules adhérentes sont alors lavées 3 fois avec 5 ou 10 ml de milieu DMEM sans FBS puis maintenues dans 3 ou 5 ml de ce même milieu. Pour transfecter les cellules, 5 à 10 µg d'ADN plasmidique dans 20 à 50 µl d'eau sont incubés avec 20 à 50 µl de lipofectamine (Life Technologies) à 2 mg/ml pendant 30 min à température ambiante. Cette solution est ajoutée goutte à goutte aux cellules puis les boîtes incubées pendant 3 à 4 h à 37°C. Après cette période d'incubation 5 ou 10 ml de milieu DMEM supplémenté de 10% de FBS sont ajoutés aux cellules. Après 1 jour, le milieu est remplacé par du milieu DMEM frais contenant 10% de FBS. Deux jours après, le milieu est remplacé par du milieu DMEM supplémenté de 10% de FBS et contenant 75 µg/ml de G418 afin de sélectionner les cellules transfectées. La concentration optimale de G418 a été déterminée pour les CMLV par une « courbe de mort » sur 3 semaines avec des concentrations de 25 à 300 µg/ml de G418 et changement de milieu tous les 3 jours.

Mesure de la viabilité cellulaire

Les diverses lignées cellulaires sontensemencées dans des boîtes à 96 puits à raison de 4000 cellules/puit dans 100 µl de milieu DMEM contenant 10% de FBS. Les cellules sont alors cultivées en présence ou en absence de sérum. Les concentrations de sérum utilisés sont de 10%, 5% et 1% de FBS. En absence de sérum, les cellules sont mises en présence de 0,1% de BSA. Après 48h, le MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromid) est ajouté à raison de 0,5 mg/ml pendant 4h dans chaque puit. Après cette période, la solution de solubilisation (10% de SDS dans 0.01M de HCl) est ajoutée à raison de 0,5g/ml dans chaque puit pendant 24h. L'absorbance obtenue est mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque : longueur d'onde 550nm contre référence à 690 nm. L'absorbance est fonction de la viabilité des cellules⁽³⁷¹⁾.

Mesure de la prolifération par incorporation de BrdU

La croissance des CMLV de souris a été mesurée par incorporation de bromodéoxyuridine (BrdU) en accord avec le protocole du fournisseur. Brièvement, les CMLV ont été mises en culture dans des boîtes de 96 puits en présence de 10% de sérum à une densité de 4000 cellules/puits. Après 2 jours de culture, les cellules sont rendues quiescentes pendant 2 jours dans du milieu DMEM sans FBS contenant 0,1% de BSA. Les cellules sont ensuite cultivées dans du DMEM contenant soit du FBS à 10%, 5% ou 1% (milieu avec sérum) soit la BSA à 0,1% (milieu sans sérum) en présence de BrdU pendant 48h. Pour chaque expérience,

3 puits ont été utilisés pour chaque concentration. L'incorporation de BrdU a été déterminée par colorimétrie en utilisant un lecteur de plaques.

Stabilité de l'ARNm de la PTHrP

La stabilité de l'ARNm de la PTHrP a été étudiée sur des CMLRv et CMLAo de rats Wistar. Les cellules ont été mises en culture et stretchées ou non en absence de sérum et en accord avec le protocole précédemment décrit et exposées à l'actinomycine D (5 µg/ml) pour bloquer la transcription. L'intensité relative de l'ARNm de la PTHrP normalisée par la GAPDH a été exprimée pour chaque expérience comme un pourcentage par rapport au point 0h défini comme étant 100%.

Mesure de l'activité des promoteurs de la PTHrP

Les CMLRv et CMLAo ont été mises en culture à une concentration de 4000 cellules/cm² dans des boîtes à fond flexible en présence de sérum pendant 48h. Le milieu est alors changé pour du milieu sans sérum pendant 48h afin de les rendre quiescentes. Les cellules sont ensuite transfectées de façon transitoire par une construction contenant en 5' les promoteurs P1, P2 et P3 de la PTHrP humaine codant pour le gène de la chloramphenicol acetyltransferase (CAT) ⁽²⁹⁸⁾. La transfection a été réalisée avec 1µg/cm² de plasmide en utilisant de la lipofectamine. Les CMLRv et CMLAo sont ensuite cultivées en absence de sérum pendant 48h et stretchées ou non. L'analyse de l'expression de l'enzyme CAT a été réalisée en utilisant un kit ELISA (Roche Diagnostics). Les résultats ont été normalisés et exprimés en pg d'enzyme CAT/mg de protéine.

Analyse de l'expression de la PTHrP par RT-PCR semi-quantitative et quantitative

Extraction de l'ARN

L'ARN total est extrait avec le TRIzol selon le protocole du fournisseur (Invitrogen) ²⁴⁶. Le TRIzol est une solution mono-phasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine qui maintient l'intégrité de l'ARN tout en détruisant les cellules et en dissolvant les autres composés cellulaires. Les échantillons tissulaires (cortex rénal, médulla rénale, artérioles

intra-rénales, aorte, artérioles mésentériques, oreillettes et ventricules ; 50 à 100 mg chacun) sont placés immédiatement lors du prélèvement dans 1 ml de TRIzol, à température ambiante, puis broyés mécaniquement (broyeur de Kontes, Sigma) dans les 20 minutes sous une hotte aspirante. Afin d'assurer une dissociation des complexes nucléoprotéiques, les échantillons sont ensuite laissés à reposer pendant 5 minutes à température ambiante. L'adjonction de chloroforme (0,2 ml par échantillon) est suivie d'une agitation vigoureuse pendant 15 secondes puis d'un contact prolongé à température ambiante (2 à 15 minutes). Les échantillons sont centrifugés à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C ce qui sépare le contenu des tubes en trois phases distinctes : une phase inférieure organique contenant les protéines, une interphase renfermant l'ADN et une phase supérieure aqueuse transparente contenant exclusivement l'ARN.

L'ARN est précipité dans la phase aqueuse supérieure par addition de 0,5 ml d'isopropanol par ml de TRIzol. Les tubes sont ensuite agités, laissés à température ambiante pendant dix minutes puis centrifugés à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot d'ARN est lavé par une solution d'éthanol à 75 % et centrifugé pendant 5 minutes à 7500 g à 4°C. Le culot est récupéré et séché à l'air puis remis en suspension dans un volume d'eau à 0,1% de diéthyl-pyrocabonate, un inhibiteur de nucléase. La pureté des échantillons d'ARN est calculée par le rapport des densités optiques à 260 et 280 nm. Un rapport égal ou supérieur à 1,7 indique l'absence de contamination de la préparation d'ARN par l'ADN.

Synthèse de l'ADNc par transcription réverse (RT)

La transcription réverse (RT) est réalisée dans un volume de 40 µl, en présence d'ARN (2 µg pour l'aorte, 5 µg pour les autres échantillons), 400 U de transcriptase réverse (virus reverse transcriptase de la leucémie du rat, Fermentas, Allemagne), 10 U d'inhibiteur de ribonucléase, 1 mM de désoxynucléotides triphosphates et 1 µM d'amorces p(dT)₁₅. Après l'addition d'ARN, du p(dT)₁₅ et de l'eau, le mélange réactionnel est incubé à 65°C pendant 5 minutes pour dénaturer l'ARNm. L'ADNc est synthétisé à 37°C pendant 1 heure. La transcription réverse est stoppée en chauffant les échantillons à 99°C pendant 5 minutes.

PCR Semi-Quantitative

L'ARN total est extrait des CMLRv et des CMLAo en culture par la technique au Trizol (Life Technologies) selon le protocole défini par le fournisseur. L'obtention des cDNAs totaux est réalisé par transcription réverse (RT) sur 2,5 à 10 µg d'ARN total dans un mélange contenant 400U de transcriptase réverse (Fermentas – Euromedex, Souffelweyerheim, France), 10U

d'inhibiteur de RNase (Life Technologies), 1mM de désoxynucléotides triphosphates (dNTP, Life technologies) et 1 μ M d'amorce non spécifique p(dT)₁₅ (Roche, Meylan, France) pendant 1 h à 37°C. L'amplification par PCR est réalisée avec 0.15 μ M d'amorces spécifiques, 0,4 mM de dNTP, 2,5 U de RedTaq DNA polymérase (Sigma) et 0,5 μ g d'ADNc. La PCR commence avec une dénaturation à 95°C pendant 4 min, puis les cycles sont programmés de la manière suivante : 1 min à 94°C (dénaturation), 1 min à 60°C (hybridation) et 1 min à 72°C (synthèse). La PCR est lancée pour 30 cycles pour la PTHrP et 24 cycles pour la GAPDH. Le dernier cycle est suivi d'une extension supplémentaire de 8 min à 72°C. Les produits de la PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% en présence de 0,5 μ g/ml de bromure d'éthidium. L'intensité des bandes obtenues après l'électrophorèse est quantifiée grâce à un logiciel d'analyse de gel (SigmaScanPro 4.01, Jandel Scientific, Erkrath, Germany).

	amorces	Sequences	Taille attendue (pb)
rR-PTH1	sens antisens	5' GGG CAC AAG AAG TGG ATC AT 3' 5' GGC CAT GAA GAC GGT GTA GT 3'	209
rGAPDH	sens antisens	5' CAT GGA GAA GGC TGG GGC TC 3' 5' AAC GGA TAC ATT GGG GGT AG 3'	415
rPTHrP (long)	sens antisens	5' CAG CGA GCG GCA CGA TGC TGC GGA 3' 5' GTG CAG TTT CCT GGG AGA CAG TT 3'	677
rPTHrP	sens antisens	5' ACA CCA AAA ACC ACC CTG TGC GGT 3' 5' GAA TCC TGT AAC GTG TCT TGG 3'	320
hPTHrP	sens antisens	5' ATG CGA CGG AGA CTG GTT CAG 3' 5' TCA ATG CCT CCG TGA ATC GAG CTC CAG CGA CGT 3'	535/508
Culline 3	sens antisens	5' CAG GGC TTA TTG GAT CTG 3' 5' GC CCT TTG ACT CCC TTT TTC 3'	180

Amplification de l'ADNc par PCR quantitative en temps réel

L'ADNc a été amplifiée par le LightCycler[®] (Roche Diagnostic, Meylan, France), en utilisant le kit Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) pour les produits de PCR de moins de 400 pb (rR-PTH1, rGapdh, rCullin-3). La PCR quantitative est réalisée dans un volume de 20 μ l en présence de 0,5 μ M d'amorces spécifiques sens et antisens du gène d'intérêt (tableau II-1), 1 μ g BSA, 0,6 U de Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG et 2 μ l d'ADNc (50 ng). Après une première dénaturation à 95°C, la PCR est réalisée en 45

cycles de dénaturation (5 s à 95°C) , d'amorçage (10 s à 55°C) et de polymérisation (10 s à 72°C pour le rR-PTH1, rRénine, rR-AT1, et 20 s pour la rGAPDH).

Pour les produits de PCR de plus de 400 pb (rPTHrP, hPTHrP), le kit LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green a été utilisé (Roche Diagnostic, Meylan, France). La PCR quantitative est également réalisée dans un volume de 20 µl en présence de 0,5 µM d'amorces spécifiques sens et antisens du gène d'intérêt mais cette fois-ci avec 4 mM de MgCl₂, 0,2 µM de sonde SYBR Green, 0,4 µM de sonde d'hybridation, 1x du tampon de réaction FastStart (DNA polymerase, dNTP, tampon) et 2 µl d'ADNc (50 ng). Après une première dénaturation à 95°C pendant 10 min, la PCR est réalisée en 45 cycles de dénaturation (10 s à 95°C), d'amorçage (5 s à 60°C) et de polymérisation (12 s à 72°C). Chaque échantillon a été analysé en double et quantifié selon le protocole du fournisseur (Roche Diagnostics). L'expression relative des différents gènes a été calculée en rapportant les taux d'ARNm à ceux de la GAPDH considérée comme gène domestique.

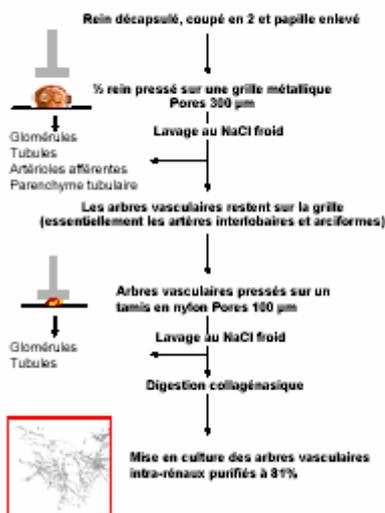
Analyse par Western Blot

La dénaturation des protéines est complétée dans le tampon Laemmli (0,0025% bleu de bromophénol, 5% SDS, 12,5% α-mercaptoéthanol, 160 mM Tris et 25% glycérol), à 100°C pendant 6 min. Vingt à 40 µg de protéines sont déposées sur un gel de concentration (acrylamide/bisacrylamide 30%, Tris 1 M, SDS 10 %, APS 10 %, TEMED) et séparées sur gel d'acrylamide 10% lors d'une migration de 2 h à 150 V. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 1 h à 100 V. Celle-ci est rincée avec du tampon phosphate additionné de 0,5% de Tween, avant d'être incubée dans 5% de lait écrémé pendant une nuit entière à 4°C afin de saturer les sites de liaison non spécifiques. Le lendemain, la membrane est exposée durant 1 h 30 à un anticorps primaire (anticorps polyclonal anti-R-PTH1 du rat, généré chez le lapin ; Babco, Richmond, USA) dirigé contre les acides aminés 248-262 de la 3^{ème} boucle extra-cellulaire du R-PTH1 de rat. Après 3 rinçages (3 fois 20 minutes) avec le tampon phosphate/Tween, la membrane est incubée durant 1 h avec l'anticorps secondaire (anticorps d'âne dirigé contre les immunoglobulines de lapin, et lié à la peroxydase de raifort ; Babco) avant d'être rincée à nouveau. L'immunoréactivité est révélée par un kit de détection ECL, avec production de luminol, visualisé par exposition (5 à 20 min) à un film photographique (Hyperfilm-ECL) en chambre noire. Les résultats sont analysés par densitométrie grâce au logiciel SigmaScan Pro (Jandel Scientific), comme précédemment pour la technique de PCR semi-quantitative.

Statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne +/- ESM. Les effets du stretch mécanique sur la prolifération des CMLRv et des CMLAo ont été comparés par analyse de variance à deux facteurs sur mesures répétées. Pour les autres comparaisons statistiques les valeurs ont été comparées par un t-test. Un $P < 0,05$ est considéré comme significatif.

Technique développée chez le rat

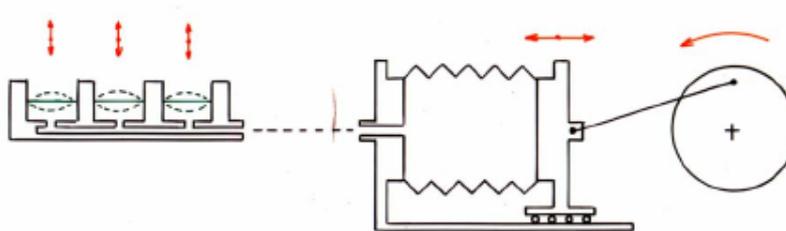


Technique adaptée pour la souris



Figure III.1. Isolement des arbres vasculaires intra-rénaux chez le rat (à gauche) et chez la souris (à droite). Notez l'utilisation de tamis dont les mailles plus fines pour les CMLV de souris et la moindre force à appliquer pour presser les reins.

A



B



Figure III.2: Appareillage servant au stretch mécanique.

(A) Représentation schématique de l'appareillage utilisé pour les expériences de stretch mécanique. Un moteur électrique entraîne la bielle fixée sur un disque en acier induisant un mouvement de va et vient au piston, entraînant successivement des déformations négatives sur les fonds flexibles par aspiration de l'air et des déformations positives par refoulement de l'air aspiré. L'amplitude de déformation et la vitesse de rotation, les deux composantes du stretch dans ces conditions sont réglables en modifiant le rayon de la fixation de la bielle sur le disque et la vitesse du moteur électrique respectivement. (B) Photographie représentant l'ensemble de l'appareillage.

Rôle de la PTHrP dans la prolifération des CMLV

Implication de la PTHrP sur la prolifération des CMLV soumises au stretch mécanique.

Chapitre III

INTRODUCTION

In vivo, au sein des vaisseaux au cours du cycle cardiaque, les CMLV des parois vasculaires sont soumises à des forces mécaniques (« stretch » mécanique) dont l'importance influence leur phénotype^(310, 311). Dans les conditions normales de stretch, les CMLV adoptent un phénotype quiescent et contractile. Dans les situations pathologiques, sous l'effet d'une augmentation de la pression artérielle, donc du stretch mécanique des parois vasculaires, les CMLV adoptent un phénotype prolifératif, hypertrophique et sécréteur conduisant à une hyperplasie et une hypertrophie des parois vasculaires, et cela plus particulièrement dans les vaisseaux de résistance^(311, 312).

Lorsque les CMLV sont soumises à un stretch mécanique expérimental par culture sur des boîtes à fond flexible, les données de la littérature présentent des résultats contradictoires avec soit une inhibition, soit une stimulation de la prolifération indépendamment non seulement de l'origine vasculaire des CMLV, mais également de l'importance du stretch imposé^(334, 339, 325). Ces résultats révèlent la complexité des mécanismes cellulaires mis en jeu par les CMLV en réponse au stretch^(312, 350). Il est important de noter dans le contexte de nos expériences que les précédentes études des effets du stretch mécanique sur la prolifération des CMLV restaient limitées aux cellules issues de vaisseaux de conductance (presque exclusivement l'aorte) et qu'aucune donnée n'est disponible concernant cet effet sur des CMLV issues de vaisseaux de résistance.

Comme nous l'avons déjà largement décrit dans la partie bibliographique, nous savons que la PTHrP est un régulateur de la croissance, de la différenciation et de la mort cellulaire dans les cellules normales et pathologiques. La PTHrP et son récepteur, le RPTH1, sont exprimés dans l'ensemble du système cardiovasculaire. L'expression de la PTHrP est stimulée par les vasoconstricteurs, les facteurs de croissances et le stretch mécanique. A côté de ses effets toniques, la PTHrP exerce des effets trophiques paradoxaux, à savoir une inhibition auto/paracrine *via* le RPTH1 et la stimulation de l'AMPC/PKA dont le mécanisme est détaillé dans le chapitre I.6.3.1 et une stimulation intracrine via translocation nucléaire du peptide largement décrit dans le chapitre I.6.3.2. Il est également intéressant de rappeler que ces effets sont reversés sur les CML rénovasculaires issues de rats hypertendus SHR⁽²⁴⁶⁾ avec une inhibition intracrine et une stimulation auto/paracrine de la prolifération. Ceci est une observation intéressante du fait que la PTHrP est surexprimée dans les CML rénovasculaires et les vaisseaux préglomérulaires qui contribuent largement à l'augmentation de la pression

artérielle dans l'hypertension génétique. Bien qu'aucune explication ne permette d'expliquer ce phénomène, toutes ces données sont en faveur pour un rôle régulateur de la PTHrP dans la régulation de la pression artérielle et le remodelage vasculaire.

Un nombre encore restreint d'études rapportent que le stretch mécanique, seul ou en combinaison avec l'angiotensine II, stimule l'expression de la PTHrP *in vivo* et *in vitro* dans les CMLV d'aorte de rat dans les conditions normales. En effet, Noda et coll. ⁽²³³⁾ ont montré que le stretch seul n'exerce pas d'effet sur l'expression de la PTHrP dans les CML aortiques, mais qu'il potentialise l'effet stimulateur de l'angiotensine II sur l'expression de la PTHrP. Cependant, dans cette étude l'expression de la PTHrP en réponse au stretch seul n'a été étudiée que sur une période de 8 h ce qui peut être insuffisant pour observer un effet significatif sur l'expression de la PTHrP. De leur côté, Pirola et coll. ⁽²³⁶⁾ ont montré que le stretch mécanique stimule d'environ 4 fois l'expression de la PTHrP dans les CML aortiques après 24 h sans effet significatif après 4 h de stretch. La aussi, l'angiotensine II potentialise les effets du stretch sur l'expression de la PTHrP. L'hypothèse avancée était que la PTHrP pourrait agir comme un facteur de compliance dans les conditions de stretch mécanique. Cependant dans ces travaux, la possibilité pour la PTHrP ainsi surexprimée d'exercer une activité sur la prolifération cellulaire n'a pas été étudiée. Un effet stimulateur du stretch sur l'expression de la PTHrP a également pu être vérifié dans un certain nombre de conditions pathologiques.

Ces données nous ont conduit à explorer l'implication de la PTHrP ainsi surexprimée au cours du stretch mécanique sur la prolifération des CMLV issues à la fois de vaisseaux de résistance (vaisseaux rénaux) et de conductance (aorte).

Pour cette étude, des cultures primaires de CML rénovasculaires et aortiques ont été utilisées. Nous avons utilisé pour chaque type cellulaire une lignée représentative de la moyenne en terme de prolifération (**Fig. III.1**) et qui est semblable aux précédents résultats ⁽²²⁶⁾.

RESULTATS ET DISCUSSION

Effet du stretch mécanique sur la prolifération des CMLV

Les résultats obtenus montrent qu'un stretch physiologique, c'est-à-dire avec une élévation de 10% à une fréquence de 1 Hz, inhibe la prolifération des CMLV en présence de 10% de sérum (**Fig. III.2A et III.2B**). Deux effets sont alors observés : tout d'abord un retard de

croissance de 2 jours suivit d'une densité cellulaire moindre au plateau. En absence de sérum, nous n'observons pas de différences entre les cellules stretchées ou non, indiquant que l'effet observé en présence de sérum n'est pas la conséquence d'une augmentation de l'apoptose. Ceci est vérifié par mesure de l'apoptose par la méthode TUNEL (**Fig. III.2C**) montrant que le stretch mécanique n'augmente pas l'index apoptotique.

Comme je l'ai déjà évoqué dans le chapitre I.9.5, les effets du stretch mécanique sur la prolifération des CMLV sont contradictoires. En effet, suivant les études on observe soit une stimulation ^(336, 337, 310, 325, 338), soit une inhibition ^(334, 337, 310, 339) de la prolifération. En regardant d'un peu plus près, le taux d'étirement ne semble pas être un facteur déterminant étant donné que pour un même stretch mécanique on retrouve soit une inhibition ⁽³³⁴⁾, soit une stimulation ⁽³³⁵⁾ de la prolifération. La seule différence entre ces travaux était la méthode utilisée pour l'obtention des cellules, à savoir, soit par la méthode en explant ⁽³³⁵⁾, soit par digestion collagénasique ⁽³³⁴⁾. Cependant, les autres études ne corroborent pas ce résultat. Une autre hypothèse pouvant expliquer ces résultats contradictoires pourrait venir du fait qu'il existe au sein d'un même vaisseau de nombreux phénotypes différents des CMLV ^(340, 247) et qu'elles ne répondraient pas de la même manière au stretch mécanique. Dans notre étude, nous observons qu'un stretch mécanique de 10% d'élongation inhibe la prolifération aussi bien dans les CML aortiques que rénovasculaires. Ce résultat n'est pas surprenant comparé aux données de la littérature et est tout à fait en accord avec le concept qu'un stretch mécanique dit physiologique inhibe la prolifération cellulaire ⁽³¹¹⁾. Cependant, les différences observées dans ces nombreuses études traduisent probablement la complexité des mécanismes cellulaires mis en jeu. Les résultats étant identiques pour les CML rénovasculaires et aortiques, pour une meilleure clarté, je ne présenterai plus que les résultats obtenus pour les CML rénovasculaires.

Effet du stretch mécanique sur l'expression de la PTHrP et le RPTH1

Sur la **figure III.3A**, en PCR quantitative, on peut remarquer que le stretch mécanique stimule fortement l'expression de la PTHrP, aussi bien en absence qu'en présence de sérum et ceci à partir de 24h. Cette surexpression de PTHrP n'est pas transitoire et persiste tout au long de l'expérience. Nous avons tenu à vérifier que cette surexpression d'ARNm de PTHrP se traduit également au niveau de la protéine. Du fait des faibles concentrations de PTHrP, le dosage par RIA n'est pas utilisable, nous avons donc réalisé cette étude par immunofluorescence pour la PTHrP (**Fig. III.3B**). On peut observer un marquage plus important pour les cellules stretchées par rapport aux cellules non stretchées, confirmant les résultats obtenus en PCR.

Concernant l'effet du stretch mécanique sur le RPTH1, nous observons une diminution du récepteur dans les cellules stretchées aussi bien en PCR qu'en Western Blot (**Fig. III.3C et III.3D**).

Ces résultats sont en accord avec les précédents travaux montrant une induction de la PTHrP par le stretch mécanique ^(233, 236). Cependant, il est important de noter quelques différences : Noda et coll. ⁽²³³⁾ rapportaient une stimulation rapide et transitoire de la PTHrP en combinaison avec l'angiotensine II avec un maximum d'expression à seulement 4h, alors que dans ce présent travail, nous n'observons pas d'augmentation de l'expression de la PTHrP à 4h de stretch mécanique par rapport aux conditions contrôles et ceci en présence ou non de sérum. D'une manière générale, ces deux précédentes études portaient sur un stretch mécanique n'excédant pas les 24h et uniquement sur des vaisseaux de conductance. Nous montrons ici que le stretch mécanique stimule non seulement l'expression de PTHrP dans les CMLV issues de vaisseaux de conductance mais également de résistance, et que cette stimulation est durable car l'expression de la PTHrP reste augmentée tout au long de l'expérience, et donc jusqu'au moins 96h. Ceci est un point important dans une perspective physiopathologique telle que l'hypertension artérielle où les forces mécaniques sont continuellement augmentées.

Implication de la PTHrP dans l'inhibition de la prolifération par le stretch mécanique

Nous venons de voir que le stretch mécanique inhibe la prolifération cellulaire et qu'il stimule l'expression de la PTHrP. Il se pose donc la question du rôle de la PTHrP dans le phénomène observé. Afin de répondre à ces questions, les CMLV ont été transfectées par des plasmides comprenant soit la PTHrP en orientation antisens soit en orientation sens. En orientation antisens, la transfection diminuait fortement l'expression de la PTHrP (**Fig. III.4A**). Cette construction n'a pas d'effet sur la prolifération de ces cellules (**Fig. III.4B**). Cependant, cette absence d'effet pourrait être due à un manque d'efficacité de la construction pour faire face à l'augmentation de l'expression de la PTHrP en réponse au stretch mécanique (**Fig. III.4D**). Concernant les résultats obtenus avec la transfection de la PTHrP en orientation sens, il est tout à fait intéressant de noter que cette construction a pour effet de reverser l'effet inhibiteur du stretch mécanique sur la prolifération des CMLV (**Fig. III.4C**). Dans notre système, nous pouvons ainsi dire que le stretch mécanique stimule l'expression de la PTHrP et que la PTHrP s'oppose à l'effet inhibiteur du stretch mécanique sur la prolifération

cellulaire. Cependant il reste à déterminer si l'effet observé ici est un effet intracrine ou auto/paracrine étant donné que suivant les cas, les deux peuvent stimuler la prolifération cellulaire ^(227, 246). Pour répondre à cette question, nous avons recherché en immunofluorescence la localisation subcellulaire de la PTHrP et nous retrouvons un marquage nucléaire de la PTHrP dans les cellules transfectées (**Fig. III.5A**). Ceci argumente en faveur d'un effet intracrine de la PTHrP. Afin de vérifier cette hypothèse, les CMLV ont été transfectées par une PTHrP mutante déléetée de sa SLN (**Fig. III.5B**). Cette transfection ne modifie pas la réponse proliférative des CMLV soumises au stretch mécanique (**Fig. III.5C**) et ne reproduit pas l'effet observé sur les cellules transfectées par la PTHrP entière montrant qu'il s'agit bien d'un effet intracrine de la PTHrP. De même, l'application de la PTHrP exogène ou de l'antagoniste du RPTH1 (**Fig. III.5D et III.5E**) ne reproduit pas ces effets excluant par là un effet auto/paracrine de la PTHrP dans ce système. Ces résultats montrent que dans le stretch mécanique, la PTHrP s'oppose à l'effet inhibiteur du stretch sur la prolifération des CMLV par la voie intracrine.

Mécanisme de la stimulation de la PTHrP par le stretch mécanique

Des études précédentes montraient que le stretch mécanique stimule l'expression de la PTHrP en combinaison avec l'angiotensine II ⁽²³³⁾ ou potentialise son effet ⁽²³⁶⁾. D'autres part, plusieurs études rapportent que le stretch mécanique stimule le système rénine angiotensine local ^(325, 327, 331, 336) et que l'angiotensine II stimule l'expression de la PTHrP ⁽²³¹⁾. Ces données sont en faveur d'un rôle central de l'angiotensine II dans la surexpression de PTHrP en réponse au stretch mécanique. Afin de vérifier cette hypothèse, les CMLV ont été stretchées en présence de losartan, un antagoniste sélectif des R-AT1 (**Fig. III.6A**). D'une manière surprenante, le blocage du système rénine angiotensine est sans effet sur la surexpression de PTHrP. L'effet observé à 4h est du à la stimulation de l'expression de la PTHrP par le sérum, lequel contient de l'angiotensine II. Ce résultat inattendu peut toutefois s'expliquer par le fait que dans les précédentes études ^(233, 236), l'induction de l'expression de la PTHrP était étudiée sur des temps très courts allant de 4 à 24h, posant par la même occasion des questions sur la pertinence physiologique de ces résultats, qui je le rappelle sont rapportés à l'hypertension artérielle qui naturellement perdure dans le temps. Ainsi dans notre système, le stretch mécanique induit une surexpression de PTHrP indépendante de l'angiotensine II. Je pense également qu'il est important de signaler ici que la même étude a été réalisée sur le RPTH1, montrant que sa dérégulation est dépendante de l'angiotensine II. Nous nous sommes ensuite demandés par quel mécanisme le stretch mécanique stimule

l'expression de la PTHrP. La transfection par une construction codant pour la chloramphenicol acetyltransferase (CAT) sous la dépendance des promoteurs de la PTHrP a montré que le stretch n'affecte pas l'activité transcriptionnelle du gène de la PTHrP (**Fig. III.6B**). L'étude de la stabilité de l'ARNm de la PTHrP par l'actinomycine D révélait par contre que le stretch mécanique stabilise l'ARNm de la PTHrP (**Fig. III.6C**). Ainsi, le stretch mécanique va augmenter l'expression de PTHrP par la stabilisation de son ARNm. Il est intéressant de noter à ce niveau que le stretch mécanique induit rapidement l'expression de HIF1 α dans les CMLV⁽³²⁴⁾. Cette donnée est à rapprocher de celles obtenues sur les cellules issues de carcinomes rénaux⁽²⁹⁸⁾ où nous avons montré que le gène VHL régule la stabilité de l'ARNm de la PTHrP. En effet, la transfection du gène VHL dans les lignées cancéreuses déficientes en VHL diminuait la demi-vie de l'ARNm de la PTHrP. Or, le VHL fait parti du complexe E2 ubiquitine ligase qui va polyubiquitinyler HIF1 α ⁽³⁵¹⁾, qui est responsable de la stabilisation de l'ARNm de la PTHrP, le conduisant ainsi au protéasome pour y être détruit. Ainsi, on peut spéculer que l'induction de HIF1 α par le stretch mécanique va stabiliser l'ARNm de la PTHrP.

Pris ensemble, ces résultats montrent que le stretch mécanique inhibe la prolifération des CMLV indépendamment de leur origine et stimule de façon durable l'expression de PTHrP par stabilisation de son ARNm. La PTHrP ainsi surexprimée utilise préférentiellement la voie intracrine par translocation nucléaire du peptide dans le noyau où elle stimule la prolifération et s'oppose ainsi à l'effet inhibiteur du stretch mécanique sur la prolifération cellulaire. Ces résultats tendent à suggérer que dans des conditions où les forces mécaniques sont augmentées comme dans l'hypertension artérielle ou la resténose après angioplastie, la PTHrP pourrait participer à l'hyperplasie des parois vasculaires. D'autre part, les études précédentes^(233, 236) présentaient la PTHrP comme un facteur de compliance, jouant ainsi un rôle bénéfique dans l'hypertension artérielle. Or, le stretch mécanique induit une dérégulation du RPTH1, un résultat également retrouvé *in vivo* chez les rats hypertendus SHR⁽²²¹⁾ présentant par la même occasion une vasodilatation moindre à la PTHrP. Ces données suggèrent que la PTHrP, qui est je le rappelle surexprimée, va préférentiellement utiliser la voie intracrine dans ces conditions par rapport à la voie auto/paracrine. Il reste cependant à définir son rôle exacte : participe-t-elle effectivement à l'hyperplasie vasculaire, agissant alors comme un facteur aggravant ? Ou agit-elle comme un facteur bénéfique, limitant ainsi l'hyperplasie vasculaire étant donné les effets inversés observés chez le SHR⁽²⁴⁶⁾ où la voie intracrine inhibe la

prolifération cellulaire ? La question du comment et dans quelles conditions les effets de la PTHrP sont inversés comme chez le SHR reste ouverte : s'agit-il d'un fond génétique spécifique aux SHR ou d'un phénomène commun observé dans des cas pathologiques ? La réponse à cette question est incontournable pour connaître le rôle exact de la PTHrP dans ces pathologies.

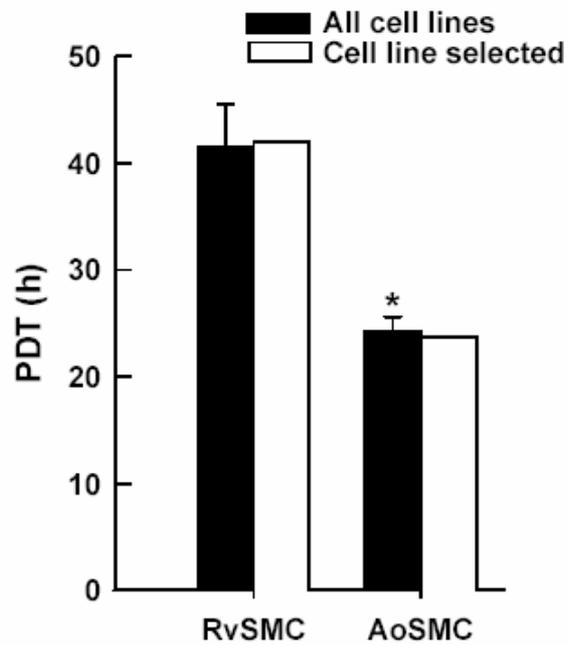


Figure III.1. Temps de doublement exprimé en heure (ou Population Doubling Time : PDT) pour les CMLRv (RvSMC) et CMLAo (AoSMC) de rats Wistar. La moyenne de toute les lignées est représentée en noir et la moyenne de la lignée utilisée pour les expériences de stretch mécanique en blanc. * $P < 0,05$, RvSMC vs AoSMC ; $n = 8$.

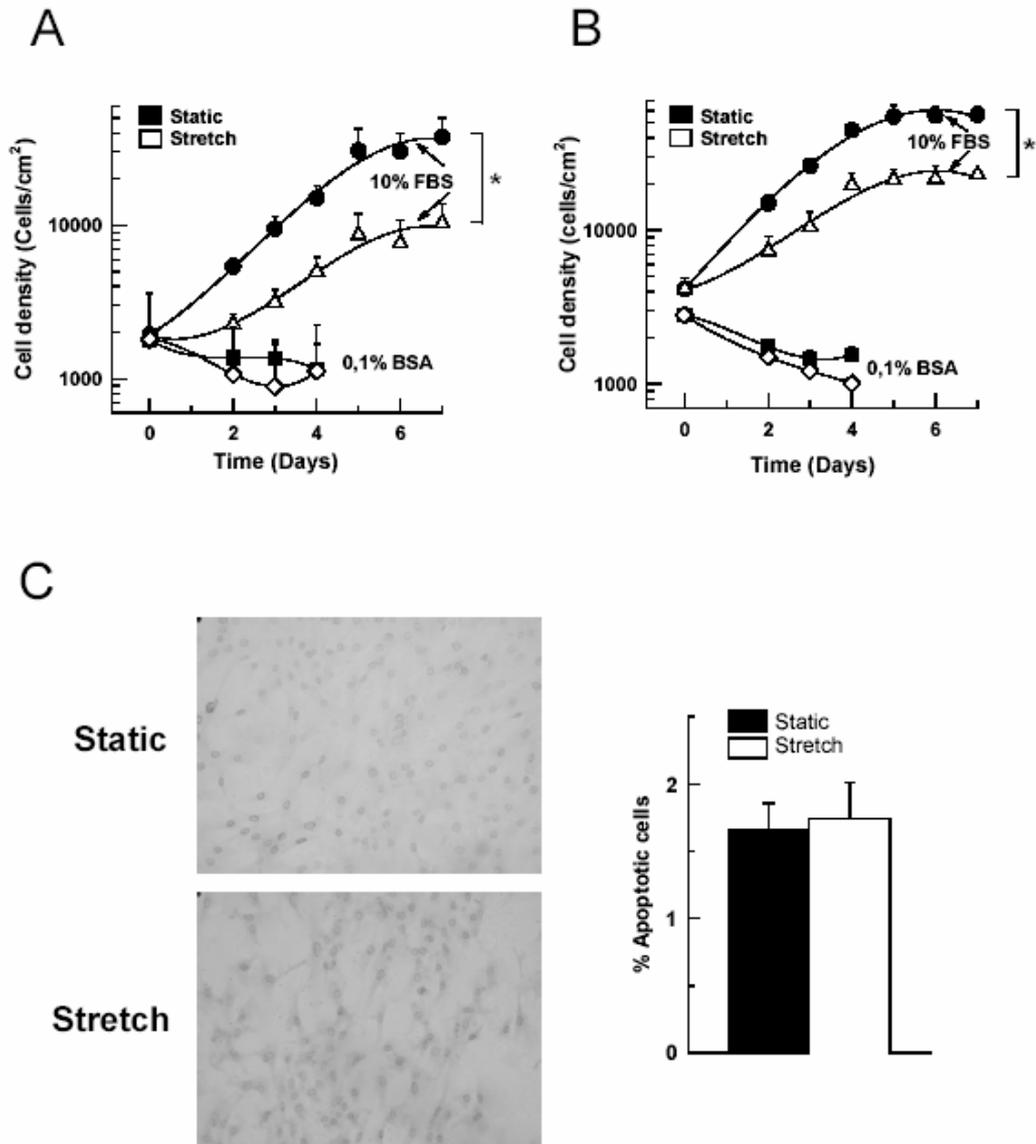


Figure III.2. Effet du stretch mécanique sur la prolifération des CMLRv (A) et CMLAo (B). Les cellules ont été mises en culture dans des boîtes de type Flexcell à une densité de 4000 cellules/cm² et soumises à un stretch mécanique de 10% à 1 Hz en présence (10% FBS) ou non (0,1% BSA) de sérum après une période de quiescence de 48h. Les cellules adhérentes ont été comptées aux temps indiqués. En absence de sérum, les cellules ne prolifèrent pas. En présence de sérum, le stretch mécanique induit une inhibition de la prolifération des CMLV quelque soit leur origine. Notez la densité cellulaire au plateau plus faible des cellules stretchées. La mesure de l'apoptose par la méthode TUNEL (C) montre que le stretch mécanique n'augmente pas la mort cellulaire des CMLV indiquant que l'effet observé en A et B n'est pas la conséquence d'une augmentation de l'apoptose. Les résultats sont représentés en +/- SEM (n = 3 en absence de sérum et n = 10 en présence de sérum). * P < 0,01.

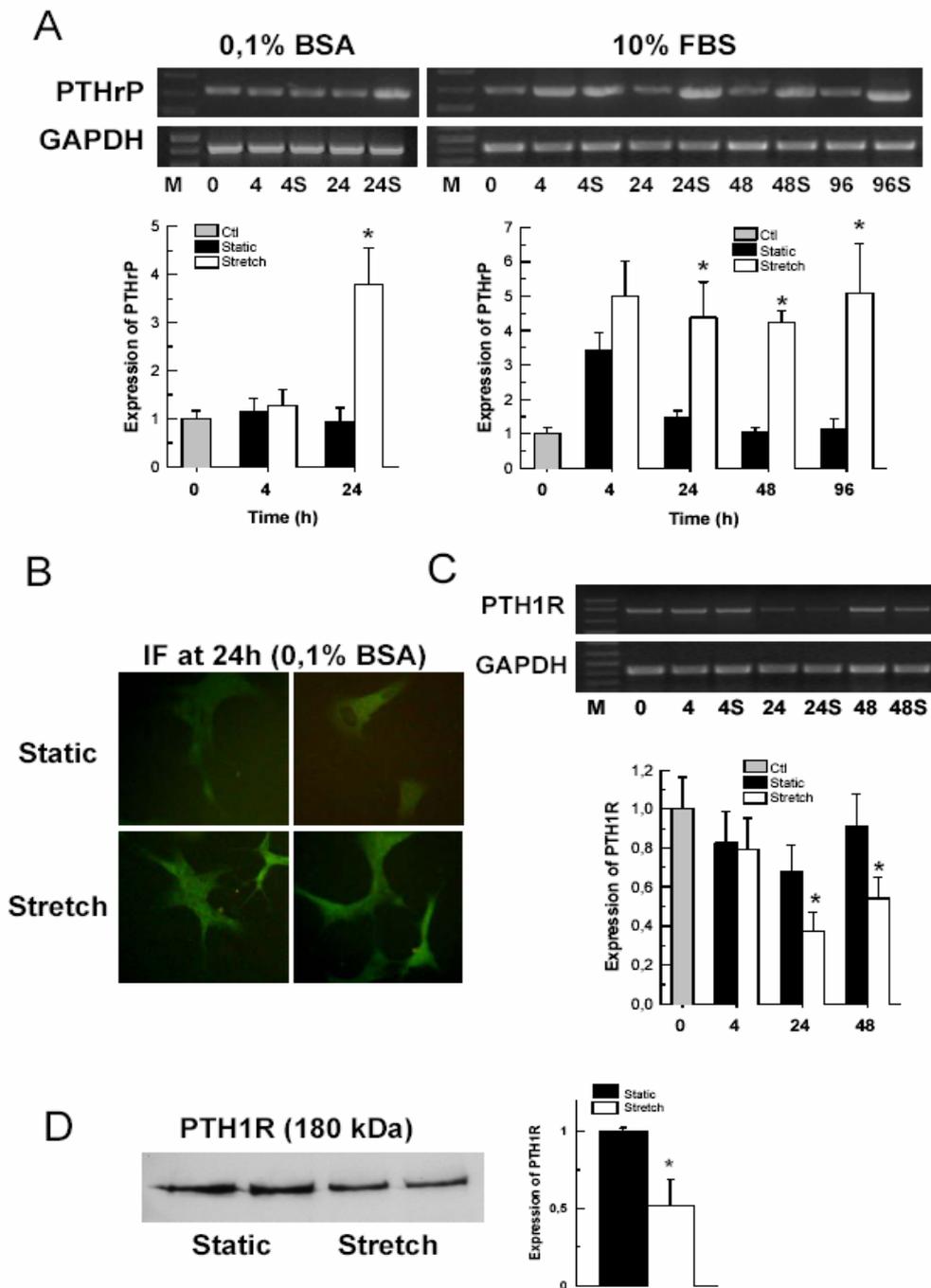


Figure III.3. Effet de 10% de stretch mécanique sur l'expression de la PTHrP et du RPTH1 sur les CMLV. L'analyse de l'expression de la PTHrP des CMLV a été réalisée par PCR quantitative, normalisée par rapport à l'expression de la GAPDH (A) et par immunofluorescence pour la PTHrP (B). L'expression du RPTH1 a été mesurée par RT-PCR semi quantitative, normalisée par rapport à la GAPDH (C) et par western blot (D). (A) En absence de sérum, le stretch mécanique stimule l'expression de PTHrP au bout de 24h. En présence de sérum, l'expression de PTHrP est stimulée dès 4h par le sérum et à partir de 24h par le stretch mécanique, une stimulation qui se maintient tout au long de l'expérience. (B) Immunofluorescence pour la PTHrP des CMLV en absence de sérum et stretchées ou non pendant 24h. Les cellules stretchées présentent un marquage plus intense que les cellules non stretchées indiquant une surexpression de PTHrP. (C) Expression du RPTH1 dans les CMLV stretchées et contrôle, par RT-PCR semi quantitative. L'ARNm du RPTH1 est diminué dans les CMLV stretchées comparé aux CMLV non stretchées après 24 et 48h de stretch mécanique. (D) Expression du RPTH1 par western blot après 3 jours de stretch mécanique sur les CMLV. Le stretch mécanique diminue l'expression du RPTH1. * $P < 0,01$

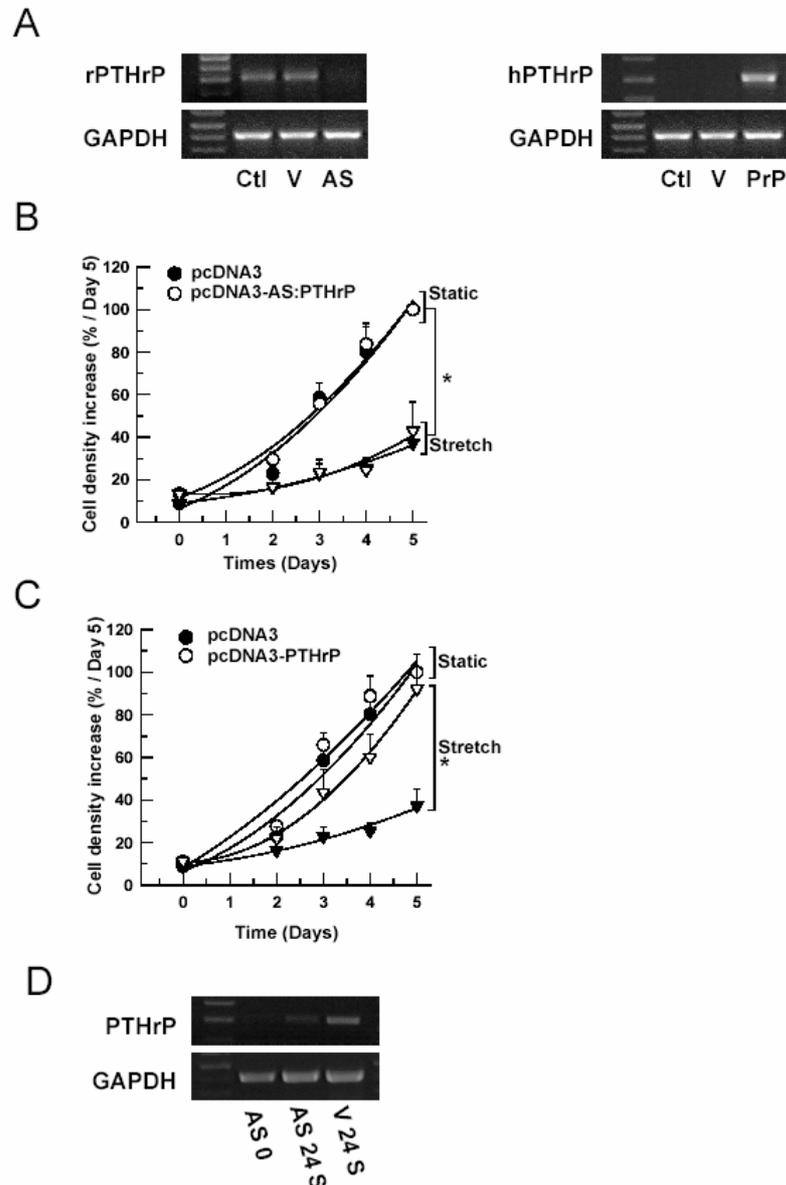


Figure III.4. La PTHrP induite par le stretch mécanique s'oppose à l'effet inhibiteur du stretch mécanique sur la prolifération des CMLRv. (A) RT-PCR de la rPTHrP (rat) et hPTHrP (humaine) sur les cellules contrôles (Ctl), transfectées par le vecteur seul (V), par la PTHrP en orientation antisens (AS) et par la PTHrP humaine (PrP). La transfection par la construction antisens diminue l'expression de la PTHrP endogène et la transfection par la PTHrP humaine induit une surexpression de PTHrP. (B) Le graphique représente la prolifération des CMLRv transfectées soit par le vecteur seul (pcDNA3), soit par la PTHrP antisens (pcDNA3-AS :PTHrP) et stretchées ou non. La transfection par l'antisens de la PTHrP n'affecte pas la prolifération cellulaire. Pour la clarté des résultats, les courbes de proliférations sont représentées en +/- SEM (n = 5) et calculées à partir de la densité cellulaire au jour 5, défini comme étant égale à 100% dans les CMLRv non stretchées. (C) Le graphique représente la prolifération des CMLRv transfectées soit par le vecteur seul (pcDNA3), soit transfectées par la PTHrP humaine (pcDNA3-PTHrP) et stretchées ou non. Dans les CMLRv transfectées par la PTHrP, la prolifération n'est plus inhibée par le stretch mécanique. Pour la clarté des résultats, les courbes de proliférations sont représentées en +/- SEM (n = 5) et calculées à partir de la densité cellulaire au jour 5, définie comme étant égale à 100% dans les CMLRv non stretchées. * P < 0,01. (D) RT-PCR de la PTHrP et la GAPDH pour les cellules transfectées par la PTHrP en orientation antisens (AS) à 0 et 24h de stretch et pour les cellules transfectées par le vecteur seul à 24h de stretch. On observe que l'efficacité de la construction antisens n'est pas assez forte pour palier à la surexpression de PTHrP induite par le stretch mécanique.

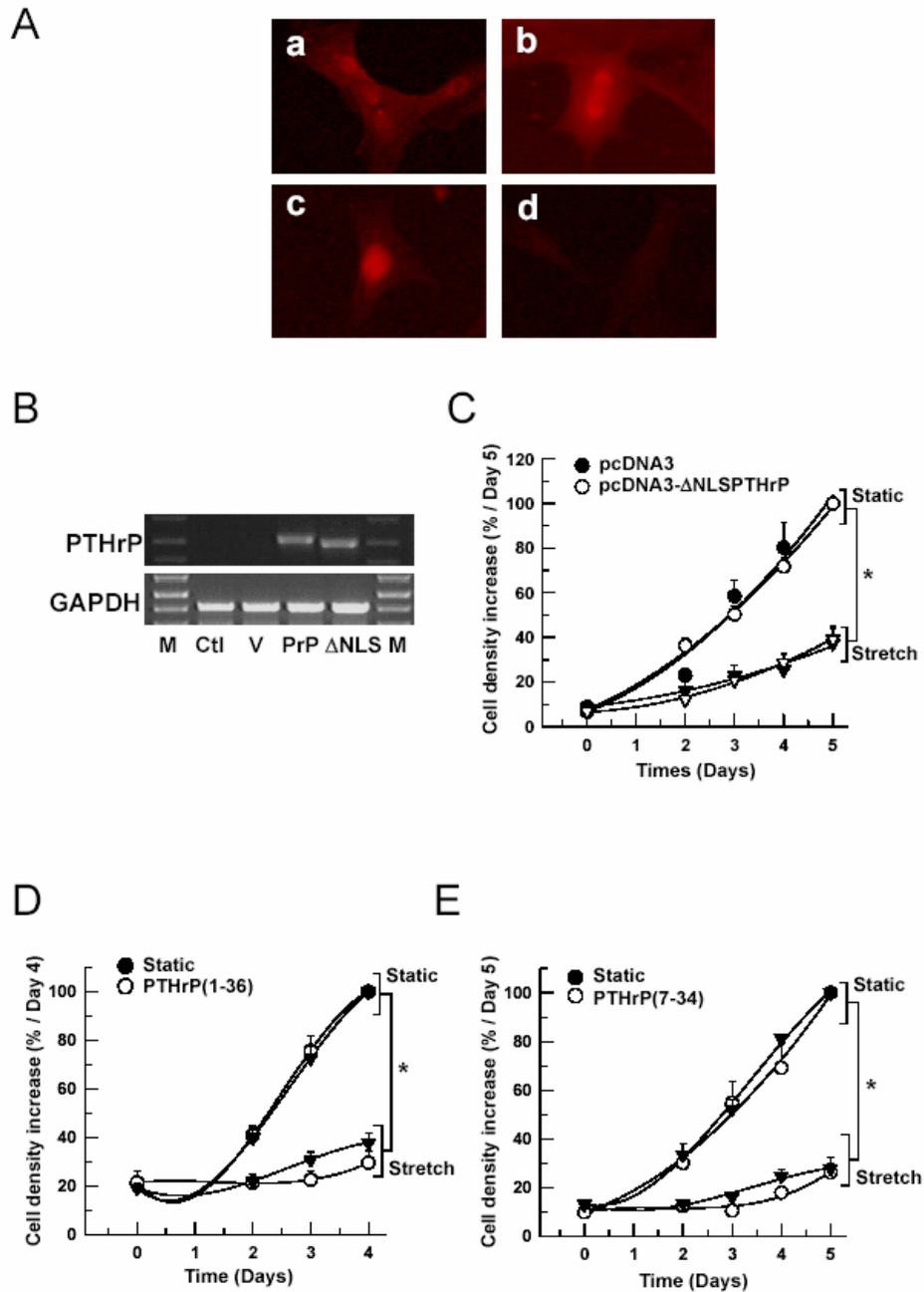


Figure III.5. La PTHrP agit par une voie intracrine et s'oppose à l'effet inhibiteur du stretch mécanique sur la prolifération cellulaire. (A) L'immunofluorescence pour la PTHrP dans les CMLRv transfectées par la PTHrP montre un marquage cytoplasmique et nucléaire (a-c), (d) est un contrôle négatif. (B) RT-PCR de la PTHrP humaine dans les cellules contrôles (Ctl), transfectées par le vecteur seul (V), la PTHrP (PrP, 535 pb) et la PTHrP dépourvue de séquence de localisation nucléaire (Δ NLS, 508 pb). (C) Le graphique représente la prolifération des CMLRv transfectées soit par le vecteur seul (pcDNA3), soit transfectées par la PTHrP(Δ NLS) (pcDNA3- Δ NLSPTHrP) et stretchées ou non. La transfection par cette construction n'affecte pas la prolifération des CMLV qu'elles soient stretchées ou non. (D et E) Les graphiques représentent la prolifération des CMLRv continuellement exposées à la PTHrP(1-36) exogène (D) ou à la PTHrP(7-34), un antagoniste du RPTH1 (E). La présence de l'agoniste ou l'antagoniste du RPTH1 ne modifie pas la prolifération des CMLRv stretchées ou non. Pour la clarté des résultats, les courbes de proliférations sont représentées en \pm SEM (n = 5) et calculées à partir de la densité cellulaire au jour 5, définie comme étant égale à 100% dans les CMLRv non stretchées. * P < 0,01. Grossissement de 400x en A.

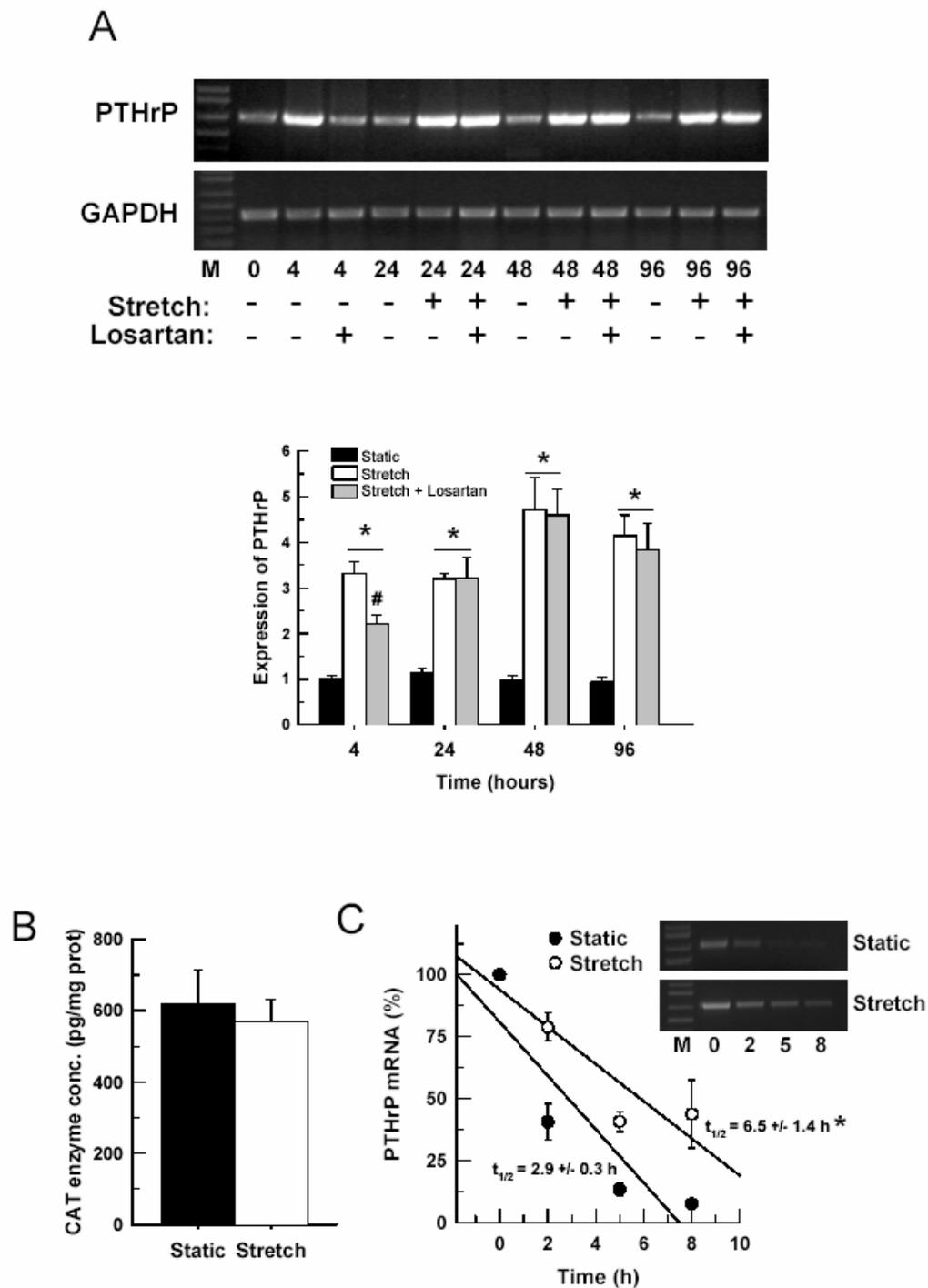


Figure III.6. Mécanisme de la stimulation de l'expression de la PTHrP par le stretch mécanique. (A) PCR quantitative de la rPTHrP et de la GAPDH dans les CMLRv stretchées ou non et en présence ou non de 10^{-7} M de losartan, un antagoniste des R-AT1 de l'angiotensine II. Le profil d'expression de la PTHrP n'est pas altéré par la présence d'un antagoniste de l'angiotensine II. (B) Le graphique représente l'expression de la chloramphenicol acetyltransferase (CAT) dans les CMLRv transfectées transitoirement par une construction composée du gène de la CAT sous la dépendance des promoteurs de la PTHrP. Le stretch ne modifie pas l'activité transcriptionnelle des promoteurs de la PTHrP. Les résultats sont exprimés en \pm SEM (n = 6). (C) Augmentation de l'ARNm de la PTHrP dans les CMLRv stretchées comparé aux cellules non stretchées. Les résultats sont exprimés en \pm SEM (n = 3). * P < 0,01.

Rôle de la PTHrP dans la prolifération des CMLV

Etablissement des lignées de CMLV délétées pour la PTHrP

Chapitre IV

INTRODUCTION

Les travaux antérieurs ont montré que la PTHrP présente de nombreuses propriétés sur la croissance et la survie cellulaire. Cependant, ces études n'ont jamais pu aborder le problème d'une manière directe, c'est-à-dire en étudiant l'effet propre de la PTHrP exprimée dans les cellules et non l'effet de d'une surexpression artificielle. Comme je l'ai déjà mentionné dans le chapitre I.10, les modèles d'animaux transgéniques invalidant le gène de la PTHrP ou du RPTH1 se sont toujours révélés létaux du fait de nombreuses anomalies du développement du squelette ⁽³⁵²⁾. Afin de contourner l'ossification prématurée des chondrocytes, des souris « rescues » ont été développées à partir des souris invalidées pour la PTHrP mais exprimant la PTHrP dans les chondrocytes ⁽¹¹²⁾. Ces souris se sont révélées d'une grande fragilité et n'ont pas pu être utilisées pour l'étude de la PTHrP sur la prolifération des CMLV. Les souris transgéniques développées par l'équipe de Clemens surexprimant soit la PTHrP, soit le RPTH1, soit les deux ^(202, 168, 169) présentent, malgré leur intérêt, la même problématique que les cultures cellulaires *in vitro* surexprimant la PTHrP par transfection. Il est évident que les précédentes études posent la question de la pertinence physiologique de ces résultats. De ce constat est né l'idée d'établir des lignées de CMLV invalidées pour la PTHrP étant donné l'échec des souris transgénique comme je l'ai décrit dans le chapitre I.10.

RESULTATS ET DISCUSSION

Pour cela, nous disposons de souris dont l'exon 4 du gène de la PTHrP, qui je le rappelle, code pour la majeure partie de la protéine, a été entouré de séquences Lox P ⁽³⁴¹⁾. Ces séquences Lox P peuvent être recombinaées par apport de la Cre recombinase par transfection, invalidant ainsi le gène de la PTHrP. Ce modèle présente l'avantage de pouvoir disposer de cellules dont l'origine est commune entre les cellules contrôles et les cellules invalidées pour la PTHrP, limitant ainsi les variabilités expérimentales.

L'obtention des arbres vasculaires intrarénaux des cellules de souris a été réalisée suivant la technique développée par Endlich et coll. ⁽²²⁶⁾ et adaptée à la souris en utilisant des tamis de mailles plus fines du à l'extrême fragilité de ces arbres vasculaires (**Fig. II.1**) Les

explants d'aorte ont été obtenus par la méthode traditionnelle. Ces cellules ont été mises en culture et caractérisées par une croissance en monts et vallées, leur aspect fusiforme et le marquage positif à l' α -actine (**Fig. IV.1B**).

Excision de la PTHrP dans les CMLV de souris

Différents clones de CML aortiques et rénovasculaires présentant des caractéristiques de croissance proches de celles obtenues auparavant (**Fig. IV.1A**) ont été sélectionnés par dilution et transfectés avec des plasmides codant pour la Cre recombinase. La vérification de l'efficacité de l'excision de la PTHrP a été réalisée par RT-PCR et visualisée sur gel d'agarose (**Fig. IV.1C**). Les clones présentant les taux d'efficacité les plus élevés ont été sélectionnés pour la suite des expériences. Ces clones ont ensuite été transfectés par des plasmides codant pour différentes PTHrP : la PTHrP(Δ NLS) dépourvue de la SLN, lui interdisant l'accès au noyau et la PTHrP(Δ SP) dépourvue de séquence signal, ne lui permettant plus d'être sécrétée. Ces différentes transfections vont permettre de décomposer l'effet de la PTHrP : d'une part l'effet de la PTHrP endogène en comparant les cellules délétées aux cellules sauvages, d'autre part l'effet de la PTHrP en dissociant l'effet intracrine (Δ SP) de l'effet de la PTHrP auto/paracrine (Δ NLS).

Implication de la PTHrP dans la prolifération des CMLV

La prolifération des cellules précédemment décrites a été mesurée par incorporation de BrdU et mesure de viabilité par test MTT. Les résultats obtenus montrent qu'en présence de sérum (10, 5 et 1% de FBS), l'excision de la PTHrP tend à diminuer la prolifération des CMLV (**Fig. IV.1D et IV.1E**), un effet qui n'est plus observé en absence de sérum étant donné que cette privation a pour effet de rendre les cellules quiescentes. La transfection de la PTHrP(Δ NLS) accentue cette inhibition, en accord avec l'effet auto/paracrine de la PTHrP sur la prolifération cellulaire. La transfection par la PTHrP(Δ SP) stimule quant à elle la prolifération cellulaire comparé aux cellules délétées et contrôles, encore une fois en accord avec l'effet stimulateur de la PTHrP intracrine sur la prolifération cellulaire. Ces résultats montrent d'une part la validité du modèle à reproduire les effets connus de la PTHrP sur la prolifération des CMLV et d'autre part, renseignent sur le rôle endogène de la PTHrP. En effet, il était auparavant impossible de définir la voie ou l'effet prédominant de la PTHrP normalement exprimée dans les CMLV. Ces résultats, montrent que la PTHrP endogène stimule la prolifération cellulaire, ou plutôt est un facteur de survie cellulaire étant donné que la mesure de viabilité cellulaire

par test MTT (**Fig. IV.1E**) présente des différences beaucoup plus importantes entre les cellules contrôles et les cellules délétées pour la PTHrP que l'incorporation de BrdU (**Fig. IV.1D**). Des observations similaires avaient déjà pu être relevées sur des CMLV de rat transfectées par la PTHrP qui résistaient davantage à la privation de sérum que les cellules non transfectées (résultats non publiés). Dans la même optique, les travaux de Schorr et coll. ⁽³⁵³⁾ ont montré que dans les cellules endothéliales de coronaires, la PTHrP entre dans le noyau des cellules en confluence et inhibe l'apoptose mais reste sans effet sur la prolifération cellulaire. Ainsi, il semble que dans des conditions d'expression normale de la PTHrP, celle-ci soit plus impliquée dans la survie que la prolifération cellulaire. Cette hypothèse suggère que la PTHrP est plutôt à considérer comme un facteur de survie cellulaire dans des conditions où elle est normalement exprimée, et qu'elle exerce ses effets prolifératifs et/ou antiprolifératifs lorsque son expression est stimulée et dépasse un certain seuil. Cet effet de seuil avait déjà pu être observé auparavant, notamment dans les CMLV de rats où en dessous d'un certain seuil d'expression de PTHrP aucun effet n'était visible. Les résultats présentés ici sont trop minces pour affirmer de telles suppositions et des expériences supplémentaires sont nécessaires pour y répondre. Cependant, mes expériences ont permis de montrer la validité du modèle, rendant ainsi leur utilisation possible pour analyser les effets de la PTHrP sur un système donné. Ceci a pu être le cas dans les travaux de Sandra Welsch sur la dérégulation du RPTH1 par l'angiotensine II et la PTHrP. Il est également à noter que ces cellules ont fait l'objet d'un transfert de technologies avec l'équipe du Dr. Stewart de la division d'endocrinologie et du métabolisme de l'université de Pittsburgh aux USA.

Dérégulation du RPTH1 par l'angiotensine II et la PTHrP : un exemple de l'apport des CMLV délétées pour la PTHrP

En résumé, ces travaux ont montré que la dérégulation du RPTH1 est dépendante d'un effet synergique de l'angiotensine II et de la PTHrP intracrine. Ceci a pu être démontré grâce aux CMLV délétées pour la PTHrP et à la transfection de ces cellules avec la PTHrP(Δ SP). Ces travaux sont un parfait exemple de l'utilisation de ce modèle cellulaire, de sa potentialité et son efficacité à répondre à des questions précises sur le rôle de la PTHrP. En outre, ce modèle peut être appliqué à d'autres types cellulaires, et ceci en partant de culture primaire issue de cellules ou tissus de souris floxées pour la PTHrP et transfectées par la Cre recombinase.

Perspectives

Un projet qui me tenait également à cœur mais qui n'a malheureusement pu être réalisé durant ma thèse est l'utilisation de ces cellules et des différentes transfections de PTHrP mutantes sur des puces à ADN. L'utilisation d'une telle technique permettrait probablement d'identifier très efficacement les cibles nucléaires de la PTHrP étant donné que l'on pourrait comparer directement l'expression génique des cellules sans PTHrP aux cellules exprimant la PTHrP(Δ SP) agissant uniquement par la voie intracrine. Les différences d'expression permettraient de définir les cibles induites par la PTHrP intracrine dans les cellules et de permettre au laboratoire d'identifier en exclusivité les cibles nucléaires de la PTHrP, faisant suite aux précédents travaux sur la découverte de l'effet intracrine de la PTHrP dans les CMLV ⁽²²⁷⁾, de ses effets opposés dans les CMLV de rat SHR ⁽²⁴⁶⁾ et plus récemment d'identifier le mécanisme précis de déstabilisation de l'ARNm du RPTH1 par l'angiotensine II impliquant la PTHrP intracrine (Sandra Welsch, manuscrit soumis).

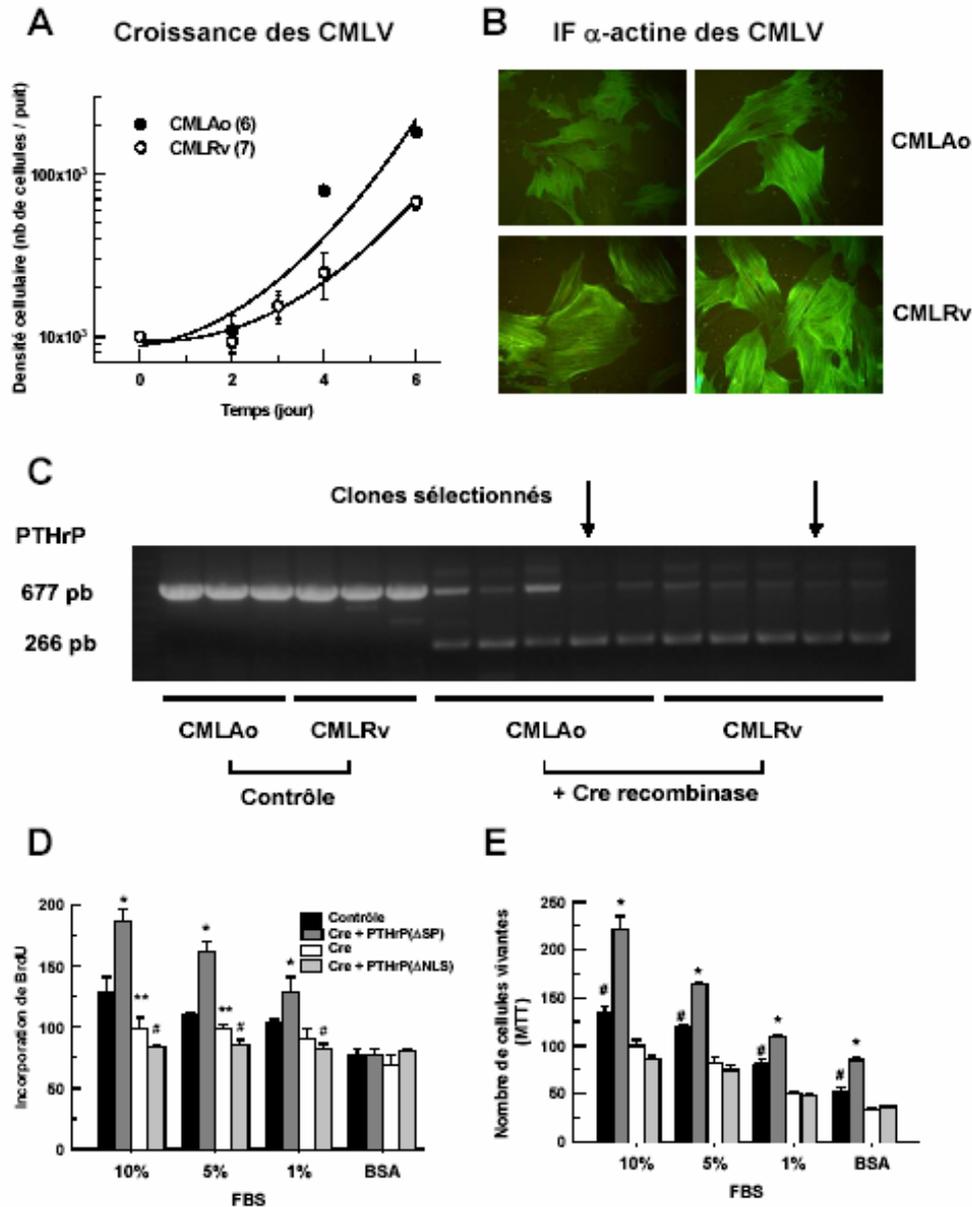


Figure IV.1. Etablissement des lignées de CMLV délétées pour la PTHrP.

(A) Caractéristiques de croissance des CMLV de souris. Les CMLAo prolifèrent plus rapidement que les CMLRv, des résultats très proche de ceux obtenus pour les CMLV de rat. (B) Immunofluorescence pour l' α -actine des CMLV. Les lignées cellulaires obtenues présentent des réseaux denses et parallèles d'actine, caractéristique des CMLV. (C) RT-PCR pour la PTHrP des CMLV contrôles et transfectées par la Cre recombinase. Les CMLV contrôles présentent une bande à 677 pb correspondant à la taille prédéfinie par les primers de la PTHrP utilisés. Les CMLV transfectées par la Cre recombinase présentent une double bande à 677 pb et 266 pb correspondant à la PTHrP entière et à la PTHrP délétée de l'exon 4. Plus la bande à 677 pb est faible, plus l'efficacité de l'excision est grande. Les flèches représentent les clones utilisés pour les expériences suivantes. Mesure de la prolifération par incorporation de BrdU (D) et de la viabilité cellulaire par MTT (E) à différentes concentrations de sérum et en absence de sérum. L'excision de la PTHrP et la transfection par la PTHrP(Δ NLS) diminuent la prolifération/survie cellulaire par rapport aux CMLV contrôles. A noter un effet plus marqué par test de viabilité MTT indiquant probablement un effet sur la survie cellulaire. La transfection par la PTHrP(Δ SP) stimule la prolifération cellulaire. * $P < 0,01$ PTHrP(Δ SP) vs autres transfections, ** $P < 0,05$ Cre vs Contrôle, # $P < 0,05$ PTHrP(Δ NLS) vs Contrôle (D), Contrôle vs Cre et PTHrP(Δ NLS) (E).

Identification d'une cible nucléaire de la PTHrP

La Culline 3

Chapitre V

INTRODUCTION

Un des enjeux actuels dans le domaine de la PTHrP est comme je l'ai déjà indiqué précédemment, l'identification de ses cibles nucléaires. Bien que les effets intracrines de la PTHrP sur la prolifération ou la mort cellulaire aient été clairement démontrés, le devenir de la PTHrP dans le noyau reste un mystère. En 1999, Aarts et coll.,⁽²⁹⁵⁾ montraient la capacité de la PTHrP à se lier aux ARN totaux. Cependant, depuis aucune donnée significative dans ce domaine n'a été rapportée.

La fondement de ce travail vient des expériences d'expressions différentielles de gènes entre des cellules transfectées par la PTHrP vs PTHrP(Δ NLS), réalisées par Thierry Massfelder durant son séjour post-doctoral. De ces expériences, certaines cibles dont la culline 3, que j'ai détaillée dans le chapitre I.8, m'a paru tout à fait intéressante à étudier.

RESULTATS ET DISCUSSION

Stimulation de l'expression de la culline 3 par la PTHrP intracrine

Comme je viens de l'évoquer, la culline 3 semble être une cible de la PTHrP intracrine. Cependant, cette hypothèse reste à être vérifiée directement sur les CMLV. Cela a été réalisé sur les CMLAo et CMLRv de rat utilisées lors des expériences de stretch mécanique. L'expression de la culline 3 a été mesurée dans différentes conditions : sur des cellules contrôles et transfectées par le vecteur seul et sur des cellules transfectées soit par la PTHrP entière, soit par la PTHrP(Δ NLS). Nous observons alors que seules les cellules transfectées par la PTHrP entière présente une forte augmentation de l'expression de la culline 3 (**Fig. V.1A**), confirmant que la PTHrP intracrine stimule l'expression de la culline 3. Nous avons vu précédemment que le stretch mécanique stimule l'expression de la PTHrP et que la PTHrP ainsi surexprimée allait s'opposer à l'effet inhibiteur du stretch mécanique par une stimulation intracrine de la prolifération. Nous sommes donc ici en présence d'un modèle plus « physiologique », surexprimant naturellement la PTHrP, et agissant par la voie intracrine. Nous disposons donc ici d'une excellente opportunité pour tester si la PTHrP surexprimée dans ce système stimule également l'expression de culline 3. Ceci est confirmé par RT-PCR, la culline 3 ayant exactement le même profil d'expression que la PTHrP (**Fig. V.1B**). Ces

observations ont été étendues sur les CMLV de souris délétées pour la PTHrP (**Fig. V.1C**). Nous observons alors que la délétion de PTHrP ne modifie pas l'expression de la culline 3. Ce résultat n'est pas surprenant et en accord avec l'hypothèse émise dans le chapitre précédent suggérant que dans des conditions d'expression basale de PTHrP, celle-ci était plutôt à considérer comme un facteur de survie qu'un modulateur de la prolifération cellulaire. La PTHrP(Δ NLS) n'a quant à elle pas d'effet sur l'expression de la culline 3, en accord avec les précédents résultats. La PTHrP(Δ SP) stimule l'expression de la culline 3, confirmant une fois de plus l'effet stimulateur de la PTHrP intracrine sur l'expression de la culline 3 (**Fig. V.1C**).

Comme nous l'avons vu dans le chapitre I.8, la culline 3 semble fortement impliquée dans les mécanismes de cancérogenèse, ayant pour cible divers facteurs comme l'ADN topoisomérase I⁽³⁰⁷⁾ ou encore Nrf2^(302, 303). Or il est bien décrit que les tumeurs surexpriment la PTHrP et cela dans tous types de cancers^(161, 354, 355, 356, 357, 358, 291, 359, 360, 290, 361, 362, 298). En outre, il a été décrit que cette surexpression de PTHrP est associée à un effet intracrine^(363, 364, 290, 361, 365, 366). Les travaux de Tovar Sepulveda et coll.⁽²⁹⁰⁾ décrivent que la PTHrP intracrine protège les cellules de l'apoptose suite à une privation de sérum, un effet qui n'est pas retrouvé avec la PTHrP(Δ NLS). Nous avons également observé un phénomène similaire dans les CMLV, mais surtout, ces données sont peut être à rapprocher des données obtenues par Zhang et coll.⁽³⁰⁷⁾ qui montraient que la culline 3 dégradait l'ADN topoisomérase I, rendant ainsi les cellules plus résistantes à l'apoptose. Même si cette hypothèse peut paraître un brin excessif étant donné la complexité de ces systèmes, les données montrant la surexpression de PTHrP dans les tumeurs et son action par la voie intracrine suggèrent une implication de la culline 3. Pour vérifier cette hypothèse, l'expression de la PTHrP a été mesurée par PCR quantitative sur des cellules de carcinome rénal à cellules claires 786-O déficientes en VHL, qui ont été montrées comme surexprimant largement la PTHrP⁽²⁹⁸⁾ et qui sont comparées à des cellules tubulaires proximales normales HK2. Les résultats montrent que les cellules cancéreuses surexpriment largement la culline 3 comparé aux cellules normales (**Fig. V.2A**). Nous avons également testé si les cellules 786-O transfectées avec le gène VHL, qui je le rappelle, régule l'expression de la PTHrP *via* la dégradation de HIF1 α , ayant comme conséquence la déstabilisation de l'ARNm de la PTHrP⁽²⁹⁸⁾, présentent une diminution de l'expression de la culline 3. Cependant, le taux d'expression de la PTHrP ne revient pas à un niveau basal et reste largement surexprimé par rapport aux cellules contrôles. Les résultats ne montrent pas de différence d'expression entre les cellules 786-O contrôles et 786-O transfectées par le VHL (**Fig. V.2A**). Cette absence de différence pourrait s'expliquer par le

fait que la surexpression de PTHrP reste très forte dans les cellules transfectées par le VHL et que les taux d'expression de PTHrP sont tels que nous sommes à l'effet maximum. En effet, le taux d'expression reste 20 fois supérieur aux cellules contrôles. Nous avons ensuite recherché si cette stimulation de l'expression de la culline 3 se retrouve également au niveau protéique. Ceci a été réalisé sur des extraits protéiques de tumeurs humaines de carcinome rénal et comparé à du tissu sain. Le Western blot de ces extraits montre que la culline 3 est surexprimée dans les tissus tumoraux (**Fig. V.2B**). Nous avons également réalisé un Western blot du Nrf2, un facteur de transcription dégradé par la culline 3 et régulant l'expression de gènes antioxydants et d'enzymes de détoxification de phase 2 ⁽³⁰²⁾. Les résultats montrent que Nrf2 est fortement diminué dans les tissus tumoraux comparés aux tissus sains (**Fig. V.2B**). Ces résultats sont tout à fait en accord avec les fonctions de la culline 3 sur la dégradation de Nrf2. Nous montrons ainsi que la PTHrP intracrine stimule l'expression de la culline 3, que cette stimulation ne se limite pas aux CMLV mais également aux carcinomes rénaux, une donnée probablement extensible aux autres types de tumeurs. Ceci a son importance connaissant la surexpression de la PTHrP dans les tumeurs. Ainsi, la surexpression de la culline 3 dans les tumeurs en réponse à la PTHrP pourrait avoir des conséquences dramatiques sur l'évolution de la maladie. En effet, la culline 3 va dégrader des enzymes tels que l'ADN topoisomérase I, dont sa dégradation confère une résistance à certaines thérapies, le Nrf2 qui stimule des enzymes de détoxifications de phase 2 et la cycline E libre agissant ainsi directement sur le cycle cellulaire.

Ces données vont être complétées par la recherche de l'expression de la culline 3, de la PTHrP et du Nrf2 sur une banque de biopsies de carcinomes rénaux par la technique des puces à tissus (ou TMA pour Tissu Micro Array). Ces puces comprennent 236 cas, comparant pour chaque échantillon les tissus tumoraux aux tissus sains, tout en ayant un recul de 15 à 25 ans sur l'évolution de la pathologie.

Il est également nécessaire de montrer un lien fort entre la surexpression de PTHrP dans les cellules tubulaires proximales et la surexpression de PTHrP comme cela a pu être réalisée dans les CMLV. Etant donné la très forte surexpression de PTHrP dans les cellules cancéreuses, il est illusoire de vouloir diminuer artificiellement son expression. Pour cela, il serait plus raisonnable d'utiliser des cellules tubulaires normales HK2, exprimant peu la culline 3, dans lesquelles la PTHrP sera transfectée. Cette transfection devrait conduire à une augmentation de l'expression de culline 3 montrant que l'expression de la culline 3 est stimulée par la PTHrP intracrine dans les cellules tubulaires.

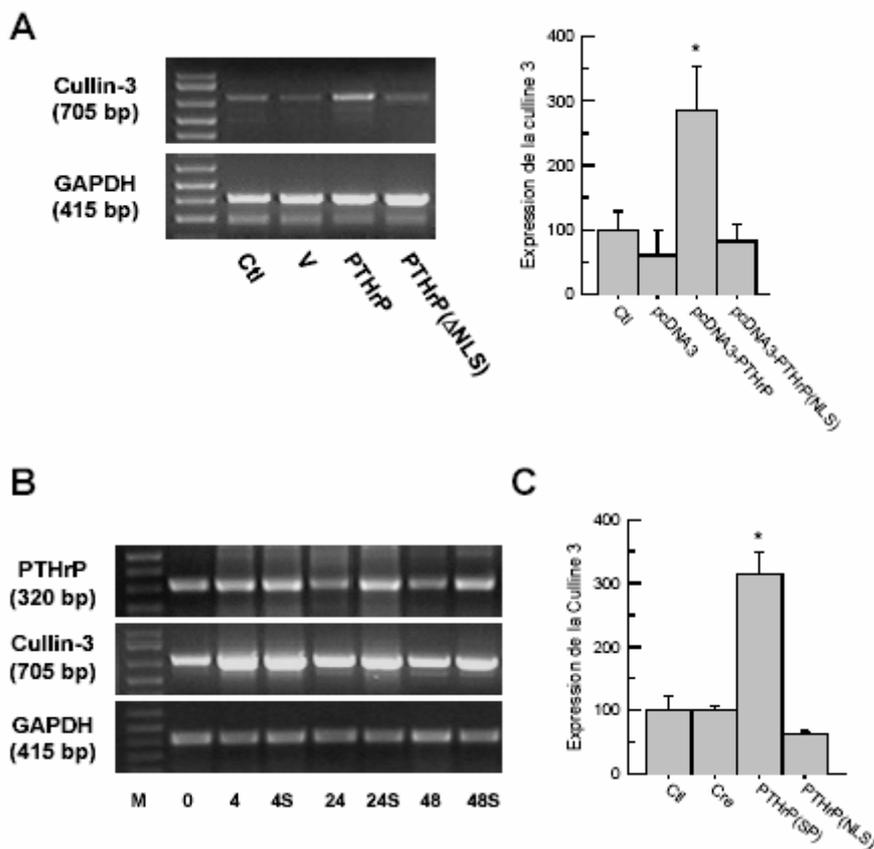


Figure V.1. Expression de la culline 3 dans mes CMLV.

(A) Expression de la culline 3 et de la GAPDH par RT-PCR dans les CMLV de rat contrôle (Ctl), transfectées par le vecteur seul (V), par la PTHrP entière (PTHrP) et par la PTHrP(ΔNLS). A droite la mesure de densitométrie. La PTHrP stimule l'expression de la culline 3 par la voie intracrine étant donné que la PTHrP(ΔNLS) ne reproduit pas cet effet. (B) Expression de la PTHrP, de la culline 3 et de la GAPDH dans des CMLV de rat stretchées (S) ou non à 0, 4, 24 et 48h. Le stretch mécanique stimule l'expression de la PTHrP, qui a été montré comme agissant par la voie intracrine⁽³⁶⁷⁾, qui stimule l'expression de la culline 3. (C) Expression par PCR quantitative de la culline 3 dans les CMLV de souris contrôles, délétées pour la PTHrP et délétées pour la PTHrP puis transfectées soit par la PTHrP(ΔSP), soit la PTHrP(ΔNLS). L'expression de la culline 3 est stimulée dans CMLV délétées pour la PTHrP et transfectées par la PTHrP(ΔSP). * P < 0,01.

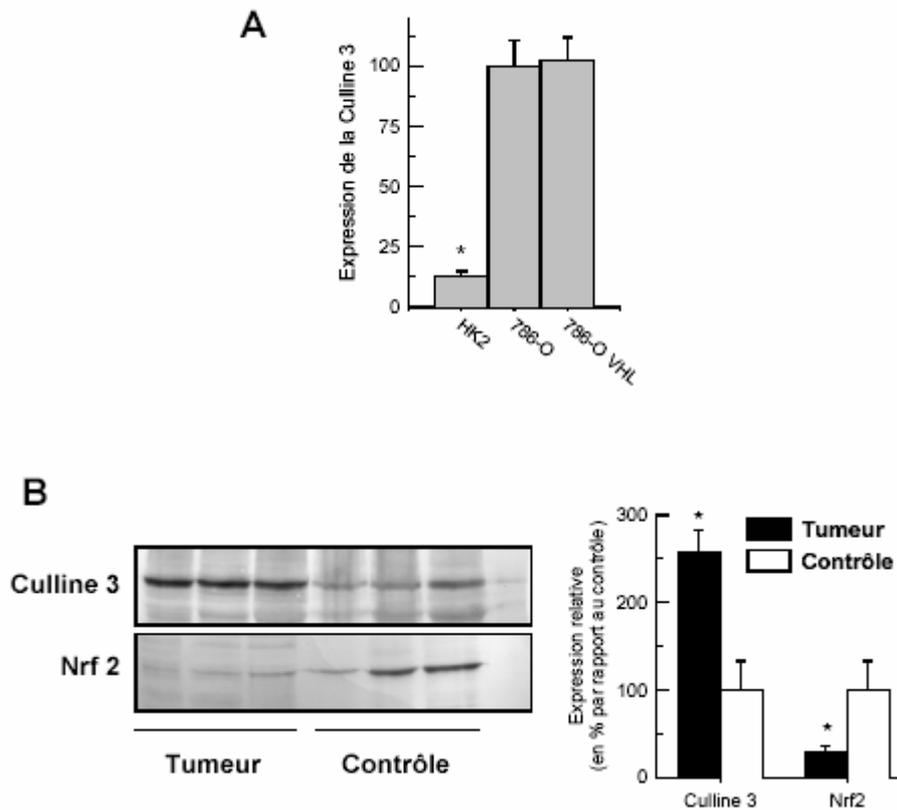


Figure V.2. Expression de la culline 3 dans les carcinomes rénaux à cellules claires.

(A) Mesure de l'expression de la culline 3 par PCR quantitative dans les cellules tubulaires proximales normales HK2, les cellules 786-O issues de carcinome rénal à cellules claires et déficientes en VHL et les cellules 786-0 transfectées par le VHL. Les cellules tumorales 786-O contrôles et transfectées surexpriment largement la culline 3 comparées aux cellules HK2. (B) Expression de la culline 3 et du Nrf2 dans des extraits de tumeurs comparé à du tissu sain en Western blot. Les tumeurs surexpriment la culline 3 et expriment peu le Nrf2 comparé au tissu sain. * $P < 0,05$.

Discussion générale

Rôle de la PTHrP dans les CMLV et de la culline 3, une cible nucléaire de la PTHrP

Chapitre VI

Tous ces résultats soulèvent des questions quant au rôle de la PTHrP dans les CMLV. La PTHrP a depuis longtemps été décrite comme un vasodilatateur. Les souris transgéniques surexprimant la PTHrP ou le RPTH1 présentent une pression artérielle plus basse^(202, 168). Les muscles lisses extravasculaires surexpriment la PTHrP en réponse à un étirement mécanique^(235, 232, 237), facilitant alors la ponte de l'œuf, la dilatation de l'utérus et de la vessie. Les premières expériences sur le stretch mécanique des CMLV vont également dans le sens d'une augmentation de la PTHrP pour contrer l'augmentation des forces mécaniques^(236, 233). Ces données sont largement en faveur d'un rôle bénéfique de la PTHrP, jouant un rôle de compliance et contrebalançant, par exemple, les effets de l'hypertension artérielle. Cependant, la plupart de ces résultats ont été interprétés alors que seule l'action auto/paracrine de la PTHrP sur le RPTH1 était connue, c'est-à-dire une inhibition de la prolifération cellulaire et un effet dilatateur par la voie de l'AMPC. Depuis, les travaux de Massfelder et coll.⁽²²⁷⁾ ont mis en évidence une stimulation de la prolifération cellulaire par la voie intracrine de la PTHrP. Ces travaux ont rendu ce système beaucoup moins évident et à la vue des résultats actuels, nous pouvons nous poser des questions sur les soit disant bienfaits de la PTHrP dans les CMLV. En effet, nous savons que la PTHrP est surexprimée dans l'hypertension artérielle, la resténose après angioplastie et les lésions athérosclérotiques^(250, 251, 248). Nous venons de voir que le stretch mécanique stimule l'expression de la PTHrP, ceci probablement par stimulation de HIF1 α qui stabilise l'ARNm de la PTHrP. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que l'expression de PTHrP n'est augmentée qu'après 24h de stretch indiquant qu'il ne s'agit pas d'un effet direct du stretch mécanique sur l'expression de la PTHrP mais plutôt de l'induction d'un gène à réponse rapide, comme cela a été montré pour le HIF1 α , qui agira ensuite sur la PTHrP. La PTHrP ainsi surexprimée va s'opposer à l'effet inhibiteur du stretch mécanique sur la prolifération cellulaire par une stimulation intracrine de la prolifération cellulaire. Par ailleurs, nous avons vu que le stretch mécanique diminue l'expression du RPTH1 dans les expériences de stretch mécanique. Nous savons également que l'angiotensine II, qui je le rappelle est stimulée par le stretch mécanique et dans l'hypertension artérielle, en combinaison avec la PTHrP intracrine dérégule le RPTH1. Le récepteur étant dérégulé, l'effet auto/paracrine inhibiteur de la prolifération cellulaire ainsi que l'effet dilatateur de la PTHrP est diminué. Ce sont précisément ces effets qui étaient décrits dans les précédentes études décrivant la PTHrP comme un facteur de compliance. Les récents travaux suggèrent que la PTHrP stimule la prolifération par la voie intracrine pouvant entraîner une hyperplasie et une hypertrophie des vaisseaux, aggravant ainsi la pathologie. L'effet vasodilatateur de la PTHrP est quant à lui réduit du fait de la diminution de l'expression des RPTH1 comme cela a été

montré chez le SHR ⁽²²¹⁾. Les travaux de Fiaschi-Taesch et coll. ⁽²⁶⁸⁾ vont également dans ce sens, montrant que la transfection des carotides par la PTHrP(Δ NLS) inhibe la resténose après angioplastie, soulignant un rôle critique de la PTHrP intracrine dans la formation de la néointima. De ces résultats pourrait émerger un concept selon lequel, suivant les cas, la réponse de la PTHrP est modulée. Elle pourrait jouer un rôle de compliance par son action auto/paracrine, comme cela a été décrit auparavant, mais de façon ponctuelle en réponse à une élévation de la pression tel qu'il est admis dans les CML extra-vasculaires. Cependant dans des cas d'expositions prolongées aux forces mécaniques comme c'est le cas dans l'hypertension artérielle et la resténose après angioplastie, l'effet auto/paracrine bénéfique de la PTHrP serait annulé et deviendrait négatif par son effet stimulateur intracrine de la PTHrP sur la prolifération cellulaire et par la diminution de l'expression du RPTH1. Il en résulterait alors une hyperplasie et une hypertrophie des vaisseaux (**Fig. VI.1**).

Cette hypothèse reste peut être à nuancer car certains travaux vont à l'encontre de ce concept. En effet, Ishikawa et coll. ⁽³⁶⁸⁾ montrent que l'application d'un gel contenant de la PTHrP(1-34) inhibe la formation de la néointima des lésions athérosclérotiques induites sur l'artère fémorale. Il ne faut également pas perdre de vue que dans certaines conditions, comme chez le rat SHR qui est un modèle d'hypertension essentielle humaine, les effets de la PTHrP sur la prolifération sont inversés, avec une inhibition intracrine et une stimulation auto/paracrine ⁽²⁴⁶⁾. Cependant, cette dernière donnée mériterait d'être approfondie et confirmée afin de déterminer comment les effets de la PTHrP peuvent s'inverser au cours d'une pathologie. S'agit-il d'un phénomène classique dans l'hypertension artérielle ou d'une spécificité du rat SHR ? Compte tenu de ces données, il est dans l'état actuel des connaissances impossible d'affirmer que la PTHrP est un élément aggravant dans des pathologies telles que l'hypertension artérielle, la resténose après angioplastie ou encore l'athérosclérose où la PTHrP est fortement surexprimée. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour répondre à cette question.

D'autre part, un élément nouveau à prendre en considération est la stimulation de l'expression de la culline 3, la première cible identifiée de la PTHrP intracrine. Au niveau des CMLV, aucune donnée n'est encore disponible. Cependant, nous savons à travers la littérature que la culline 3 dégrade la cycline E impliquée dans le passage de la phase G1/S, l'ADN topoisomérase I, jouant un rôle important dans la résistance à certains anti-tumoraux comme les camptothécins, et le Nrf2 stimulant l'expression des enzymes de détoxification de phase 2. Cependant, au niveau des CMLV il ne semble pas que son action soit si négative si l'on se

réfère aux deux travaux qui ont étudiées l'ADN topoisomérase I et le Nrf2 dans les CMLV. En effet, un inhibiteur spécifique de l'ADN topoisomérase I diminue la prolifération cellulaire et la formation de néointima après angioplastie ⁽³⁶⁹⁾ alors que le Nrf2 est impliqué dans la survie cellulaire et que l'inhibition de son partenaire de liaison : l'hème oxygénase I, stimule l'apoptose ⁽³⁷⁰⁾. Concernant la dégradation de la cycline E libre par la culline 3, aucune donnée n'est disponible à ce jour pour les CMLV. Cependant il est difficile de conclure sur le rôle de la culline 3 dans les CMLV et l'effet de sa surexpression car les données à notre disposition sont très minces étant donné que toutes les cibles de la culline 3 sont loin d'être découvertes et qu'il s'agit ici d'une protéine nouvellement identifiée.

En revanche, les interactions entre la PTHrP et la culline 3, semblent bien plus préoccupant et intéressant dans les tumeurs qu'aux niveaux des CMLV. En effet, les cibles identifiées jusqu'à présent semblent impliquées dans la cancérogenèse et la résistance à certaines thérapies. Une telle voie mérite d'être approfondie. De plus, la PTHrP est la première protéine identifiée capable de moduler l'expression de la culline 3, les travaux précédents s'intéressant uniquement à l'identification des cibles de la culline 3. Dès lors, si les expériences sur les puces à tissus confirment les hypothèses émises entre la PTHrP et la culline 3 et qu'elles permettent de faire un lien avec une évolution précise du cancer, nous pouvons imaginer que cette découverte puisse ouvrir des nouvelles voies thérapeutiques et l'élaboration de nouveaux marqueurs pronostics.

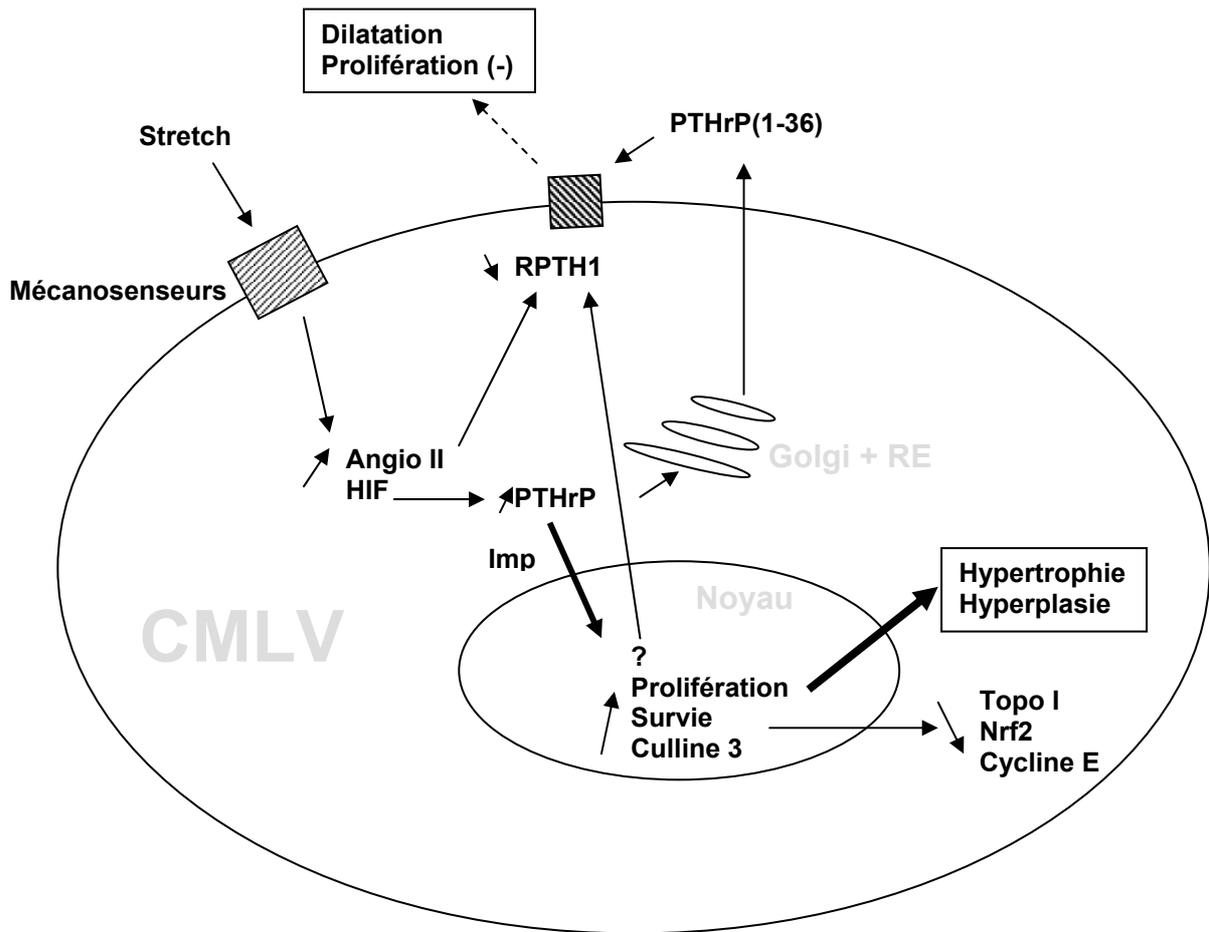


Figure VI.1. Hypothèse des effets de la PTHrP surexprimée dans les CMLV au cours de l'hypertension artérielle et la resténose après angioplastie.

Le stretch mécanique stimule l'expression de HIF1 α et le système rénine angiotensine local. Le niveau d'expression de PTHrP augmente du fait de la stabilisation de son ARNm par HIF1 α . La PTHrP ainsi surexprimé va être importé dans le noyau et agir par sa voie intracrine, stimulant la prolifération cellulaire, l'expression de la culline 3 et d'autres cibles non identifiées. L'angiotensine II en combinaison avec la PTHrP intracrine va déréguler le RPTH1. L'inhibition de la prolifération et l'effet dilatateur de la PTHrP auto/paracrine sera alors diminué. Les effets de la voie intracrine sont alors prédominants et il en résulte une augmentation de la prolifération des CMLV d'où une hyperplasie et une hypertrophie des vaisseaux.

Implication de la Protéine Apparentée à l'Hormone Parathyroïdienne (PTHrP) dans la prolifération des Cellules Musculaires Lisses Vasculaires et identification d'une cible nucléaire de la PTHrP

Conclusions

Ce travail de thèse m'a permis de déterminer l'effet du stretch mécanique sur la prolifération des CMLV et l'implication de la PTHrP dans ce système. Mes résultats montrent que le stretch mécanique inhibe la prolifération cellulaire et stimule l'expression de PTHrP des CMLV issues de vaisseaux de résistance et de conductance. La surexpression de PTHrP intervient après 24h de stretch mécanique et n'est pas transitoire. La PTHrP est surexprimée par stabilisation de son ARNm, un effet indépendant de l'angiotensine II. Le stretch mécanique diminue l'expression du RPTH1, un effet faisant intervenir l'angiotensine II. La PTHrP surexprimée par le stretch mécanique s'oppose par la voie intracrine à l'effet inhibiteur du stretch mécanique sur la prolifération cellulaire. Ces données suggèrent que la PTHrP pourrait participer à l'hyperplasie, l'hypertrophie et la formation de néointima dans les pathologies vasculaires telles que l'hypertension artérielle et la resténose après angioplastie où les forces mécaniques sont augmentées et la PTHrP surexprimée.

Dans la seconde partie de ma thèse, j'ai établi un nouveau modèle de CMLV à partir de souris transgéniques dont l'exon 4 de la PTHrP a été entouré de séquences Lox P. Après apport de la Cre recombinase par transfection, ces lignées cellulaires n'expriment plus la PTHrP, permettant ainsi d'étudier les effets de la PTHrP endogène. La transfection de ces cellules délétées pour la PTHrP par les PTHrP(Δ SP) et PTHrP(Δ NLS) permettent de décomposer les effets auto/paracrine et intracrine de la PTHrP. Des résultats préliminaires montrent que la PTHrP endogène pourrait agir comme un facteur de survie et les différentes transfections reproduisent les différents effets de la PTHrP décrits dans la littérature, validant ainsi ce modèle.

Cette thèse m'a également permis d'identifier une cible nucléaire de la PTHrP : la culline 3. Dans les CMLV, son expression est augmentée en réponse à des transfections par la PTHrP contenant la SLN et par le stretch mécanique qui induit une surexpression de PTHrP. Il a également été montré que l'expression de la culline 3 est fortement augmentée dans les carcinomes rénaux, lesquels surexpriment la PTHrP. Les cellules tubulaires normales HK2 expriment peu la PTHrP et la culline 3. Selon la littérature, la culline 3 dégrade l'ADN topoisomérase I et le Nrf 2, des protéines impliquées dans la résistance à certaines thérapies et dans l'expression d'enzyme de détoxification de phase 2. La PTHrP est également la première protéine identifiée capable de moduler l'expression de la culline 3. L'ensemble de ces données suggèrent que la PTHrP *via* la stimulation de la culline 3 pourrait être impliquée dans des mécanismes de cancérogenèse et que cette découverte pourrait ouvrir des nouvelles voies thérapeutiques et l'élaboration de nouveaux marqueurs pronostics.

Implication de la Protéine Apparentée à l'Hormone Parathyroïdienne (PTHrP) dans la prolifération des Cellules Musculaires Lisses Vasculaires et identification d'une cible nucléaire de la PTHrP

Résumé

Contexte bibliographique

Au cours des hypercalcémies humores malignes, la PTHrP formée en abondance par les tumeurs et sécrétée dans la circulation mime les effets calciotropiques de la PTH. L'homologie de séquence de leur région amino-terminale leur permet de se lier et d'activer avec une égale affinité le RPTH1. Rapidement après sa découverte en 1987 il s'est avéré que la PTHrP, de par ses propriétés, était en réalité plus proche des cytokines et des facteurs de croissance que de la PTH. Contrairement à la PTH, elle n'est pas circulante dans l'organisme normal et son expression est ubiquitaire. La PTHrP est une poly-protéine qui subit des protéolyse post-traductionnelles donnant naissance aux PTHrP(1-36), (38-94) et (107-139), qui sont les formes majeures matures de la PTHrP. Chacune de ces formes se lie probablement à un récepteur spécifique, dont seul le RPTH1 est actuellement bien connu. Les diverses formes de sécrétion de la PTHrP sont impliquées (i) le transport transépithélial de calcium, (ii) la relaxation du muscle lisse artériel et viscéral et (iii) la croissance, la différenciation et la mort cellulaire dans tous les types de tissus testés à ce jour.

Dans la plupart des études, il était admis que la PTHrP agissait *via* la voie autocrine/paracrine. Des études récentes ont montré que la PTHrP pouvait réguler le cycle cellulaire et le processus apoptotique par une voie dite intracrine faisant intervenir la translocation du peptide vers le noyau. Cette propriété de la PTHrP a été plus particulièrement étudiée dans ma thèse. En effet, notre laboratoire montrait en 1997 que la PTHrP exerce des effets originaux paradoxaux sur la prolifération des CMLV : une inhibition par la voie auto/paracrine *via* le RPTH1 largement décrite auparavant, mais également une stimulation de la prolifération de ces même cellules par une voie intracrine, *via* translocation du peptide vers le noyau.

L'objectif de ce travail a été d'étudier le rôle de la PTHrP sur la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires d'origine rénale et aortique, et plus particulièrement la voie intracrine en utilisant plusieurs approches.

- 1) en explorant l'implication de la PTHrP dans la réponse mitogénique des cellules musculaires lisses vasculaires soumises à un stretch mécanique
- 2) en étudiant l'excision de la PTHrP dans les cellules musculaires lisses vasculaires de souris transgénique Lox P pour la PTHrP
- 3) en identifiant une cible nucléaire de la PTHrP

Implication de la PTHrP dans la régulation de la prolifération des CMLV soumises à un stretch mécanique.

Les travaux précédents sur la prolifération des CMLV présentent des résultats contradictoires avec soit une inhibition, soit une stimulation de leur prolifération indépendamment non seulement de l'origine vasculaire des CMLV mais également de l'importance du stretch imposé. Ces résultats révèlent la complexité des mécanismes cellulaires mis en jeu par les CMLV en réponse au stretch. Il est important de noter dans le contexte de notre étude que les études précédentes de l'effet du stretch mécanique sur la prolifération des CMLV restent limitées aux cellules issues de vaisseaux de conductance (presque exclusivement l'aorte) et qu'aucune donnée n'est donc disponible concernant cet effet sur des CMLV issues de vaisseaux de résistance. Un nombre encore restreint d'études rapportent que le stretch mécanique, seul ou en combinaison avec l'angiotensine II, stimule l'expression de la PTHrP *in vivo* et *in vitro* dans les CMLV d'aorte de rat dans les conditions normales.

Les résultats obtenus montrent que :

- un stretch physiologique, d'une élévation de 10% à une fréquence de 1 Hz inhibe la prolifération des CMLV. Deux effets sont alors observés : un retard de croissance de 2 jours suivit d'une densité cellulaire moindre au plateau.
- l'expression de la PTHrP est stimulée à partir de 24h de stretch mécanique et se maintient dans le temps. Cette augmentation de l'expression de PTHrP est due à une stabilisation de l'ARNm de la PTHrP, un phénomène indépendant de l'angiotensine II. Le stretch mécanique diminue l'expression du R-PTH1.
- La transfection des CMLV par la PTHrP en orientation antisens n'affecte pas la prolifération de ces cellules, ceci étant probablement dû au manque d'efficacité d'une telle construction. Cependant, la transfection des CMLV par la PTHrP lève l'inhibition de la prolifération des CMLV stretchées par un mécanisme dépendant de la PTHrP intracrine étant donné que la transfection par la PTHrP(Δ NLS) ou l'ajout de PTHrP exogène ne reproduit pas cet effet. Ceci est confirmé par un marquage positif des noyaux pour la PTHrP en immunofluorescence.

L'ensemble de ces résultats montre que le stretch mécanique augmente l'expression de la PTHrP par la stabilisation de son ARNm et que cette PTHrP ainsi surexprimée va tendre à

s'opposer à l'effet inhibiteur du stretch mécanique sur la prolifération des CMLV par un mécanisme intracrine, *via* la translocation nucléaire de la protéine dans le noyau.

Ces travaux ont donné lieu à une publication *dans J. Am. Soc. Nephrol.* publiée en décembre 2004.

Etude de l'excision de la PTHrP dans les cellules musculaires lisses vasculaires de souris

Les travaux antérieurs ont montré que la PTHrP présentait de nombreuses propriétés sur la croissance et la survie cellulaire. Cependant, ces études faisaient toujours appel à une surexpression de PTHrP et n'ont jamais pu aborder le problème d'une manière directe en inactivant le gène de la PTHrP. Dans ce projet, l'idée est d'isoler des cellules musculaires lisses rénovasculaires et aortiques de souris où le gène de la PTHrP sera invalidé.

Obtention des CMLV invalidées pour la PTHrP

Pour cela, nous disposons de souris dont l'exon 4 du gène de la PTHrP qui code pour la majeure partie de la protéine a été entouré de séquences Lox P. Des lignées primaires de CMLV rénales et aortiques ont été obtenues par la méthode en explant développée au laboratoire et adaptée pour la souris. Ces cellules ont été caractérisées par une croissance en monts et vallées et un marquage positif à l' α -actine. La PTHrP a été invalidée par excision de l'exon 4 par transfection stable avec un plasmide codant pour la Cre recombinase. L'invalidation a été vérifiée par PCR quantitative en temps réel.

Caractéristiques de croissance

Les résultats montrent que l'excision de la PTHrP diminue la croissance et la survie des CMLV invalidées ainsi que les cellules invalidées transfectées par la PTHrP(Δ NLS). La transfection par la PTHrP(Δ SP) stimule la croissance et la survie cellulaire. Ces résultats sont totalement en accord avec les données de la littérature et valident le modèle.

Identification d'une cible nucléaire de la PTHrP : la culline 3

La Culline 3 est une cible nucléaire potentielle pour la PTHrP qui a pu être mise en évidence par expression différentielle d'ARNm dans les CMLV transfectées par la PTHrP *vs.* PTHrP(Δ NLS) (Massfelder, Stewart, observations non publiées). La culline-3 est un enzyme impliqué dans la dégradation de la cycline E contrôlant le passage G1/S du cycle cellulaire, de

l'ADN topoisomérase I qui a été montré comme impliqué dans la résistance à certains traitements anticancéreux et du Nrf 2, un facteur de transcription activant l'expression d'enzymes de détoxification de phase 2.

Nos premières investigations ont pu mettre en évidence que l'expression de la culline-3 est induite dans les CMLV par la PTHrP intracrine qu'elle soit apportée par transfection ou par stimulation de son expression par le stretch mécanique. Il a également été montré que l'expression de la culline 3 est fortement augmentée dans les carcinomes rénaux, lesquels surexpriment la PTHrP. Les cellules tubulaires normales HK2 expriment peu la PTHrP et la culline 3. La PTHrP est également la première protéine identifiée capable de moduler l'expression de la culline 3. L'ensemble de ces données suggèrent que la PTHrP surexprimée dans les tumeurs pourrait être impliquée par l'intermédiaire de la stimulation de la culline 3 dans des mécanismes de cancérogenèse. Cette découverte pourrait ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques et l'élaboration de nouveaux marqueurs pronostics.

Liste des publications

Publications

T. Massfelder, H. Lang, **E. Schordan**, V. Lindner, S. Rothhut, S. Welsch, P. Simon-Assmann, M. Barthelmebs, D. Jacqmin, J.J. Helwig. Parathyroid hormone-related protein is an essential growth factor for human clear cell renal carcinoma and a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res.* 2004 Jan 1;64(1):180-8.

E. Schordan, S. Welsch, S. Rothhut, A. Lambert, M. Barthelmebs, J.J. Helwig, T. Massfelder. Role of Parathyroid Hormone-related Protein in the regulation of stretch-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Dec 1, 2004; 15(12):3016-25

I. Talon, V. Lindner, **E. Schordan**, S. Rothhut, M. Barthelmebs, J.J. Helwig, H. Lang, T. Massfelder. Anti-tumoral effect of a Parathyroid Hormone-Related Protein (PTHrP) Neutralizing Antibody in Human Conventional Cell Renal Carcinoma Wild-type for Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene in Vitro and in Vivo. *In Revision, Cancer Res.*

S. Welsch, **E. Schordan**, T. Massfelder, N. Fiaschi-Taesch, A. Lambert, J.J. Helwig, M. Barthelmebs. Is the downregulation of the type 1 PTH/PTHrP receptor a general feature of the cardiovascular system in hypertension rat? *Submitted to J Hyperten.*

S. Welsch, **E. Schordan**, T. Massfelder, A. Lambert, J.J. Helwig, M. Barthelmebs. In vitro and in vivo cooperative destabilization of PTH1 receptor transcript by paracrine Angiotensin II and intracrine PTH-related protein in vascular smooth muscle. *Submitted to Circ. Res.*

Résumés

E. Schordan, J.J. Helwig, T. Massfelder. La PTHrP contrôle la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires en réponse au stretch mécanique. *Néphrologie*. 2003;24(1) French.

E. Schordan, S. Welsch, M. Barthelmebs, J.J. Helwig, T. Massfelder. Role of Parathyroid Hormone-related Protein in the regulation of stretch-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *Fund. Clin. Pharmacol.* 2004 18 p 244 (P-180).

S. Welsch, **E. Schordan**, T. Massfelder, J.J. Helwig, M. Barthelmebs. Angiotensin II but not high blood pressure is involved in the downregulation of renal vascular PTH/PTHrP receptor (PTH1R) in rats. *Fund. Clin. Pharmacol.* 2004 18 p 254 (P-235).

S. Welsch, **E. Schordan**, T. Massfelder, J.J. Helwig, M. Barthelmebs. Renal vessel-specific angiotensin II-mediated downregulation and promoter inactivation of type 1 PTH/PTHrP receptor (PTH1R) gene in genetic hypertension. *J Am Soc Nephrol* 15:2004; p207A (F-PO637).

E. Schordan, S. Welsch, M. Barthelmebs, J.J. Helwig, T. Massfelder. Critical Role of Parathyroid Hormone-Related Protein (PTHrP) in Stretch-Induced Renal Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *J Am Soc Nephrol* 15:2004; p437A (SA-PO612).

Communications orales

E. Schordan, J.J. Helwig, T. Massfelder. La PTHrP contrôle la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires en réponse au stretch mécanique. Congrès « Les cellules rénales et les interactions cellulaires dans les épithéliums : du gène à la physiopathologie ». Faculté de Médecine Necker, Paris, 20-21 juin 2002.

Lang H, **Schordan E**, Lindner V, Jacqmin D, Helwig JJ, Massfelder T. Parathyroid Hormone-Related

Protein is an Essential Growth Factor for Human Conventional Renal Cell Carcinoma and a Target for the Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene. XIX Congress of the European Association of Urology, Vienna, 24-27 March, 2004.

S. Welsch, **E. Schordan**, T. Massfelder, J.J. Helwig, M. Barthelmebs. Downregulation of renal PTHrP/PTH1R-mediated vasodilation in SHR: a primary defect in genetic hypertension? Annual PTHrP Meeting, PPP-7, Paris 8-10 July 2004.

Posters

E. Schordan, S. Welsch, M. Barthelmebs, J.J. Helwig, T. Massfelder. Role of Parathyroid Hormone-related Protein in the regulation of stretch-induced vascular smooth muscle cell proliferation. 8th Annual Congress of French Pharmacology Society, Strasbourg, 26-28 April 2004.

S. Welsch, **E. Schordan**, T. Massfelder, J.J. Helwig, M. Barthelmebs. Angiotensin II but not high blood pressure is involved in the downregulation of renal vascular PTH/PTHrPreceptor (PTH1R) in rats. 8th Annual Congress of French Pharmacology Society, Strasbourg, 26-28 April 2004.

Lang H, **Schordan E**, Lindner V, Jacqmin D, Helwig JJ, Massfelder T. Parathyroid Hormone-Related Protein is an Essential Growth Factor for Human Conventional Renal Cell Carcinoma and a Target for the Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene. Annual Meeting of the American Urological Association (AUA), May 8-13, 2004, San Francisco.

S. Welsch, **E. Schordan**, T. Massfelder, J.J. Helwig, M. Barthelmebs. Renal vessel-specific angiotensin II-mediated downregulation and promoter inactivation of type 1 PTH/PTHrP receptor (PTH1R) gene in genetic hypertension. 37th Annual Meeting and Scientific Exposition of American Society of Nephrology, St Louis, Missouri, October 29-November 1 2004.

E. Schordan, S. Welsch, M. Barthelmebs, J.J. Helwig, T. Massfelder. Critical Role of Parathyroid Hormone-Related Protein (PTHrP) in Stretch-Induced Renal Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. 37th Annual Meeting and Scientific Exposition of American Society of Nephrology, St Louis, Missouri, October 29-November 1 2004.

Brevet

Patent N° 02 08501, registered the 05th July 2002, University Hospital/INSERM/ULP/Inventors – Use of PTHrP Hospital/INSERM/ULP/Inventors – Use of PTHrP antagonists for the treatment of human renal cell carcinoma.

Références Bibliographiques

1. Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, et al. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev.* Jan 1996;76(1):127-173.
2. Stewart AF, Wu T, Goumas D, et al. N-terminal amino acid sequence of two novel tumor-derived adenylate cyclase-stimulating proteins: identification of parathyroid hormone-like and parathyroid hormone-unlike domains. *Biochem Biophys Res Commun.* Jul 31 1987;146(2):672-678.
3. Rodan SB, Wesolowski G, Ianacone J, et al. Production of parathyroid hormone-like peptide in a human osteosarcoma cell line: stimulation by phorbol esters and epidermal growth factor. *J Endocrinol.* Jul 1989;122(1):219-227.
4. Burtis WJ, Wu T, Bunch C, et al. Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *J Biol Chem.* May 25 1987;262(15):7151-7156.
5. Mangin M, Webb AC, Dreyer BE, et al. Identification of a cDNA encoding a parathyroid hormone-like peptide from a human tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 1988;85(2):597-601.
6. Naylor SL, Sakaguchi AY, Szoka P, et al. Human parathyroid hormone gene (PTH) is on short arm of chromosome 11. *Somatic Cell Genet.* Sep 1983;9(5):609-616.
7. Comings DE. Evidence for ancient tetraploidy and conservation of linkage groups in mammalian chromosomes. *Nature.* Aug 25 1972;238(5365):455-457.
8. Yang KH, Stewart AF. Parathyroid hormone-related protein: the gene, its mRNA species, and protein products. *Principles of Bone Biology, Academic Press, Inc.* 1996:347-362.
9. Clemens TL, Cormier S, Eichinger A, et al. Parathyroid hormone-related protein and its receptors: nuclear functions and roles in the renal and cardiovascular systems, the placental trophoblasts and the pancreatic islets. *Br J Pharmacol.* Nov 2001;134(6):1113-1136.
10. Mangin M, Ikeda K, Dreyer BE, et al. Isolation and characterization of the human parathyroid hormone-like peptide gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 1989;86(7):2408-2412.
11. Mangin M, Ikeda K, Dreyer BE, et al. Identification of an up-stream promoter of the human parathyroid hormone-related peptide gene. *Mol Endocrinol.* Jun 1990;4(6):851-858.
12. Thiede MA, Strewler GJ, Nissenson RA, et al. Human renal carcinoma expresses two messages encoding a parathyroid hormone-like peptide: evidence for the alternative splicing of a single-copy gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 1988;85(13):4605-4609.
13. Yasuda T, Banville D, Hendy GN, et al. Characterization of the human parathyroid hormone-like peptide gene. Functional and evolutionary aspects. *J Biol Chem.* May 5 1989;264(13):7720-7725.
14. Vasavada RC, Wysolmerski JJ, Broadus AE, et al. Identification and characterization of a GC-rich promoter of the human parathyroid hormone-related peptide gene. *Mol Endocrinol.* Feb 1993;7(2):273-282.
15. Martin TJ, Moseley JM, Williams ED. Parathyroid hormone-related protein: hormone and cytokine. *J Endocrinol.* Sep 1997;154 Suppl:S23-37.
16. Suva LJ, Winslow GA, Wettenhall RE, et al. A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Science.* Aug 21 1987;237(4817):893-896.

17. Soifer NE, Dee KE, Insogna KL, et al. Parathyroid hormone-related protein. Evidence for secretion of a novel mid-region fragment by three different cell types. *J Biol Chem*. Sep 5 1992;267(25):18236-18243.
18. Wu TL, Vasavada RC, Yang K, et al. Structural and physiologic characterization of the mid-region secretory species of parathyroid hormone-related protein. *J Biol Chem*. Oct 4 1996;271(40):24371-24381.
19. Meerovitch K, Wing S, Goltzman D. Parathyroid hormone-related protein is associated with the chaperone protein BiP and undergoes proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem*. Aug 14 1998;273(33):21025-21030.
20. Ditmer LS, Burton DW, Deftos LJ. Elimination of the carboxy-terminal sequences of parathyroid hormone-related protein 1-173 increases production and secretion of the truncated forms. *Endocrinology*. May 1996;137(5):1608-1617.
21. Meerovitch K, Wing S, Goltzman D. Preproparathyroid hormone-related protein, a secreted peptide, is a substrate for the ubiquitin proteolytic system. *J Biol Chem*. Mar 7 1997;272(10):6706-6713.
22. Fenton AJ, Kemp BE, Kent GN, et al. A carboxyl-terminal peptide from the parathyroid hormone-related protein inhibits bone resorption by osteoclasts. *Endocrinology*. Oct 1991;129(4):1762-1768.
23. Seitz PK, Zhang RW, Simmons DJ, et al. Effects of C-terminal parathyroid hormone-related peptide on osteoblasts. *Miner Electrolyte Metab*. 1995;21(1-3):180-183.
24. Burtis WJ, Fodero JP, Gaich G, et al. Preliminary characterization of circulating amino- and carboxy-terminal fragments of parathyroid hormone-related peptide in humoral hypercalcemia of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab*. Oct 1992;75(4):1110-1114.
25. Petrin EM, Deftos LJ. Prostate cancers differentially express the three parathyroid hormone-related protein isoforms. *J Invest Med*. 1995;43:225A.
26. Brandt DW, Bruns ME, Bruns DE, et al. The parathyroid hormone-related protein (PTHrP) gene preferentially utilizes a GC-rich promoter and the PTHrP 1-139 coding pathway in normal human amnion. *Biochem Biophys Res Commun*. Dec 15 1992;189(2):938-943.
27. Wu TL, Soifer NE, Burtis WJ, et al. Glycosylation of parathyroid hormone-related peptide secreted by human epidermal keratinocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. Nov 1991;73(5):1002-1007.
28. Massfelder T, Helwig JJ, Stewart AF. Parathyroid hormone-related protein as a cardiovascular regulatory peptide. *Endocrinology*. Aug 1996;137(8):3151-3153.
29. Care AD, Abbas SK, Pickard DW, et al. Stimulation of ovine placental transport of calcium and magnesium by mid-molecule fragments of human parathyroid hormone-related protein. *Exp Physiol*. Jul 1990;75(4):605-608.
30. Strewler GJ. The physiology of parathyroid hormone-related protein. *N Engl J Med*. Jan 20 2000;342(3):177-185.
31. Strid H, Care A, Jansson T, et al. Parathyroid hormone-related peptide (38-94) amide stimulates ATP-dependent calcium transport in the Basal plasma membrane of the human syncytiotrophoblast. *J Endocrinol*. Nov 2002;175(2):517-524.

32. Luparello C, Romanotto R, Tipa A, et al. Midregion parathyroid hormone-related protein inhibits growth and invasion in vitro and tumorigenesis in vivo of human breast cancer cells. *J Bone Miner Res.* Dec 2001;16(12):2173-2181.
33. Burtis WJ, Brady TG, Orloff JJ, et al. Immunochemical characterization of circulating parathyroid hormone-related protein in patients with humoral hypercalcemia of cancer. *N Engl J Med.* Apr 19 1990;322(16):1106-1112.
34. Nagasaki K, Otsubo K, Kajimura N, et al. Circulating parathyroid hormone-related protein (109-141) in malignancy-associated hypercalcemia. *Jpn J Clin Oncol.* Feb 1996;26(1):6-11.
35. Orloff JJ, Soifer NE, Fodero JP, et al. Accumulation of carboxy-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein in renal failure. *Kidney Int.* Jun 1993;43(6):1371-1376.
36. Fenton AJ, Kemp BE, Hammonds RG, Jr., et al. A potent inhibitor of osteoclastic bone resorption within a highly conserved pentapeptide region of parathyroid hormone-related protein; PTHrP[107-111]. *Endocrinology.* Dec 1991;129(6):3424-3426.
37. Esbrit P, Alvarez-Arroyo MV, De Miguel F, et al. C-terminal parathyroid hormone-related protein increases vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells. *J Am Soc Nephrol.* Jun 2000;11(6):1085-1092.
38. Luparello C, Burtis WJ, Raue F, et al. Parathyroid hormone-related peptide and 8701-BC breast cancer cell growth and invasion in vitro: evidence for growth-inhibiting and invasion-promoting effects. *Mol Cell Endocrinol.* Jun 1995;111(2):225-232.
39. Whitfield JF, Isaacs RJ, Jouishomme H, et al. C-terminal fragment of parathyroid hormone-related protein, PTHrP-(107-111), stimulates membrane-associated protein kinase C activity and modulates the proliferation of human and murine skin keratinocytes. *J Cell Physiol.* Jan 1996;166(1):1-11.
40. Valin A, Garcia-Ocana A, De Miguel F, et al. Antiproliferative effect of the C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein, PTHrP-(107-111) and (107-139), on osteoblastic osteosarcoma cells. *J Cell Physiol.* Feb 1997;170(2):209-215.
41. Martinez ME, Garcia-Ocana A, Sanchez M, et al. C-terminal parathyroid hormone-related protein inhibits proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res.* May 1997;12(5):778-785.
42. Cornish J, Callon KE, Lin C, et al. Stimulation of osteoblast proliferation by C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein. *J Bone Miner Res.* Jun 1999;14(6):915-922.
43. Burtis WJ. Parathyroid hormone-related protein: structure, function, and measurement. *Clin Chem.* Nov 1992;38(11):2171-2183.
44. Goomer RS, Johnson KA, Burton DW, et al. The tetrabasic KKKK(147-150) motif determines intracrine regulatory effects of PthrP 1-173 on chondrocyte PPI metabolism and matrix synthesis. *Endocrinology.* Dec 2000;141(12):4613-4622.
45. Massfelder T, Helwig JJ. Parathyroid hormone-related protein in cardiovascular development and blood pressure regulation. *Endocrinology.* Apr 1999;140(4):1507-1510.
46. Vasavada RC, Garcia-Ocana A, Massfelder T, et al. Parathyroid hormone-related protein in the pancreatic islet and the cardiovascular system. *Recent Prog Horm Res.* 1998;53:305-338; discussion 338-340.

47. Usdin TB, Gruber C, Bonner TI. Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor. *J Biol Chem.* Jun 30 1995;270(26):15455-15458.
48. Rubin DA, Juppner H. Zebrafish express the common parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor (PTH1R) and a novel receptor (PTH3R) that is preferentially activated by mammalian and fugu fish parathyroid hormone-related peptide. *J Biol Chem.* Oct 1 1999;274(40):28185-28190.
49. Gardella TJ, Juppner H. Interaction of PTH and PTHrP with their receptors. *Rev Endocr Metab Disord.* Nov 2000;1(4):317-329.
50. Gardella TJ, Juppner H. Molecular properties of the PTH/PTHrP receptor. *Trends Endocrinol Metab.* Jul 2001;12(5):210-217.
51. Abou-Samra AB, Juppner H, Kong XF, et al. Structure, function, and expression of the receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Adv Nephrol Necker Hosp.* 1994;23:247-264.
52. Juppner H, Abou-Samra AB, Freeman M, et al. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science.* Nov 15 1991;254(5034):1024-1026.
53. Lin HY, Harris TL, Flannery MS, et al. Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor. *Science.* Nov 15 1991;254(5034):1022-1024.
54. Kolakowski LF, Jr. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels.* 1994;2(1):1-7.
55. Smock SL, Vogt GA, Castleberry TA, et al. Molecular cloning and functional characterization of the canine parathyroid hormone/parathyroid hormone related peptide receptor (PTH1). *Mol Biol Rep.* 2001;28(4):235-243.
56. Minagawa M, Kwan MY, Bettoun JD, et al. Dissection of differentially regulated (G+C)-rich promoters of the human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene. *Endocrinology.* Jul 2000;141(7):2410-2421.
57. Urena P, Kong XF, Abou-Samra AB, et al. Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acids are widely distributed in rat tissues. *Endocrinology.* Aug 1993;133(2):617-623.
58. McCuaig KA, Lee HS, Clarke JC, et al. Parathyroid hormone/parathyroid hormone related peptide receptor gene transcripts are expressed from tissue-specific and ubiquitous promoters. *Nucleic Acids Res.* Jun 11 1995;23(11):1948-1955.
59. Lee H, McCuaig KA, White JH. Structure et expression tissulaire spécifique du gène codant pour le récepteur de l'hormone parathyroïdienne. *Médecine/Sciences.* 1996;12:183-188.
60. Bettoun JD, Kwan MY, Minagawa M, et al. Methylation patterns of human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene promoters are established several weeks prior to onset of their function. *Biochem Biophys Res Commun.* Jan 19 2000;267(2):482-487.
61. Bettoun JD, Minagawa M, Hendy GN, et al. Developmental upregulation of human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene expression from conserved and human-specific promoters. *J Clin Invest.* Sep 1 1998;102(5):958-967.

62. McCuaig KA, Clarke JC, White JH. Molecular cloning of the gene encoding the mouse parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 24 1994;91(11):5051-5055.
63. Williams LJ, Abou-Samra AB. The transcription factors SP1 and MAZ regulate expression of the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor gene. *J Mol Endocrinol*. Dec 2000;25(3):309-319.
64. Schipani E, Karga H, Karaplis AC, et al. Identical complementary deoxyribonucleic acids encode a human renal and bone parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. *Endocrinology*. May 1993;132(5):2157-2165.
65. Jiang B, Morimoto S, Yang J, et al. Expression of parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor in vascular endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998;31 Suppl 1:S142-144.
66. Watson PH, Fraher LJ, Natale BV, et al. Nuclear localization of the type 1 parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor in MC3T3-E1 cells: association with serum-induced cell proliferation. *Bone*. Mar 2000;26(3):221-225.
67. Watson PH, Fraher LJ, Hendy GN, et al. Nuclear localization of the type 1 PTH/PTHrP receptor in rat tissues. *J Bone Miner Res*. Jun 2000;15(6):1033-1044.
68. Tawfeek HA, Qian F, Abou-Samra AB. Phosphorylation of the receptor for PTH and PTHrP is required for internalization and regulates receptor signaling. *Mol Endocrinol*. Jan 2002;16(1):1-13.
69. Dicker F, Quitterer U, Winstel R, et al. Phosphorylation-independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 11 1999;96(10):5476-5481.
70. Malecz N, Bambino T, Bencsik M, et al. Identification of phosphorylation sites in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone. Receptor phosphorylation is not required for agonist-induced internalization. *Mol Endocrinol*. Dec 1998;12(12):1846-1856.
71. Blind E, Bambino T, Nissenson RA. Agonist-stimulated phosphorylation of the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein. *Endocrinology*. Oct 1995;136(10):4271-4277.
72. Flannery PJ, Spurney RF. Domains of the parathyroid hormone (PTH) receptor required for regulation by G protein-coupled receptor kinases (GRKs). *Biochem Pharmacol*. Oct 15 2001;62(8):1047-1058.
73. Qian F, Leung A, Abou-Samra A. Agonist-dependent phosphorylation of the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor. *Biochemistry*. May 5 1998;37(18):6240-6246.
74. Vilaradaga JP, Krasel C, Chauvin S, et al. Internalization determinants of the parathyroid hormone receptor differentially regulate beta-arrestin/receptor association. *J Biol Chem*. Mar 8 2002;277(10):8121-8129.
75. Castro M, Dicker F, Vilaradaga JP, et al. Dual regulation of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor signaling by protein kinase C and beta-arrestins. *Endocrinology*. Oct 2002;143(10):3854-3865.
76. Huang Z, Chen Y, Nissenson RA. The cytoplasmic tail of the G-protein-coupled receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein contains positive and negative signals for endocytosis. *J Biol Chem*. Jan 6 1995;270(1):151-156.

77. Jansen M. Über atypische Chondrodystrophie (Achondroplasie) und über eine noch nicht beschriebene angeborene Wachstumsstörung des Knochensystems: Metaphysäre Dysostosis. *Zeitschr Orthop Chir.* 1934;61:253-286.
78. Schipani E, Kruse K, Juppner H. A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia. *Science.* Apr 7 1995;268(5207):98-100.
79. Schipani E, Langman CB, Parfitt AM, et al. Constitutively activated receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *N Engl J Med.* Sep 5 1996;335(10):708-714.
80. Schipani E, Langman C, Hunzelman J, et al. A novel parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor mutation in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* Sep 1999;84(9):3052-3057.
81. Schipani E, Lanske B, Hunzelman J, et al. Targeted expression of constitutively active receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide delays endochondral bone formation and rescues mice that lack parathyroid hormone-related peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 9 1997;94(25):13689-13694.
82. Soegiarto DW, Kiachopoulos S, Schipani E, et al. Partial rescue of PTH/PTHrP receptor knockout mice by targeted expression of the Jansen transgene. *Endocrinology.* Dec 2001;142(12):5303-5310.
83. Blomstrand S, Claesson I, Save-Soderbergh J. A case of lethal congenital dwarfism with accelerated skeletal maturation. *Pediatr Radiol.* 1985;15(2):141-143.
84. Usdin TB, Modi W, Bonner TI. Assignment of the human PTH2 receptor gene (PTHR2) to chromosome 2q33 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics.* Oct 1 1996;37(1):140-141.
85. Usdin TB, Hilton J, Vertesi T, et al. Distribution of the parathyroid hormone 2 receptor in rat: immunolocalization reveals expression by several endocrine cells. *Endocrinology.* Jul 1999;140(7):3363-3371.
86. Usdin TB, Bonner TI, Harta G, et al. Distribution of parathyroid hormone-2 receptor messenger ribonucleic acid in rat. *Endocrinology.* Oct 1996;137(10):4285-4297.
87. Eichinger A, Fiaschi-Taesch N, Massfelder T, et al. Transcript expression of the tuberoinfundibular peptide (TIP)39/PTH2 receptor system and non-PTH1 receptor-mediated tonic effects of TIP39 and other PTH2 receptor ligands in renal vessels. *Endocrinology.* Aug 2002;143(8):3036-3043.
88. Gardella TJ, Luck MD, Jensen GS, et al. Converting parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) into a potent PTH-2 receptor agonist. *J Biol Chem.* Aug 16 1996;271(33):19888-19893.
89. Rolz C, Pellegrini M, Mierke DF. Molecular characterization of the receptor-ligand complex for parathyroid hormone. *Biochemistry.* May 18 1999;38(20):6397-6405.
90. Usdin TB, Hoare SR, Wang T, et al. TIP39: a new neuropeptide and PTH2-receptor agonist from hypothalamus. *Nat Neurosci.* Nov 1999;2(11):941-943.
91. John MR, Arai M, Rubin DA, et al. Identification and characterization of the murine and human gene encoding the tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Endocrinology.* Mar 2002;143(3):1047-1057.
92. Dobolyi A, Ueda H, Uchida H, et al. Anatomical and physiological evidence for involvement of tuberoinfundibular peptide of 39 residues in nociception. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 5 2002;99(3):1651-1656.

93. Behar V, Nakamoto C, Greenberg Z, et al. Histidine at position 5 is the specificity "switch" between two parathyroid hormone receptor subtypes. *Endocrinology*. Oct 1996;137(10):4217-4224.
94. Behar V, Pines M, Nakamoto C, et al. The human PTH2 receptor: binding and signal transduction properties of the stably expressed recombinant receptor. *Endocrinology*. Jul 1996;137(7):2748-2757.
95. Turner PR, Mefford S, Bambino T, et al. Transmembrane residues together with the amino terminus limit the response of the parathyroid hormone (PTH) 2 receptor to PTH-related peptide. *J Biol Chem*. Feb 13 1998;273(7):3830-3837.
96. Wysolmerski JJ, Stewart AF. The physiology of parathyroid hormone-related protein: an emerging role as a developmental factor. *Annu Rev Physiol*. 1998;60:431-460.
97. Escande B, Lindner V, Massfelder T, et al. Developmental aspects of parathyroid hormone-related protein biology. *Semin Perinatol*. Apr 2001;25(2):76-84.
98. Chan SD, Strewler GJ, King KL, et al. Expression of a parathyroid hormone-like protein and its receptor during differentiation of embryonal carcinoma cells. *Mol Endocrinol*. Apr 1990;4(4):638-646.
99. van de Stolpe A, Karperien M, Lowik CW, et al. Parathyroid hormone-related peptide as an endogenous inducer of parietal endoderm differentiation. *J Cell Biol*. Jan 1993;120(1):235-243.
100. Foley J, Dann P, Hong J, et al. Parathyroid hormone-related protein maintains mammary epithelial fate and triggers nipple skin differentiation during embryonic breast development. *Development*. Feb 2001;128(4):513-525.
101. Abdalkhani A, Sellers R, Gent J, et al. Nipple connective tissue and its development: insights from the K14-PTHrP mouse. *Mech Dev*. Jul 2002;115(1-2):63-77.
102. Kitahara Y, Suda N, Kuroda T, et al. Disturbed tooth development in parathyroid hormone-related protein (PTHrP)-gene knockout mice. *Bone*. Jan 2002;30(1):48-56.
103. Moseley JM, Hayman JA, Danks JA, et al. Immunohistochemical detection of parathyroid hormone-related protein in human fetal epithelia. *J Clin Endocrinol Metab*. Sep 1991;73(3):478-484.
104. Moniz C, Burton PB, Malik AN, et al. Parathyroid hormone-related peptide in normal human fetal development. *J Mol Endocrinol*. Dec 1990;5(3):259-266.
105. Burton PB, Moniz C, Quirke P, et al. Parathyroid hormone-related peptide: expression in fetal and neonatal development. *J Pathol*. Jul 1992;167(3):291-296.
106. Lee K, Deeds JD, Segre GV. Expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor messenger ribonucleic acids during fetal development of rats. *Endocrinology*. Feb 1995;136(2):453-463.
107. Karaplis AC, Luz A, Glowacki J, et al. Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev*. Feb 1 1994;8(3):277-289.
108. Amizuka N, Warshawsky H, Henderson JE, et al. Parathyroid hormone-related peptide-depleted mice show abnormal epiphyseal cartilage development and altered endochondral bone formation. *J Cell Biol*. Sep 1994;126(6):1611-1623.
109. Amizuka N, Karaplis AC, Henderson JE, et al. Haploinsufficiency of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) results in abnormal postnatal bone development. *Dev Biol*. Apr 10 1996;175(1):166-176.

110. Lanske B, Karaplis AC, Lee K, et al. PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science*. Aug 2 1996;273(5275):663-666.
111. Miao D, He B, Karaplis AC, et al. Parathyroid hormone is essential for normal fetal bone formation. *J Clin Invest*. May 2002;109(9):1173-1182.
112. Wysolmerski JJ, Philbrick WM, Dunbar ME, et al. Rescue of the parathyroid hormone-related protein knockout mouse demonstrates that parathyroid hormone-related protein is essential for mammary gland development. *Development*. Apr 1998;125(7):1285-1294.
113. Wlodek ME, Koutsis K, Westcott KT, et al. The spontaneously hypertensive rat fetus, not the mother, is responsible for the reduced amniotic fluid PTHrP concentrations and growth restriction. *Placenta*. Aug 2001;22(7):646-651.
114. Deftos LJ, Gazdar AF, Ikeda K, et al. The parathyroid hormone-related protein associated with malignancy is secreted by neuroendocrine tumors. *Mol Endocrinol*. Mar 1989;3(3):503-508.
115. Drucker DJ, Asa SL, Henderson J, et al. The parathyroid hormone-like peptide gene is expressed in the normal and neoplastic human endocrine pancreas. *Mol Endocrinol*. Oct 1989;3(10):1589-1595.
116. Lu C, Ikeda K, Deftos LJ, et al. Glucocorticoid regulation of parathyroid hormone-related peptide gene transcription in a human neuroendocrine cell line. *Mol Endocrinol*. Dec 1989;3(12):2034-2040.
117. Rizzoli R, Sappino AP, Bonjour JP. Parathyroid hormone-related protein and hypercalcemia in pancreatic neuro-endocrine tumors. *Int J Cancer*. Sep 15 1990;46(3):394-398.
118. Asa SL, Henderson J, Goltzman D, et al. Parathyroid hormone-like peptide in normal and neoplastic human endocrine tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. Nov 1990;71(5):1112-1118.
119. Danks JA, Ebeling PR, Hayman J, et al. Parathyroid hormone-related protein: immunohistochemical localization in cancers and in normal skin. *J Bone Miner Res*. Apr 1989;4(2):273-278.
120. Hayman JA, Danks JA, Ebeling PR, et al. Expression of parathyroid hormone related protein in normal skin and in tumours of skin and skin appendages. *J Pathol*. Aug 1989;158(4):293-296.
121. Motokura T, Fukumoto S, Takahashi S, et al. Expression of parathyroid hormone-related protein in a human T cell lymphotropic virus type I-infected T cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 15 1988;154(3):1182-1188.
122. Motokura T, Fukumoto S, Matsumoto T, et al. Parathyroid hormone-related protein in adult T-cell leukemia-lymphoma. *Ann Intern Med*. Sep 15 1989;111(6):484-488.
123. Rice BF, Ponthier RL, Jr., Miller MC, 3rd. Hypercalcemia and neoplasia: a model system. *Endocrinology*. May 1971;88(5):1210-1216.
124. Sica DA, Martodam RR, Aronow J, et al. The hypercalcemic rat Leydig cell tumor--a model of the humoral hypercalcemia of malignancy. *Calcif Tissue Int*. May 1983;35(3):287-293.
125. Meuten DJ, Segre GV, Capen CC, et al. Hypercalcemia in dogs with adenocarcinoma derived from apocrine glands of the anal sac. Biochemical and histomorphometric investigations. *Lab Invest*. Apr 1983;48(4):428-435.
126. Rosol TJ, Capen CC, Brooks CL. Bone and kidney adenylate cyclase-stimulating activity produced by a hypercalcemic canine adenocarcinoma line (CAC-8) maintained in nude mice. *Cancer Res*. Feb 1 1987;47(3):690-695.

127. Weir EC, Norrdin RW, Matus RE, et al. Humoral hypercalcemia of malignancy in canine lymphosarcoma. *Endocrinology*. Feb 1988;122(2):602-608.
128. Akino K, Ohtsuru A, Kanda K, et al. Parathyroid hormone-related peptide is a potent tumor angiogenic factor. *Endocrinology*. Nov 2000;141(11):4313-4316.
129. Amizuka N, Ozawa H, Sasaki T. The biological action of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) and fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) on bone and cartilage. *Kaibogaku Zasshi*. Oct 2000;75(5):415-425.
130. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, et al. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science*. Aug 2 1996;273(5275):613-622.
131. Vortkamp A. The Indian hedgehog--PTHrP system in bone development. *Ernst Schering Res Found Workshop*. 2000(29):191-209.
132. Alvarez J, Sohn P, Zeng X, et al. TGFbeta2 mediates the effects of hedgehog on hypertrophic differentiation and PTHrP expression. *Development*. Apr 2002;129(8):1913-1924.
133. Amizuka N, Fukushi-Irie M, Sasaki T, et al. Inefficient function of the signal sequence of PTHrP for targeting into the secretory pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. Jul 5 2000;273(2):621-629.
134. Weir EC, Brines ML, Ikeda K, et al. Parathyroid hormone-related peptide gene is expressed in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 1990;87(1):108-112.
135. Weaver DR, Deeds JD, Lee K, et al. Localization of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) and PTH/PTHrP receptor mRNAs in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*. Feb 1995;28(2):296-310.
136. Holt EH, Lu C, Dreyer BE, et al. Regulation of parathyroid hormone-related peptide gene expression by estrogen in GH4C1 rat pituitary cells has the pattern of a primary response gene. *J Neurochem*. Apr 1994;62(4):1239-1246.
137. Chattopadhyay N, Evliyaoglu C, Heese O, et al. Regulation of secretion of PTHrP by Ca(2+)-sensing receptor in human astrocytes, astrocytomas, and meningiomas. *Am J Physiol Cell Physiol*. Sep 2000;279(3):C691-699.
138. Yamamoto S, Morimoto I, Zeki K, et al. Centrally administered parathyroid hormone (PTH)-related protein(1-34) but not PTH(1-34) stimulates arginine-vasopressin secretion and its messenger ribonucleic acid expression in supraoptic nucleus of the conscious rats. *Endocrinology*. Jan 1998;139(1):383-388.
139. Atillasoy EJ, Burtis WJ, Milstone LM. Immunohistochemical localization of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in normal human skin. *J Invest Dermatol*. Feb 1991;96(2):277-280.
140. Senior PV, Heath DA, Beck F. Expression of parathyroid hormone-related protein mRNA in the rat before birth: demonstration by hybridization histochemistry. *J Mol Endocrinol*. Jun 1991;6(3):281-290.
141. Wysolmerski JJ, Broadus AE, Zhou J, et al. Overexpression of parathyroid hormone-related protein in the skin of transgenic mice interferes with hair follicle development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 1 1994;91(3):1133-1137.
142. Orloff JJ, Ganz MB, Ribaud AE, et al. Analysis of PTHrP binding and signal transduction mechanisms in benign and malignant squamous cells. *Am J Physiol*. May 1992;262(5 Pt 1):E599-607.
143. Holick MF, Ray S, Chen TC, et al. A parathyroid hormone antagonist stimulates epidermal proliferation and hair growth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 16 1994;91(17):8014-8016.

144. Holick MF, Chen ML, Kong XF, et al. Clinical uses for calcitropic hormones 1,25-dihydroxyvitamin D3 and parathyroid hormone-related peptide in dermatology: a new perspective. *J Invest Dermatol Symp Proc.* Apr 1996;1(1):1-9.
145. Peters EM, Foitzik K, Paus R, et al. A new strategy for modulating chemotherapy-induced alopecia, using PTH/PTHrP receptor agonist and antagonist. *J Invest Dermatol.* Aug 2001;117(2):173-178.
146. Thiede MA, Rodan GA. Expression of a calcium-mobilizing parathyroid hormone-like peptide in lactating mammary tissue. *Science.* Oct 14 1988;242(4876):278-280.
147. Budayr AA, Halloran BP, King JC, et al. High levels of a parathyroid hormone-like protein in milk. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 1989;86(18):7183-7185.
148. Ratcliffe WA, Thompson GE, Care AD, et al. Production of parathyroid hormone-related protein by the mammary gland of the goat. *J Endocrinol.* Apr 1992;133(1):87-93.
149. Stewart AF, Wu TL, Insogna KL, et al. Immunoaffinity purification of parathyroid hormone-related protein from bovine milk and human keratinocyte-conditioned medium. *J Bone Miner Res.* Mar 1991;6(3):305-311.
150. Thurston AW, Cole JA, Hillman LS, et al. Purification and properties of parathyroid hormone-related peptide isolated from milk. *Endocrinology.* Feb 1990;126(2):1183-1190.
151. Goff JP, Reinhardt TA, Lee S, et al. Parathyroid hormone-related peptide content of bovine milk and calf blood assessed by radioimmunoassay and bioassay. *Endocrinology.* Dec 1991;129(6):2815-2819.
152. Law FM, Moate PJ, Leaver DD, et al. Parathyroid hormone-related protein in milk and its correlation with bovine milk calcium. *J Endocrinol.* Jan 1991;128(1):21-26.
153. Rakopoulos M, Vargas SJ, Gillespie MT, et al. Production of parathyroid hormone-related protein by the rat mammary gland in pregnancy and lactation. *Am J Physiol.* Dec 1992;263(6 Pt 1):E1077-1085.
154. Yamamoto M, Fisher JE, Thiede MA, et al. Concentrations of parathyroid hormone-related protein in rat milk change with duration of lactation and interval from previous suckling, but not with milk calcium. *Endocrinology.* Feb 1992;130(2):741-747.
155. VanHouten JN, Dann P, Stewart AF, et al. Mammary-specific deletion of parathyroid hormone-related protein preserves bone mass during lactation. *J Clin Invest.* Nov 2003;112(9):1429-1436.
156. Davicco MJ, Rouffet J, Durand D, et al. Parathyroid hormone-related peptide may increase mammary blood flow. *J Bone Miner Res.* Dec 1993;8(12):1519-1524.
157. Hastings RH, Summers-Torres D, Yaszay B, et al. Parathyroid hormone-related protein, an autocrine growth inhibitor of alveolar type II cells. *Am J Physiol.* Mar 1997;272(3 Pt 1):L394-399.
158. Torday JS, Sun H, Wang L, et al. Leptin mediates the parathyroid hormone-related protein paracrine stimulation of fetal lung maturation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Mar 2002;282(3):L405-410.
159. Campos RV, Asa SL, Drucker DJ. Immunocytochemical localization of parathyroid hormone-like peptide in the rat fetus. *Cancer Res.* Dec 1 1991;51(23 Pt 1):6351-6357.
160. Kramer S, Reynolds FH, Jr., Castillo M, et al. Immunological identification and distribution of parathyroid hormone-like protein polypeptides in normal and malignant tissues. *Endocrinology.* Apr 1991;128(4):1927-1937.

161. Ikeda K, Weir EC, Mangin M, et al. Expression of messenger ribonucleic acids encoding a parathyroid hormone-like peptide in normal human and animal tissues with abnormal expression in human parathyroid adenomas. *Mol Endocrinol*. Dec 1988;2(12):1230-1236.
162. Ikeda K, Mangin M, Dreyer BE, et al. Identification of transcripts encoding a parathyroid hormone-like peptide in messenger RNAs from a variety of human and animal tumors associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *J Clin Invest*. Jun 1988;81(6):2010-2014.
163. Mangin M, Ikeda K, Broadus AE. Structure of the mouse gene encoding parathyroid hormone-related peptide. *Gene*. Nov 15 1990;95(2):195-202.
164. MacIsaac RJ, Heath JA, Rodda CP, et al. Role of the fetal parathyroid glands and parathyroid hormone-related protein in the regulation of placental transport of calcium, magnesium and inorganic phosphate. *Reprod Fertil Dev*. 1991;3(4):447-457.
165. Rodda CP, Kubota M, Heath JA, et al. Evidence for a novel parathyroid hormone-related protein in fetal lamb parathyroid glands and sheep placenta: comparisons with a similar protein implicated in humoral hypercalcaemia of malignancy. *J Endocrinol*. May 1988;117(2):261-271.
166. Gaich G, Orloff JJ, Atillasoy EJ, et al. Amino-terminal parathyroid hormone-related protein: specific binding and cytosolic calcium responses in rat insulinoma cells. *Endocrinology*. Mar 1993;132(3):1402-1409.
167. Vasavada RC, Cavaliere C, D'Ercole AJ, et al. Overexpression of parathyroid hormone-related protein in the pancreatic islets of transgenic mice causes islet hyperplasia, hyperinsulinemia, and hypoglycemia. *J Biol Chem*. Jan 12 1996;271(2):1200-1208.
168. Qian J, Lorenz JN, Maeda S, et al. Reduced blood pressure and increased sensitivity of the vasculature to parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in transgenic mice overexpressing the PTH/PTHrP receptor in vascular smooth muscle. *Endocrinology*. Apr 1999;140(4):1826-1833.
169. Qian J, Colbert MC, Witte D, et al. Midgestational lethality in mice lacking the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor is associated with abrupt cardiomyocyte death. *Endocrinology*. Mar 2003;144(3):1053-1061.
170. Deftos LJ, Burton DW, Brandt DW. Parathyroid hormone-like protein is a secretory product of atrial myocytes. *J Clin Invest*. Aug 1993;92(2):727-735.
171. Hara M, Liu YM, Zhen L, et al. Positive chronotropic actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide are associated with increases in the current, I(f), and the slope of the pacemaker potential. *Circulation*. Nov 18 1997;96(10):3704-3709.
172. Ogino K, Burkhoff D, Bilezikian JP. The hemodynamic basis for the cardiac effects of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein. *Endocrinology*. Jul 1995;136(7):3024-3030.
173. Schluter K, Katzer C, Frischkopf K, et al. Expression, release, and biological activity of parathyroid hormone-related peptide from coronary endothelial cells. *Circ Res*. May 12 2000;86(9):946-951.
174. Schluter KD, Weber M, Piper HM. Effects of PTH-rP(107-111) and PTH-rP(7-34) on adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. Nov 1997;29(11):3057-3065.
175. Schluter KD, Piper HM. Cardiovascular actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Cardiovasc Res*. Jan 1998;37(1):34-41.

176. Wenzel S, Schorr K, Degenhardt H, et al. TGF-beta(1) downregulates PTHrP in coronary endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* Jun 2001;33(6):1181-1190.
177. Ogino K, Ogura K, Kinugasa Y, et al. Parathyroid hormone-related protein is produced in the myocardium and increased in patients with congestive heart failure. *J Clin Endocrinol Metab.* Oct 2002;87(10):4722-4727.
178. Garcia-Ocana A, Galbraith SC, Van Why SK, et al. Expression and role of parathyroid hormone-related protein in human renal proximal tubule cells during recovery from ATP depletion. *J Am Soc Nephrol.* Feb 1999;10(2):238-244.
179. Collip JP, Clark EP. Further studies on the physiological action of a parathyroid hormone. *J Biol Chem.* 1925;64:485-507.
180. Schluter KD. PTH and PTHrP: similar structures but different functions. *News Physiol Sci.* Dec 1999;14:243-249.
181. Lang H, Endlich N, Lindner V, et al. Parathyroid hormone-related protein in rat penis: expression, localization, and effect on cavernosal pressure. *Endocrinology.* Sep 1999;140(9):4342-4350.
182. Mok LL, Ajiwe E, Martin TJ, et al. Parathyroid hormone-related protein relaxes rat gastric smooth muscle and shows cross-desensitization with parathyroid hormone. *J Bone Miner Res.* Jun 1989;4(3):433-439.
183. Nickols GA, Nickols MA, Helwig JJ. Binding of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein to vascular smooth muscle of rabbit renal microvessels. *Endocrinology.* Feb 1990;126(2):721-727.
184. Nickols GA. Increased cyclic AMP in cultured vascular smooth muscle cells and relaxation of aortic strips by parathyroid hormone. *Eur J Pharmacol.* Oct 8 1985;116(1-2):137-144.
185. Nickols GA, Cline WH, Jr. Parathyroid hormone-induced changes in cyclic nucleotide levels during relaxation of the rabbit [correction of rat] aorta. *Life Sci.* Jun 15 1987;40(24):2351-2359.
186. Nickols GA, Metz MA, Cline WH, Jr. Endothelium-independent linkage of parathyroid hormone receptors of rat vascular tissue with increased adenosine 3',5'-monophosphate and relaxation of vascular smooth muscle. *Endocrinology.* Jul 1986;119(1):349-356.
187. Pang PK, Yang MC, Tenner TE, Jr., et al. Cyclic AMP and the vascular action of parathyroid hormone. *Can J Physiol Pharmacol.* Dec 1986;64(12):1543-1547.
188. Horowitz A, Menice CB, Laporte R, et al. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev.* Oct 1996;76(4):967-1003.
189. Parsons JA, Robinson CJ. Calcium shift into bone causing transient hypocalcaemia after injection of parathyroid hormone. *Nature.* Apr 30 1971;230(5296):581-582.
190. Schleiffer R, Berthelot A, Gairard A. Action of parathyroid extract on arterial blood pressure and on contraction and ⁴⁵Ca exchange in isolated aorta of the rat. *Eur J Pharmacol.* Sep 15 1979;58(2):163-167.
191. Pang PK, Yang MC, Sham JS. Parathyroid hormone and calcium entry blockade in a vascular tissue. *Life Sci.* 1988;42(14):1395-1400.
192. Pang PK, Wang R, Shan J, et al. Specific inhibition of long-lasting, L-type calcium channels by synthetic parathyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 1990;87(2):623-627.

193. Yang MC, Kuo JS, Pang PK. Mechanisms of the vascular action of parathyroid hormone. *J Pharmacol Exp Ther.* Feb 1990;252(2):840-844.
194. Schleiffer R. Calcium, hormone parathyroïdienne (PTH) et système cardiovasculaire: approche expérimentale in vivo et in vitro chez le rat hypertendu et normotendu. *Thèse pour l'obtention du grade de Docteur ès-Sciences.* 1988.
195. Hino T, Nyby MD, Fittingoff M, et al. Parathyroid hormone analogues inhibit calcium mobilization in cultured vascular cells. *Hypertension.* Mar 1994;23(3):402-408.
196. Simeoni U, Massfelder T, Saussine C, et al. Involvement of nitric oxide in the vasodilatory response to parathyroid hormone-related peptide in the isolated rabbit kidney. *Clin Sci (Lond).* Mar 1994;86(3):245-249.
197. Kalinowski L, Dobrucki LW, Malinski T. Nitric oxide as a second messenger in parathyroid hormone-related protein signaling. *J Endocrinol.* Aug 2001;170(2):433-440.
198. Sutliff RL, Weber CS, Qian J, et al. Vasorelaxant properties of parathyroid hormone-related protein in the mouse: evidence for endothelium involvement independent of nitric oxide formation. *Endocrinology.* May 1999;140(5):2077-2083.
199. Nagao S, Seto S, Kitamura S, et al. Central pressor effect of parathyroid hormone-related protein in conscious rats. *Brain Res.* Feb 23 1998;785(1):75-79.
200. Yamamoto S, Morimoto I, Yanagihara N, et al. Parathyroid hormone-related peptide-(1-34) [PTHrP-(1-34)] induces vasopressin release from the rat supraoptic nucleus in vitro through a novel receptor distinct from a type I or type II PTH/PTHrP receptor. *Endocrinology.* May 1997;138(5):2066-2072.
201. Yamamoto S, Morimoto I, Tanaka Y, et al. The mutual regulation of arginine-vasopressin and PTHrP secretion in dissociated supraoptic neurons. *Endocrinology.* Apr 2002;143(4):1521-1529.
202. Maeda S, Sutliff RL, Qian J, et al. Targeted overexpression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) to vascular smooth muscle in transgenic mice lowers blood pressure and alters vascular contractility. *Endocrinology.* Apr 1999;140(4):1815-1825.
203. Massfelder T, Stewart AF, Endlich K, et al. Parathyroid hormone-related protein detection and interaction with NO and cyclic AMP in the renovascular system. *Kidney Int.* Nov 1996;50(5):1591-1603.
204. Bosch RJ, Rodriguez-Puyol D, Bover J, et al. Parathyroid hormone-related protein: roles in the glomerulus. *Exp Nephrol.* May-Jun 1999;7(3):212-216.
205. Esbrit P, Egido J. The emerging role of parathyroid hormone-related protein as a renal regulating factor. *Nephrol Dial Transplant.* Aug 2000;15(8):1109-1111.
206. Esbrit P, Santos S, Ortega A, et al. Parathyroid hormone-related protein as a renal regulating factor. From vessels to glomeruli and tubular epithelium. *Am J Nephrol.* May-Jun 2001;21(3):179-184.
207. Amizuka N, Lee HS, Kwan MY, et al. Cell-specific expression of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene in kidney from kidney-specific and ubiquitous promoters. *Endocrinology.* Jan 1997;138(1):469-481.
208. Lee K, Brown D, Urena P, et al. Localization of parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor mRNA in kidney. *Am J Physiol.* Jan 1996;270(1 Pt 2):F186-191.

209. Sorkin A, Westermark B, Heldin CH, et al. Effect of receptor kinase inactivation on the rate of internalization and degradation of PDGF and the PDGF beta-receptor. *J Cell Biol.* Feb 1991;112(3):469-478.
210. Simeoni U, Zhu B, Muller C, et al. Postnatal development of vascular resistance of the rabbit isolated perfused kidney: modulation by nitric oxide and angiotensin II. *Pediatr Res.* Oct 1997;42(4):550-555.
211. Roca-Cusachs A, DiPette DJ, Nickols GA. Regional and systemic hemodynamic effects of parathyroid hormone-related protein: preservation of cardiac function and coronary and renal flow with reduced blood pressure. *J Pharmacol Exp Ther.* Jan 1991;256(1):110-118.
212. Wolzt M, Schmetterer L, Dorner G, et al. Hemodynamic effects of parathyroid hormone-related peptide-(1-34) in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* Aug 1997;82(8):2548-2551.
213. Winquist RJ, Baskin EP, Vlasuk GP. Synthetic tumor-derived human hypercalcemic factor exhibits parathyroid hormone-like vasorelaxation in renal arteries. *Biochem Biophys Res Commun.* Nov 30 1987;149(1):227-232.
214. Musso MJ, Plante M, Judes C, et al. Renal vasodilatation and microvessel adenylate cyclase stimulation by synthetic parathyroid hormone-like protein fragments. *Eur J Pharmacol.* Dec 19 1989;174(2-3):139-151.
215. Fiaschi-Taesch N, Endlich N, Massfelder T, et al. Renovascular parathyroid hormone-related protein in spontaneously hypertensive rats: dilator or trophic factor? *Kidney Int Suppl.* Sep 1998;67:S207-210.
216. Trizna W, Edwards RM. Relaxation of renal arterioles by parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein. *Pharmacology.* 1991;42(2):91-96.
217. Massfelder T, Endlich K, Helwig JJ, et al. Vascular effects of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein in the split hydronephrotic rat kidney. *J Physiol (London).* 1995;483:481-490.
218. Massfelder T, Parekh N, Endlich K, et al. Effect of intrarenally infused parathyroid hormone-related protein on renal blood flow and glomerular filtration rate in the anaesthetized rat. *Br J Pharmacol.* Aug 1996;118(8):1995-2000.
219. Musso MJ, Barthelmebs M, Imbs JL, et al. The vasodilator action of parathyroid hormone fragments on isolated perfused rat kidney. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Aug 1989;340(2):246-251.
220. Massfelder T, Stewart AF, Helwig JJ. Parathyroid-hormone-related protein: a previously unrecognized renal vasodilator. *Nephrol Dial Transplant.* Nov 1995;10(11):1984-1986.
221. Massfelder T, Taesch N, Fritsch S, et al. Type 1 parathyroid hormone receptor expression level modulates renal tone and plasma renin activity in spontaneously hypertensive rat. *J Am Soc Nephrol.* Mar 2002;13(3):639-648.
222. Endlich N, Nobiling R, Kriz W, et al. Expression and signaling of parathyroid hormone-related protein in cultured podocytes. *Exp Nephrol.* 2001;9(6):436-443.
223. Helwig JJ, Musso MJ, Judes C, et al. Parathyroid hormone and calcium: interactions in the control of renin secretion in the isolated, nonfiltering rat kidney. *Endocrinology.* Sep 1991;129(3):1233-1242.
224. Saussine C, Judes C, Massfelder T, et al. Stimulatory action of parathyroid hormone on renin secretion in vitro: a study using isolated rat kidney, isolated rabbit glomeruli and superfused dispersed rat juxtaglomerular cells. *Clin Sci (Lond).* Jan 1993;84(1):11-19.

225. Saussine C, Massfelder T, Parnin F, et al. Renin stimulating properties of parathyroid hormone-related peptide in the isolated perfused rat kidney. *Kidney Int.* Oct 1993;44(4):764-773.
226. Endlich N, Endlich K, Taesch N, et al. Culture of vascular smooth muscle cells from small arteries of the rat kidney. *Kidney Int.* Jun 2000;57(6):2468-2475.
227. Massfelder T, Dann P, Wu TL, et al. Opposing mitogenic and anti-mitogenic actions of parathyroid hormone-related protein in vascular smooth muscle cells: a critical role for nuclear targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 9 1997;94(25):13630-13635.
228. Soifer NE, Van Why SK, Ganz MB, et al. Expression of parathyroid hormone-related protein in the rat glomerulus and tubule during recovery from renal ischemia. *J Clin Invest.* Dec 1993;92(6):2850-2857.
229. Bosch RJ, Rojo-Linares P, Torrecillas-Casamayor G, et al. Effects of parathyroid hormone-related protein on human mesangial cells in culture. *Am J Physiol.* Dec 1999;277(6 Pt 1):E990-995.
230. Garcia-Ocana A, De Miguel F, Penaranda C, et al. Parathyroid hormone-related protein is an autocrine modulator of rabbit proximal tubule cell growth. *J Bone Miner Res.* Dec 1995;10(12):1875-1884.
231. Pirola CJ, Wang HM, Kamyar A, et al. Angiotensin II regulates parathyroid hormone-related protein expression in cultured rat aortic smooth muscle cells through transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem.* Jan 25 1993;268(3):1987-1994.
232. Yamamoto M, Harm SC, Grasser WA, et al. Parathyroid hormone-related protein in the rat urinary bladder: a smooth muscle relaxant produced locally in response to mechanical stretch. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 15 1992;89(12):5326-5330.
233. Noda M, Katoh T, Takuwa N, et al. Synergistic stimulation of parathyroid hormone-related peptide gene expression by mechanical stretch and angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem.* Jul 8 1994;269(27):17911-17917.
234. Steers WD, Broder SR, Persson K, et al. Mechanical stretch increases secretion of parathyroid hormone-related protein by cultured bladder smooth muscle cells. *J Urol.* Sep 1998;160(3 Pt 1):908-912.
235. Thiede MA, Harm SC, McKee RL, et al. Expression of the parathyroid hormone-related protein gene in the avian oviduct: potential role as a local modulator of vascular smooth muscle tension and shell gland motility during the egg-laying cycle. *Endocrinology.* Oct 1991;129(4):1958-1966.
236. Pirola CJ, Wang HM, Strgacich MI, et al. Mechanical stimuli induce vascular parathyroid hormone-related protein gene expression in vivo and in vitro. *Endocrinology.* May 1994;134(5):2230-2236.
237. Daifotis AG, Weir EC, Dreyer BE, et al. Stretch-induced parathyroid hormone-related peptide gene expression in the rat uterus. *J Biol Chem.* Nov 25 1992;267(33):23455-23458.
238. Mok LL, Cooper CW, Thompson JC. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein inhibit phasic contraction of pig duodenal smooth muscle. *Proc Soc Exp Biol Med.* Sep 1989;191(4):337-340.
239. Botella A, Rekik M, Delvaux M, et al. Parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide induce relaxation of smooth muscle cells from guinea pig ileum: interaction with vasoactive intestinal peptide receptors. *Endocrinology.* Nov 1994;135(5):2160-2167.
240. Ito M, Ohtsuru A, Enomoto H, et al. Expression of parathyroid hormone-related peptide in relation to perturbations of gastric motility in the rat. *Endocrinology.* Apr 1994;134(4):1936-1942.

241. Shenberger JS, Shew RL, Johnson DE, et al. Relaxation of porcine tracheal smooth muscle by parathyroid hormone-related protein. *Respir Physiol*. Jan 1997;107(1):59-66.
242. Shenberger JS, Dixon PS, Choate J, et al. Pregnancy and labor increase the capacity of human myometrial cells to secrete parathyroid hormone-related protein. *Life Sci*. Feb 16 2001;68(13):1557-1566.
243. Allinson ET, Drucker DJ. Parathyroid hormone-like peptide shares features with members of the early response gene family: rapid induction by serum, growth factors, and cycloheximide. *Cancer Res*. Jun 1 1992;52(11):3103-3109.
244. Garcia SI, Clemens TL, Fagin JA, et al. Parathyroid hormone-related protein expression in vascular smooth muscle of spontaneously hypertensive rats: evidence for lack of response to angiotensin II. *J Hypertens*. Oct 1998;16(10):1467-1474.
245. Hongo T, Kupfer J, Enomoto H, et al. Abundant expression of parathyroid hormone-related protein in primary rat aortic smooth muscle cells accompanies serum-induced proliferation. *J Clin Invest*. Dec 1991;88(6):1841-1847.
246. Massfelder T, Taesch N, Endlich N, et al. Paradoxical actions of exogenous and endogenous parathyroid hormone-related protein on renal vascular smooth muscle cell proliferation: reversion in the SHR model of genetic hypertension. *Faseb J*. Mar 2001;15(3):707-718.
247. Nakamura A, Isoyama S, Watanabe T, et al. Heterogeneous smooth muscle cell population derived from small and larger arteries. *Microvasc Res*. Jan 1998;55(1):14-28.
248. Nakayama T, Ohtsuru A, Enomoto H, et al. Coronary atherosclerotic smooth muscle cells overexpress human parathyroid hormone-related peptides. *Biochem Biophys Res Commun*. Apr 29 1994;200(2):1028-1035.
249. Nishizawa Y, Koyama H, Shioi A, et al. Parathyroid hormone-related peptide and models of vascular disease: its expression and action in vascular smooth muscle cells. *Miner Electrolyte Metab*. 1995;21(1-3):152-156.
250. Noda M, Katoh T, Kurokawa K, et al. Increased expression of parathyroid hormone-related peptide gene in blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. Nov 1997;30(5):1284-1288.
251. Ozeki S, Ohtsuru A, Seto S, et al. Evidence that implicates the parathyroid hormone-related peptide in vascular stenosis. Increased gene expression in the intima of injured carotid arteries and human restenotic coronary lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Apr 1996;16(4):565-575.
252. Takahashi K, Inoue D, Ando K, et al. Parathyroid hormone-related peptide as a locally produced vasorelaxant: regulation of its mRNA by hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. Mar 8 1995;208(1):447-455.
253. Wu S, Pirola CJ, Green J, et al. Effects of N-terminal, midregion, and C-terminal parathyroid hormone-related peptides on adenosine 3',5'-monophosphate and cytoplasmic free calcium in rat aortic smooth muscle cells and UMR-106 osteoblast-like cells. *Endocrinology*. Dec 1993;133(6):2437-2444.
254. Maeda S, Wu S, Juppner H, et al. Cell-specific signal transduction of parathyroid hormone (PTH)-related protein through stably expressed recombinant PTH/PTHrP receptors in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*. Aug 1996;137(8):3154-3162.

255. Ishikawa M, Akishita M, Kozaki K, et al. Amino-terminal fragment (1-34) of parathyroid hormone-related protein inhibits migration and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. Jan 1998;136(1):59-66.
256. Stuart WD, Maeda S, Khera P, et al. Parathyroid hormone-related protein induces G1 phase growth arrest of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Jul 2000;279(1):E60-67.
257. Okano K, Pirola CJ, Wang HM, et al. Involvement of cell cycle and mitogen-activated pathways in induction of parathyroid hormone-related protein gene expression in rat aortic smooth muscle cells. *Endocrinology*. Apr 1995;136(4):1782-1789.
258. Lam MH, Olsen SL, Rankin WA, et al. PTHrP and cell division: expression and localization of PTHrP in a keratinocyte cell line (HaCaT) during the cell cycle. *J Cell Physiol*. Dec 1997;173(3):433-446.
259. de Rooij J, Rehmann H, van Triest M, et al. Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *J Biol Chem*. Jul 7 2000;275(27):20829-20836.
260. Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, et al. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science*. Dec 18 1998;282(5397):2275-2279.
261. Bornfeldt KE, Krebs EG. Crosstalk between protein kinase A and growth factor receptor signaling pathways in arterial smooth muscle. *Cell Signal*. Jul 1999;11(7):465-477.
262. Toker A. Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Mol Pharmacol*. Apr 2000;57(4):652-658.
263. Jones SM, Klinghoffer R, Prestwich GD, et al. PDGF induces an early and a late wave of PI 3-kinase activity, and only the late wave is required for progression through G1. *Curr Biol*. May 20 1999;9(10):512-521.
264. Takawa N, Fukui Y, Takawa Y. Cyclin D1 expression mediated by phosphatidylinositol 3-kinase through mTOR-p70(S6K)-independent signaling in growth factor-stimulated NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol*. Feb 1999;19(2):1346-1358.
265. Koyama H, Bornfeldt KE, Fukumoto S, et al. Molecular pathways of cyclic nucleotide-induced inhibition of arterial smooth muscle cell proliferation. *J Cell Physiol*. Jan 2001;186(1):1-10.
266. Henderson JE, Amizuka N, Warshawsky H, et al. Nucleolar localization of parathyroid hormone-related peptide enhances survival of chondrocytes under conditions that promote apoptotic cell death. *Mol Cell Biol*. Aug 1995;15(8):4064-4075.
267. de Miguel F, Fiaschi-Taesch N, Lopez-Talavera JC, et al. The C-terminal region of PTHrP, in addition to the nuclear localization signal, is essential for the intracrine stimulation of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*. Sep 2001;142(9):4096-4105.
268. Fiaschi-Taesch N, Takane KK, Masters S, et al. Parathyroid-hormone-related protein as a regulator of pRb and the cell cycle in arterial smooth muscle. *Circulation*. Jul 13 2004;110(2):177-185.
269. Roghani M, Moscatelli D. Basic fibroblast growth factor is internalized through both receptor-mediated and heparan sulfate-mediated mechanisms. *J Biol Chem*. Nov 5 1992;267(31):22156-22162.
270. Hatzi E, Bassaglia Y, Badet J. Internalization and processing of human angiogenin by cultured aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Jan 27 2000;267(3):719-725.

271. Huang Z, Bambino T, Chen Y, et al. Role of signal transduction in internalization of the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein. *Endocrinology*. Mar 1999;140(3):1294-1300.
272. Joun H, Lanske B, Karperien M, et al. Tissue-specific transcription start sites and alternative splicing of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide (PTHrP) receptor gene: a new PTH/PTHrP receptor splice variant that lacks the signal peptide. *Endocrinology*. Apr 1997;138(4):1742-1749.
273. Maher PA. Identification and characterization of a novel, intracellular isoform of fibroblast growth factor receptor-1(FGFR-1). *J Cell Physiol*. Nov 1996;169(2):380-390.
274. Aarts MM, Rix A, Guo J, et al. The nucleolar targeting signal (NTS) of parathyroid hormone related protein mediates endocytosis and nucleolar translocation. *J Bone Miner Res*. Sep 1999;14(9):1493-1503.
275. Yang KH, dePapp AE, Soifer NE, et al. Parathyroid hormone-related protein: evidence for isoform- and tissue-specific posttranslational processing. *Biochemistry*. Jun 14 1994;33(23):7460-7469.
276. Vagner S, Touriol C, Galy B, et al. Translation of CUG- but not AUG-initiated forms of human fibroblast growth factor 2 is activated in transformed and stressed cells. *J Cell Biol*. Dec 1996;135(5):1391-1402.
277. Kozak M. How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell*. Dec 1978;15(4):1109-1123.
278. Kozak M, Shatkin AJ. Characterization of translational initiation regions from eukaryotic messenger RNAs. *Methods Enzymol*. 1979;60:360-375.
279. Kozak M. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*. Jul 8 1999;234(2):187-208.
280. Kozak M. A progress report on translational control in eukaryotes. *Sci STKE*. Feb 27 2001;2001(71):PE1.
281. Nguyen M, He B, Karaplis A. Nuclear forms of parathyroid hormone-related peptide are translated from non-AUG start sites downstream from the initiator methionine. *Endocrinology*. Feb 2001;142(2):694-703.
282. Gorelick FS, Shugrue C. Exiting the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Endocrinol*. May 25 2001;177(1-2):13-18.
283. Nguyen MT, Karaplis AC. The nucleus: a target site for parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) action. *J Cell Biochem*. Aug 1 1998;70(2):193-199.
284. Jans DA, Xiao CY, Lam MH. Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *Bioessays*. Jun 2000;22(6):532-544.
285. Lam MH, Briggs LJ, Hu W, et al. Importin beta recognizes parathyroid hormone-related protein with high affinity and mediates its nuclear import in the absence of importin alpha. *J Biol Chem*. Mar 12 1999;274(11):7391-7398.
286. Lam MH, Hu W, Xiao CY, et al. Molecular dissection of the importin beta1-recognized nuclear targeting signal of parathyroid hormone-related protein. *Biochem Biophys Res Commun*. Mar 30 2001;282(2):629-634.
287. Lam MH, Thomas RJ, Loveland KL, et al. Nuclear transport of parathyroid hormone (PTH)-related protein is dependent on microtubules. *Mol Endocrinol*. Feb 2002;16(2):390-401.

288. Lam MH, House CM, Tiganis T, et al. Phosphorylation at the cyclin-dependent kinases site (Thr85) of parathyroid hormone-related protein negatively regulates its nuclear localization. *J Biol Chem.* Jun 25 1999;274(26):18559-18566.
289. Lam MH, Henderson B, Gillespie MT, et al. Dynamics of leptomycin B-sensitive nucleocytoplasmic flux of parathyroid hormone-related protein. *Traffic.* Nov 2001;2(11):812-819.
290. Tovar Sepulveda VA, Shen X, Falzon M. Intracrine PTHrP protects against serum starvation-induced apoptosis and regulates the cell cycle in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology.* Feb 2002;143(2):596-606.
291. Dougherty KM, Blomme EA, Koh AJ, et al. Parathyroid hormone-related protein as a growth regulator of prostate carcinoma. *Cancer Res.* Dec 1 1999;59(23):6015-6022.
292. Ye Y, Falzon M, Seitz PK, et al. Overexpression of parathyroid hormone-related protein promotes cell growth in the rat intestinal cell line IEC-6. *Regul Pept.* Jun 15 2001;99(2-3):169-174.
293. Pederson T. Growth factors in the nucleolus? *J Cell Biol.* Oct 19 1998;143(2):279-281.
294. Pederson T. The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res.* Sep 1 1998;26(17):3871-3876.
295. Aarts MM, Levy D, He B, et al. Parathyroid hormone-related protein interacts with RNA. *J Biol Chem.* Feb 19 1999;274(8):4832-4838.
296. Aarts MM, Davidson D, Corluka A, et al. Parathyroid hormone-related protein promotes quiescence and survival of serum-deprived chondrocytes by inhibiting rRNA synthesis. *J Biol Chem.* Oct 12 2001;276(41):37934-37943.
297. Singer JD, Gurian-West M, Clurman B, et al. Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. *Genes Dev.* Sep 15 1999;13(18):2375-2387.
298. Massfelder T, Lang H, Schordan E, et al. Parathyroid hormone-related protein is an essential growth factor for human clear cell renal carcinoma and a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res.* Jan 1 2004;64(1):180-188.
299. Krek W. BTB proteins as henchmen of Cul3-based ubiquitin ligases. *Nat Cell Biol.* Nov 2003;5(11):950-951.
300. Xu L, Wei Y, Reboul J, et al. BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. *Nature.* Sep 18 2003;425(6955):316-321.
301. Pintard L, Willis JH, Willems A, et al. The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature.* Sep 18 2003;425(6955):311-316.
302. Cullinan SB, Gordan JD, Jin J, et al. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol.* Oct 2004;24(19):8477-8486.
303. Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol.* Aug 2004;24(16):7130-7139.
304. Dhakshinamoorthy S, Porter AG. Nitric oxide-induced transcriptional up-regulation of protective genes by Nrf2 via the antioxidant response element counteracts apoptosis of neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* May 7 2004;279(19):20096-20107.

305. Kwak MK, Wakabayashi N, Kensler TW. Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. *Mutat Res*. Nov 2 2004;555(1-2):133-148.
306. Furukawa M, Xiong Y. BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase. *Mol Cell Biol*. Jan 2005;25(1):162-171.
307. Zhang DD, Lo SC, Cross JV, et al. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol*. Dec 2004;24(24):10941-10953.
308. Wilkins A, Ping Q, Carpenter CL. RhoBTB2 is a substrate of the mammalian Cul3 ubiquitin ligase complex. *Genes Dev*. Apr 15 2004;18(8):856-861.
309. Reusch P, Wagdy H, Reusch R, et al. Mechanical strain increases smooth muscle and decreases nonmuscle myosin expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. Nov 1996;79(5):1046-1053.
310. Birukov KG, Shirinsky VP, Stepanova OV, et al. Stretch affects phenotype and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem*. Mar 23 1995;144(2):131-139.
311. Williams B. Mechanical influences on vascular smooth muscle cell function. *J Hypertens*. Dec 1998;16(12 Pt 2):1921-1929.
312. Li C, Xu Q. Mechanical stress-initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal*. Jul 2000;12(7):435-445.
313. Aplin AE, Howe A, Alahari SK, et al. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev*. Jun 1998;50(2):197-263.
314. Muller JM, Chilian WM, Davis MJ. Integrin signaling transduces shear stress--dependent vasodilation of coronary arterioles. *Circ Res*. Mar 1997;80(3):320-326.
315. Wilson E, Sudhir K, Ives HE. Mechanical strain of rat vascular smooth muscle cells is sensed by specific extracellular matrix/integrin interactions. *J Clin Invest*. Nov 1995;96(5):2364-2372.
316. Morawietz H, Ma YH, Vives F, et al. Rapid induction and translocation of Egr-1 in response to mechanical strain in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. Apr 2 1999;84(6):678-687.
317. Higashita R, Li L, Van Putten V, et al. Galpha16 mimics vasoconstrictor action to induce smooth muscle alpha-actin in vascular smooth muscle cells through a Jun-NH2-terminal kinase-dependent pathway. *J Biol Chem*. Oct 10 1997;272(41):25845-25850.
318. Bowling N, Walsh RA, Song G, et al. Increased protein kinase C activity and expression of Ca²⁺-sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation*. Jan 26 1999;99(3):384-391.
319. Martelli AM, Sang N, Borgatti P, et al. Multiple biological responses activated by nuclear protein kinase C. *J Cell Biochem*. Sep 15 1999;74(4):499-521.
320. Mayr M, Hu Y, Hainaut H, et al. Mechanical stress-induced DNA damage and rac-p38MAPK signal pathways mediate p53-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Faseb J*. Sep 2002;16(11):1423-1425.
321. Mills I, Cohen CR, Kamal K, et al. Strain activation of bovine aortic smooth muscle cell proliferation and alignment: study of strain dependency and the role of protein kinase A and C signaling pathways. *J Cell Physiol*. Mar 1997;170(3):228-234.

322. Quinn TP, Schlueter M, Soifer SJ, et al. Cyclic mechanical stretch induces VEGF and FGF-2 expression in pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. May 2002;282(5):L897-903.
323. Shyu KG, Chang ML, Wang BW, et al. Cyclical mechanical stretching increases the expression of vascular endothelial growth factor in rat vascular smooth muscle cells. *J Formos Med Assoc*. Nov 2001;100(11):741-747.
324. Chang H, Shyu KG, Wang BW, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by cyclical mechanical stretch in rat vascular smooth muscle cells. *Clin Sci (Lond)*. Oct 2003;105(4):447-456.
325. Li Q, Muragaki Y, Ueno H, et al. Stretch-induced proliferation of cultured vascular smooth muscle cells and a possible involvement of local renin-angiotensin system and platelet-derived growth factor (PDGF). *Hypertens Res*. Sep 1997;20(3):217-223.
326. Joki N, Kaname S, Hirakata M, et al. Tyrosine-kinase dependent TGF-beta and extracellular matrix expression by mechanical stretch in vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res*. Mar 2000;23(2):91-99.
327. Li Q, Muragaki Y, Hatamura I, et al. Stretch-induced collagen synthesis in cultured smooth muscle cells from rabbit aortic media and a possible involvement of angiotensin II and transforming growth factor-beta. *J Vasc Res*. Mar-Apr 1998;35(2):93-103.
328. Tanabe Y, Saito M, Ueno A, et al. Mechanical stretch augments PDGF receptor beta expression and protein tyrosine phosphorylation in pulmonary artery tissue and smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem*. Dec 2000;215(1-2):103-113.
329. Sevieux N, Alam J, Songu-Mize E. Effect of cyclic stretch on alpha-subunit mRNA expression of Na⁺-K⁺-ATPase in aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. Jun 2001;280(6):C1555-1560.
330. Chaqour B, Howard PS, Richards CF, et al. Mechanical stretch induces platelet-activating factor receptor gene expression through the NF-kappaB transcription factor. *J Mol Cell Cardiol*. Jul 1999;31(7):1345-1355.
331. Stanley AG, Patel H, Knight AL, et al. Mechanical strain-induced human vascular matrix synthesis: the role of angiotensin II. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. Mar 2000;1(1):32-35.
332. Tamura K, Chen YE, Lopez-Ilasaca M, et al. Molecular mechanism of fibronectin gene activation by cyclic stretch in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. Nov 3 2000;275(44):34619-34627.
333. Li L, Chaikof EL. Mechanical stress regulates syndecan-4 expression and redistribution in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Jan 2002;22(1):61-68.
334. Chapman GB, Durante W, Hellums JD, et al. Physiological cyclic stretch causes cell cycle arrest in cultured vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Mar 2000;278(3):H748-754.
335. Iwasaki H, Eguchi S, Ueno H, et al. Mechanical stretch stimulates growth of vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Feb 2000;278(2):H521-529.
336. Hosokawa H, Aiuchi S, Kambe T, et al. Mechanical stretch-induced mitogen-activated protein kinase activation is mediated via angiotensin and endothelin systems in vascular smooth muscle cells. *Biol Pharm Bull*. Dec 2002;25(12):1588-1592.

337. Standley PR, Stanley MA, Senechal P. Activation of mitogenic and antimitogenic pathways in cyclically stretched arterial smooth muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Dec 2001;281(6):E1165-1171.
338. Sedding DG, Seay U, Fink L, et al. Mechanosensitive p27Kip1 regulation and cell cycle entry in vascular smooth muscle cells. *Circulation.* Aug 5 2003;108(5):616-622.
339. Hipper A, Isenberg G. Cyclic mechanical strain decreases the DNA synthesis of vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* May 2000;440(1):19-27.
340. Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Gabbiani F, et al. Phenotypic heterogeneity of rat arterial smooth muscle cell clones. Implications for the development of experimental intimal thickening. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Jun 1996;16(6):815-820.
341. He B, Deckelbaum RA, Miao D, et al. Tissue-specific targeting of the pthrp gene: the generation of mice with floxed alleles. *Endocrinology.* May 2001;142(5):2070-2077.
342. Metzger D, Clifford J, Chiba H, et al. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 18 1995;92(15):6991-6995.
343. Leone DP, Genoud S, Atanasoski S, et al. Tamoxifen-inducible glia-specific Cre mice for somatic mutagenesis in oligodendrocytes and Schwann cells. *Mol Cell Neurosci.* Apr 2003;22(4):430-440.
344. Brocard J, Feil R, Chambon P, et al. A chimeric Cre recombinase inducible by synthetic, but not by natural ligands of the glucocorticoid receptor. *Nucleic Acids Res.* Sep 1 1998;26(17):4086-4090.
345. Solway J, Seltzer J, Samaha FF, et al. Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene, SM22 alpha. *J Biol Chem.* Jun 2 1995;270(22):13460-13469.
346. Moessler H, Mericskay M, Li Z, et al. The SM 22 promoter directs tissue-specific expression in arterial but not in venous or visceral smooth muscle cells in transgenic mice. *Development.* Aug 1996;122(8):2415-2425.
347. Camoretti-Mercado B, Forsythe SM, LeBeau MM, et al. Expression and cytogenetic localization of the human SM22 gene (TAGLN). *Genomics.* May 1 1998;49(3):452-457.
348. Kuhbandner S, Brummer S, Metzger D, et al. Temporally controlled somatic mutagenesis in smooth muscle. *Genesis.* Sep 2000;28(1):15-22.
349. Kellendonk C, Tronche F, Monaghan AP, et al. Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486. *Nucleic Acids Res.* Apr 15 1996;24(8):1404-1411.
350. Osol G. Mechanotransduction by vascular smooth muscle. *J Vasc Res.* Sep-Oct 1995;32(5):275-292.
351. Li Z, Wang D, Messing EM, et al. VHL protein-interacting deubiquitinating enzyme 2 deubiquitinates and stabilizes HIF-1alpha. *EMBO Rep.* Apr 2005;6(4):373-378.
352. Karaplis AC, Kronenberg HM. Physiological roles for parathyroid hormone-related protein: lessons from gene knockout mice. *Vitam Horm.* 1996;52:177-193.
353. Schorr K, Taimor G, Degenhardt H, et al. Parathyroid hormone-related peptide is induced by stimulation of alpha 1A-adrenoceptors and improves resistance against apoptosis in coronary endothelial cells. *Mol Pharmacol.* Jan 2003;63(1):111-118.
354. Weir EC, Goad DL, Daifotis AG, et al. Relative overexpression of the parathyroid hormone-related protein gene in human leiomyomas. *J Clin Endocrinol Metab.* Mar 1994;78(3):784-789.

355. Motokura T, Endo K, Kumaki K, et al. Neoplastic transformation of normal rat embryo fibroblasts by a mutated p53 and an activated ras oncogene induces parathyroid hormone-related peptide gene expression and causes hypercalcemia in nude mice. *J Biol Chem*. Dec 29 1995;270(52):30857-30861.
356. Sidler B, Alpert L, Henderson JE, et al. Amplification of the parathyroid hormone-related peptide gene in a colonic carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. Aug 1996;81(8):2841-2847.
357. Ito M, Nakashima M, Alipov GK, et al. Gastric cancer associated with overexpression of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) and PTH/PTHrP receptor in relation to tumor progression. *J Gastroenterol*. Jun 1997;32(3):396-400.
358. Kitazawa R, Kitazawa S, Yoon S, et al. In situ demonstration of parathyroid hormone-related protein mRNA in sclerosing hepatic carcinoma. *Virchows Arch*. Aug 1999;435(2):137-142.
359. Yoshida A, Nakamura Y, Shimizu A, et al. Significance of the parathyroid hormone-related protein expression in breast carcinoma. *Breast Cancer*. 2000;7(3):215-220.
360. Ye Y, Seitz PK, Cooper CW. Parathyroid hormone-related protein overexpression in the human colon cancer cell line HT-29 enhances adhesion of the cells to collagen type I. *Regul Pept*. Sep 15 2001;101(1-3):19-23.
361. Tovar Sepulveda VA, Falzon M. Parathyroid hormone-related protein enhances PC-3 prostate cancer cell growth via both autocrine/paracrine and intracrine pathways. *Regul Pept*. May 15 2002;105(2):109-120.
362. Hoey RP, Sanderson C, Iddon J, et al. The parathyroid hormone-related protein receptor is expressed in breast cancer bone metastases and promotes autocrine proliferation in breast carcinoma cells. *Br J Cancer*. Feb 24 2003;88(4):567-573.
363. Falzon M, Du P. Enhanced growth of MCF-7 breast cancer cells overexpressing parathyroid hormone-related peptide. *Endocrinology*. May 2000;141(5):1882-1892.
364. Gujral A, Burton DW, Terkeltaub R, et al. Parathyroid hormone-related protein induces interleukin 8 production by prostate cancer cells via a novel intracrine mechanism not mediated by its classical nuclear localization sequence. *Cancer Res*. Mar 1 2001;61(5):2282-2288.
365. Shen X, Falzon M. Parathyroid hormone-related protein upregulates integrin expression via an intracrine pathway in PC-3 prostate cancer cells. *Regul Pept*. May 15 2003;113(1-3):17-29.
366. Shen X, Qian L, Falzon M. PTH-related protein enhances MCF-7 breast cancer cell adhesion, migration, and invasion via an intracrine pathway. *Exp Cell Res*. Apr 1 2004;294(2):420-433.
367. Schordan E, Welsch S, Rothhut S, et al. Role of parathyroid hormone-related protein in the regulation of stretch-induced renal vascular smooth muscle cell proliferation. *J Am Soc Nephrol*. Dec 2004;15(12):3016-3025.
368. Ishikawa M, Akishita M, Kozaki K, et al. Expression of parathyroid hormone-related protein in human and experimental atherosclerotic lesions: functional role in arterial intimal thickening. *Atherosclerosis*. Sep 2000;152(1):97-105.
369. Brehm BR, Bock C, Wesselborg S, et al. Prevention of human smooth muscle cell proliferation without induction of apoptosis by the topoisomerase I inhibitor topotecan. *Biochem Pharmacol*. Jan 1 2001;61(1):119-127.

- 370.** Liu XM, Peyton KJ, Ensenat D, et al. Endoplasmic reticulum stress stimulates heme oxygenase-1 gene expression in vascular smooth muscle. Role in cell survival. *J Biol Chem.* Jan 14 2005;280(2):872-877.
- 371.** Mosmann T. et al. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. immunol. Methods*, 65: 55-63, 1983.