



Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par

Célia GUILINI

Rôle du récepteur-1 de la prokinéticine (PKR1) dans les
cellules endothéliales et les cellules souches lors de la
néovascularisation cardiaque

Soutenue publiquement le 23 octobre 2009

Devant les membres du jury :

Directeur de thèse : **Dr. Canan NEBIGIL-DESAUBRY**, DR2, CNRS, Illkirch
Rapporteur interne : **Pr. Jean-Marie FREYSSINET**, Université de Strasbourg
Rapporteur externe : **Dr. Daniel HENRION**, DR1, INSERM, Angers
Rapporteur externe : **Pr. José Maria PEREZ-POMARES**, Université de Malaga (Espagne)



Institut de Recherche
de l'Ecole de Biotechnologie de Strasbourg

Equipe : Nouveaux RCPG et cardiobiologie
FRE 3211
Boulevard Sébastien Brant
BP10413
F-67412 ILLKIRCH cedex

REMERCIEMENTS

Je remercie mon directeur de thèse, le Docteur Canan NEBIGIL-DESAUBRY de m'avoir accueilli dans le laboratoire et de m'avoir donné l'occasion de travailler sur une thématique de recherche passionnante. Je la remercie également pour ses conseils scientifiques.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Professeur Jean-Marie FREYSSINET, au Docteur Daniel HENRION, au Professeur José Maria PEREZ-POMARES et au Professeur Patrick OHLMANN de me faire l'honneur de juger de la qualité de ce travail.

Je remercie le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) de m'avoir entièrement financé durant les trois ans de Doctorat.

A l'ensemble des membres passés et présents du laboratoire, et plus particulièrement le Docteur Kyoji URAYAMA, je vous remercie pour votre aide et votre disponibilité.

Je remercie les personnes du service de culture cellulaire et du service d'imagerie de l'IGBMC pour leurs conseils.

Je tiens également à remercier les membres des autres équipes de l'institut notamment l'équipe du Docteur Renaud WAGNER et l'équipe du Docteur Isabelle SCHALK pour leur bonne humeur quotidienne et les discussions partagées.

A l'ensemble de ma famille et mes amis, merci d'avoir été à mes côtés. Je remercie particulièrement mes parents pour leurs encouragements et leur soutien sans faille tout au long de mes études.

Sans oublier les êtres chers disparus qui par leur générosité m'ont permis de m'accrocher dans les situations difficiles.

Enfin, merci Mathieu pour ta patience, ton écoute et ton précieux soutien.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
AC : adénylyl-cyclase
Akt ou PKB : protéine kinase B
AMPc: adénosine 3', 5' cyclique monophosphate
ARN: acide ribonucléique
ARNT : aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
BMP2 : bone morphogenetic protein 2
Ca²⁺ : calcium
CCFSE: 5, 6 carboxy 2', 7' dichlorofluorescein diacetate succinimidil ester
DAPI: di aminido phenyl indol
DAG : diacylglycérol
eNOS :NO synthase endothéliale
EPDC : cellule dérivée de l'épicarde
EPO : érythropoïétine
FACS : fluorescence activated cell sorter
FGF: fibroblast growth factor (facteur de croissance des fibroblasts)
Flk-1 (VEGFR-2) : récepteur 2 des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire
Flt-1 (VEGFR-1) : récepteur 1 des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire
GCs: guanylyl-cyclase soluble
GDP: guanosine diphosphate
GMPc: guanosine monophosphate cyclique
GTP: guanosine triphosphate
HAEC: human aortic endothelial cells
HIF : hypoxia inducible factor
ICAM-1 : intercellular adhesion molecule-1
IL: interleukine
INSERM : institut national de la santé et de la recherche médicale
IP3: inositol 1,4,5-triphosphate
iPS : cellule souche pluripotente induite
MLC: chaîne légère de la myosine

MLCK : kinase des chaînes légères de la myosine
MLCP : phosphatase des chaînes légères de la myosine
MMP: métalloprotéase matricielle
NFAT: nuclear factor of activated T cells
NO : monoxyde d'azote
OMS : organisation mondiale de la santé
PCR : réaction en chaîne par polymérase
PDGF: platelet-derived growth factor (facteur de croissance dérivé des plaquettes)
PECAM-1 (CD31): platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PGI₂: prostaglandine I₂
PIGF: placental growth factor
PIP2 : phosphatidylinositol 4,5 diphosphate
PIP3: phosphatidylinositol 3,5 triphosphate
PI3K: phosphatidyl-inositol-3 phosphate kinase
PK-1: prokinéticine-1
PK-2: prokinéticine-2
PKA: protéine kinase A
PKC: protéine kinase C
PKG: protéine kinase G
PKR1: récepteur 1 de la prokinéticine
PKR2: récepteur 2 de la prokinéticine
PLC: phospholipase C
RS: réticulum sarcoplasmique
RyR: récepteur de la ryanodine
SERCA2: sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase
siRNA: petit ARN d'interférence
Tβ4: thymosine β4
TGF : Transforming growth factor
TIMP : tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF : tumor necrosis factor (facteur nécrosant des tumeurs)
VCAM-1 : vascular adhesion molecule-1
VEGF: vascular endothelial growth factor (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)
VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor
X-Gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactopyranoside

SOMMAIRE

CHAPITRE I – INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	10
---	----

I – 1. Epidémiologie des maladies cardiovasculaires.....	10
I – 2. Les cellules cardiaques et leurs fonctions.....	14
I – 2. a. Organisation de l'endothélium dans le cœur.....	14
➤ L'endothélium des artères coronaires.....	15
➤ Les capillaires.....	15
➤ L'endocarde.....	16
I – 2. b. L'endothélium, une interface active entre le sang et le tissu cardiaque.....	16
➤ Interaction entre les cellules endothéliales et les cardiomyocytes au stade embryonnaire..	17
➤ Interaction entre les cellules endothéliales et les cardiomyocytes chez l'adulte.....	18
I – 2. c. Rôle des cellules endothéliales dans la pathogenèse des cardiopathies coronariennes.....	19
I – 2. d. Angiogenèse : stratégie thérapeutique après l'infarctus du myocarde.....	20
➤ Développement du système vasculaire.....	20
➤ Activation et régulation de l'angiogenèse après la naissance.....	21
➤ Mécanisme de l'angiogenèse.....	23
➤ Approches thérapeutiques stimulant l'angiogenèse.....	24
I – 2. e. Régénération cardiaque et cellules souches.....	26
➤ Les cellules souches.....	26
➤ Les progéniteurs.....	27
➤ La régénération cardiovasculaire.....	28
➤ Les cellules candidates.....	31
➤ Les cellules souches dérivées de l'épicarde : EPDC.....	33
➤ Les cellules souches Sca-1+.....	35

I – 3. Implication des récepteurs couplés aux protéines G dans la régulation du système cardiovasculaire.....	37
I – 3. a. Classification et activation des récepteurs couplés aux protéines G.....	37
I – 3. b. Voies de signalisation des protéines Gs dans le système cardiovasculaire.....	40
➤ Signalisation de Gs dans les cardiomyocytes.....	40
➤ Signalisation de Gs dans les cellules musculaires lisses.....	41
➤ Modèles murins utilisés pour étudier la signalisation de Gs.....	43
➤ Quelques récepteurs couplés aux protéines Gs.....	43
I – 3. c. Voies de signalisation des protéines Gi dans le système cardiovasculaire.....	44
➤ Quelques récepteurs couplés aux protéines Gi.....	44
➤ Signalisation de Gi dans les cardiomyocytes.....	44
I – 3. d. Voies de signalisation des protéines Gq dans le système cardiovasculaire.....	45
➤ Signalisation de Gq dans les cellules musculaires lisses.....	45
➤ Signalisation de Gq dans les cellules endothéliales.....	45
➤ Signalisation de Gq dans les cardiomyocytes.....	46
➤ Modèles murins utilisés pour étudier la signalisation de Gq.....	48
I – 3. e. Voies de signalisation des protéines G12 dans le système cardiovasculaire.....	49
➤ Signalisation de G12 dans les cellules musculaires lisses.....	49
➤ Signalisation de $G\alpha_{13}$ dans les cellules endothéliales.....	49
➤ Modèles murins utilisés pour étudier la signalisation de G12 et Gq.....	49
I – 4. Le système des prokinéticines.....	51
I – 4. a. Structures des prokinéticines.....	51
I – 4. b. Les récepteurs des prokinéticines.....	53
I – 4. c. Activités biologiques des prokinéticines.....	56
➤ L'angiogenèse.....	56
➤ Hématopoïèse et régulation de la réponse immunitaire innée.....	57
➤ Fonctions biologiques des prokinéticines dans le système nerveux central.....	58
➤ Fonctions biologiques des prokinéticines dans le système nerveux périphérique.....	59

III – 1. Fonction de PKR1 dans les cellules endothéliales cardiaques.....	63
III – 1. a. Prolifération et migration des cellules endothéliales H5V traitées par la prokinéticine-2.....	64
III – 1. b. Le traitement des cellules endothéliales H5V par la prokinéticine-2 active l'angiogénèse <i>in vitro</i>	65
III – 1. c. Identification de la voie de signalisation de PKR1 dans les cellules endothéliales H5V au cours de l'angiogénèse.....	66
III – 1. d. Synthèse sur la fonction de PKR1 dans les cellules endothéliales cardiaques.....	67
Article 1: « The prokineticin receptor-1 (GPR73) promotes cardiomyocyte survival and angiogenesis. <i>Faseb J</i> 21, 2980-2993. (2007) »	
Article 2 : « Divergent role of prokineticin receptors in endothelial cell function. »	
III – 2. Fonction de PKR1 dans les cellules souches dérivées de l'épicarde (EPDC).....	68
III – 2. a. Coculture des cardiomyoblastes H9c2 et des cellules EPDC.....	69
III – 2. b. Rôle de PK-2/PKR1 lors de la prolifération et de la différenciation des cellules EPDC.....	71
III – 2. c. Etude des effets de la prokinéticine-2 sur des cellules humaines EPDC adultes....	72
III – 2. d. Synthèse sur le rôle de PKR1 dans les cellules EPDC.....	73
Article 3: « Prokineticin receptor-1 induces neovascularization and epicardial-derived progenitor cell differentiation. <i>Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology</i> 28, 841-849. (2008) »	
III – 3. Etudes préliminaires sur les cellules souches cardiaques Sca-1+.....	74
III – 3. a. Isolation des cellules Sca-1+.....	74

III – 3. b. Expression du récepteur PKR1 dans les cellules Sca-1+.....	75
--	----

CHAPITRE IV – DISCUSSION	76
---------------------------------	-----------

IV – 1. Etude du potentiel angiogénique de PK-2 via le récepteur PKR1 dans les cellules endothéliales dérivées du cœur.....	78
--	----

IV – 2. Identification du rôle de PK-2/PKR1 dans les cellules souches cardiaques.....	83
--	----

IV – 2. a. Fonction de PK-2/PKR1 dans les cellules dérivées de l'épicaire (EPDC).....	83
---	----

IV – 2. b. Les prokinétines et les cellules souches cardiaques Sca-1+.....	89
--	----

CHAPITRE V – CONCLUSION ET PERSPECTIVES	91
--	-----------

ANNEXE – MATERIELS ET METHODES SUPPLEMENTAIRES	95
---	-----------

1. Coculture des cardiomyoblastes H9c2 et des EPDC.....	95
2. Traitement des cellules EPDC dérivées des cœurs de souris néonatales par le milieu conditionné.....	95
3. Traitement des cellules EPDC dérivées des explants cardiaques des souris néonatales par un inhibiteur pharmacologique.....	96
4. Traitement des cellules hEPDC isolées des cœurs humains.....	97
5. Culture des cellules dérivées des explants cardiaques des souris néonatales.....	97
6. Analyse de la population cellulaire Sca-1+ parmi les cellules dérivées des explants cardiaques.....	98
7. Isolation des cellules Sca-1+ par la méthode des billes immunomagnétiques.....	98
8. Etudes moléculaires.....	99
8. a. Extraction de l'ARN.....	99
8. b. Rétrotranscription des ARN.....	100
8. c. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) semi-quantitative.....	100
9. Analyses statistiques.....	101

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	102
------------------------------------	------------

CHAPITRE I – INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I – 1. Epidémiologie des maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires constituent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins. Ce groupe de pathologie comprend principalement les cardiopathies coronariennes, les maladies cérébrovasculaires, les artériopathies périphériques, les cardiopathies rhumatismales et les malformations cardiaques congénitales. Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Le nombre de décès imputables à ces pathologies est estimé à 17,5 millions en 2005, soit 30% de la mortalité mondiale totale (données statistiques de l'Organisation Mondiale de la Santé, OMS). Parmi ces décès, 7,6 millions sont dus à une cardiopathie coronarienne pouvant entraîner une ischémie cardiaque et éventuellement une insuffisance cardiaque. En France, sur la période 2000 - 2006, le pourcentage de mortalité causée par les cardiopathies coronariennes (également appelées cardiopathies ischémiques) par rapport à la mortalité toutes causes confondues a diminué de 1%. Les cardiopathies ischémiques sont encore responsables de 6,7% des décès chez la femme et de 8,3% chez l'homme (figure 1).

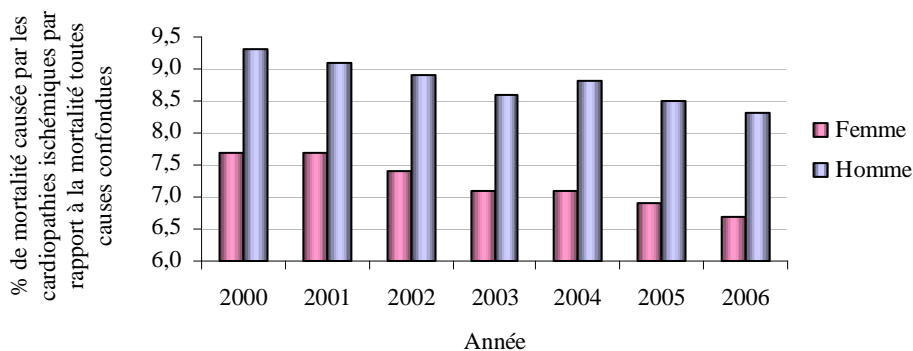


Figure 1. Evolution du taux de mortalité en France métropolitaine causé par les cardiopathies ischémiques.

Tous âges, période : 2000 – 2006. Source: Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès (CépiDC), Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM)

En France, on observe une disparité départementale des taux de décès causés par les cardiopathies ischémiques. Les départements les plus touchés sont par exemple le Bas-Rhin, le Nord, l'Aisne, la Manche, le Finistère, le Morbihan et le Cher (figure 2).

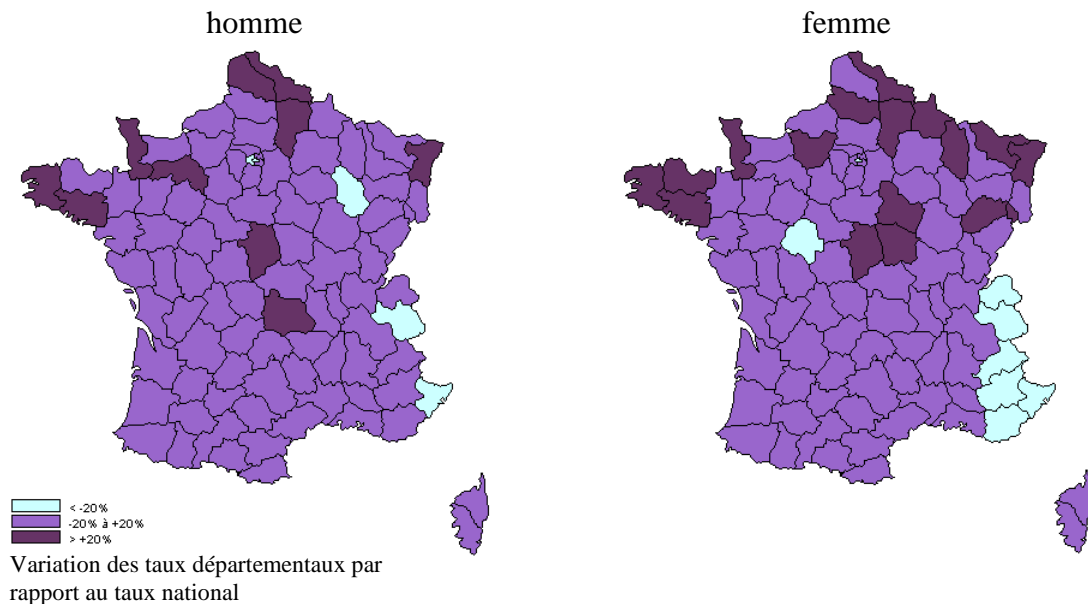


Figure 2. Disparités départementales des taux de décès causés par les cardiopathies ischémiques

Tous âges, période: 2003 – 2005. Source: Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès (CépiDC), Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM)

Les principaux facteurs de risque causant des cardiopathies coronariennes sont une mauvaise alimentation (excès de cholestérol, obésité), le diabète, un manque d'activité physique et le tabagisme. Les cardiopathies coronariennes sont initiées par l'obstruction partielle ou totale des artères coronaires. La cause la plus courante est la constitution des plaques d'athérome sur les parois internes des vaisseaux sanguins alimentant le cœur. En conséquence, une réduction du débit sanguin dans le tissu cardiaque entraîne un manque d'oxygène. Cette mauvaise oxygénation du cœur provoque des crises d'angor à l'effort. Lorsque l'artère coronaire est totalement obstruée, on observe l'apoptose du myocarde causée par un arrêt prolongé d'apport de sang et donc d'oxygène. L'hypoxie génère des stress mécaniques tels que l'hypertension et la perte des fonctions contractiles.

Des processus physiologiques sont activés pour compenser la perte fonctionnelle de la zone lésée par ischémie. La stimulation du système nerveux sympathique augmente la fréquence et la force de contraction du cœur pour aider à maintenir le rendement cardiaque. Le mécanisme de compensation se traduit par une augmentation de la masse du muscle cardiaque également appelé hypertrophie cardiaque. Une stimulation soutenue de la zone non lésée du myocarde peut devenir toxique et provoquer une décompensation irréversible des fonctions cardiaques. On peut alors observer une dilatation du cœur et une réduction significative de l'épaisseur de la paroi ventriculaire. Les effets bénéfiques du système de compensation sont dépendants du degré d'apoptose du myocarde. Lorsque l'apoptose du myocarde est supérieure à 20% il y a un risque d'insuffisance cardiaque. Le cœur n'est plus en mesure d'assurer un débit sanguin suffisant pour satisfaire les besoins de l'organisme. L'apoptose est incompatible avec la survie lorsqu'elle atteint 40% de la masse du myocarde (Chien, 1999; Mudd and Kass, 2008).

Afin de limiter la propagation de l'apoptose du myocarde, les traitements ont pour objectif principal la reperfusion rapide du cœur. Malgré les traitements actuels, le nombre de décès causés par la cardiopathie coronarienne reste élevé. Selon les prédictions de l'OMS, les ischémies cardiaques seront la principale cause de mortalité en 2030 dans le monde.

Il est donc important de rechercher des nouvelles stratégies thérapeutiques pour favoriser la revascularisation du cœur et limiter l'apoptose suite à un infarctus du myocarde. Un des objectifs thérapeutiques est d'inhiber directement la signalisation de l'apoptose des cardiomyocytes. L'autre perspective est d'améliorer la reperfusion du cœur en augmentant la stimulation de la néovascularisation.

Une nouvelle approche pour restaurer entièrement les fonctions cardiaques consiste à régénérer les tissus cardiovasculaires, principalement le myocarde et l'endothélium. Ce concept a pour objectif de remplacer les cellules apoptotiques par des cellules souches ayant la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires constituant le système cardiovasculaire. Le cœur est un muscle complexe constitué par une variété de tissus : tissus musculaires lisses (tonus vasculaire), myocarde (fonction contractile), endothélium et tissus valvulaires (rôle vasculaire), cellules « pacemaker » (rôle de stimulateur électrique). Les thérapies cellulaires nécessitent dans un premier temps d'identifier les cellules souches ayant le potentiel de générer des cardiomyocytes et/ou des cellules vasculaires. Cette stratégie implique ensuite l'optimisation de la prolifération, de la différenciation des cellules souches et de leur intégration dans le myocarde sain pour améliorer les fonctions cardiaques.

La découverte du potentiel de régénération cardiovasculaire ouvre des nouvelles perspectives pour traiter les cardiopathies ischémiques. Les premières observations sur l'utilisation des cellules souches pour restaurer les fonctions cardiaques après un infarctus du myocarde sont encourageantes. Cependant, le développement des thérapies cellulaires cardiaques nécessite d'être approfondie car les résultats actuels ne permettent pas d'observer à long terme une amélioration clinique des insuffisances cardiaques (Chien et al., 2008; Welt and Losordo, 2006). La compréhension des fonctions et des interactions cellulaires dans le cœur peut contribuer à l'élaboration de nouvelles méthodes de traitement des cardiopathies coronariennes.

I – 2. Les cellules cardiaques et leurs fonctions

I – 2. a. Organisation de l'endothélium dans le cœur

L'endothélium, composé d'une seule couche de cellules endothéliales, contribue à l'homéostasie cardiovasculaire. Les cellules endothéliales expriment à leur membrane luminale, situées au contact du sang, un grand nombre de récepteurs qui captent les messages issus des cellules sanguines (lymphocytes, monocytes, plaquettes) ou encore des molécules circulantes dans le sang. Une des fonctions essentielles de l'endothélium vasculaire est d'assurer le transport de l'oxygène du sang aux tissus. L'endothélium vasculaire contrôle la perméabilité mais aussi l'ajustement de la dilatation des vaisseaux sanguins suivant la demande hémodynamique et hormonale. Il participe au maintien de la fluidité sanguine via des facteurs pro ou anticoagulant (Brutsaert, 2003). L'endothélium vasculaire possède également des propriétés antithrombotiques. Dans les conditions physiologiques, les cellules endothéliales sécrètent des facteurs ayant des effets antiagrégants plaquettaires (monoxyde d'azote, NO ; prostaglandine I₂) ou fibrinolytique (activation du plasminogène). Une réduction du potentiel antiagrégants plaquettaires de l'endothélium et une augmentation de la production de facteurs procoagulants créent un environnement favorable au développement de la thrombose. Lorsque l'endothélium est lésé, une agrégation de plaquettes peut se produire localement avec pour conséquence la formation de thrombus et, le cas échéant, l'oblitération de la lumière vasculaire (Lerman and Zeiher, 2005).

Le cœur contient plusieurs compartiments endothéliaux comprenant les cellules endothéliales des artères coronaires, des capillaires et de l'endocarde. Les artères coronaires, ayant pour origine l'aorte ascendante, assurent la vascularisation du myocarde. Plus spécifiquement, on distingue les artères coronaires épicaudales localisées au niveau de l'épicarde et les artères coronaires pénétrant dans le myocarde, appelées artères intramurales. Ces artères sont ensuite connectées aux artérioles puis au système capillaire (figure 3).

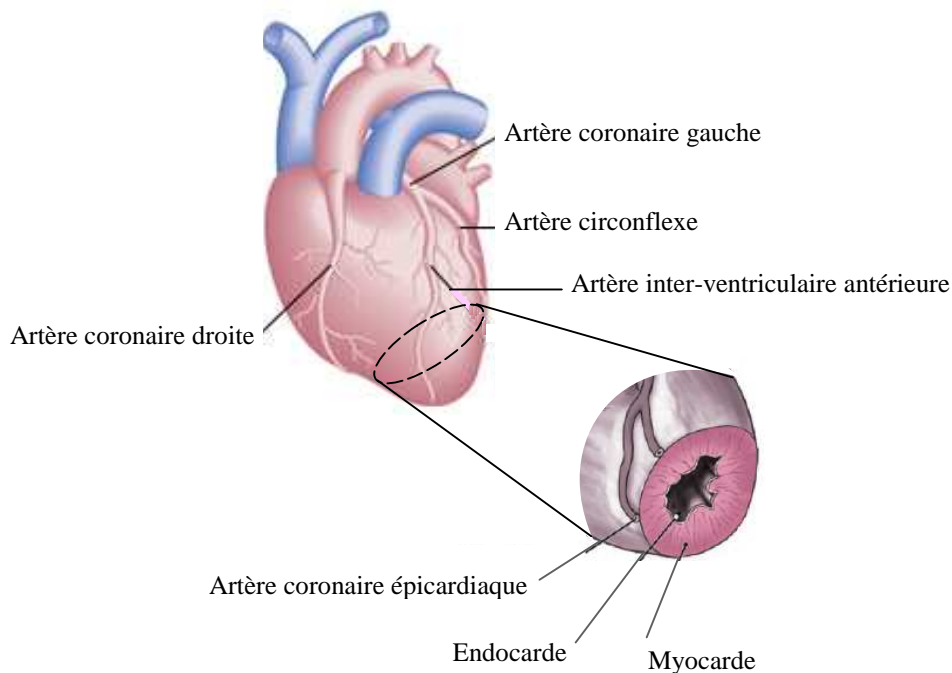


Figure 3. Les trois principaux compartiments endothéliaux dans le cœur : l'endothélium des artères coronaires, les capillaires irriguant le myocarde, et l'endocarde.

➤ **L'endothélium des artères coronaires**

L'endothélium des artères coronaires est de type continue et non fenestré avec de nombreuses jonctions imperméables ou « tight junction ». Les jonctions imperméables déterminent la cohésion entre deux cellules endothéliales et empêchent le passage par la voie intercellulaire de molécules. L'endothélium de type fenestré est présent dans les tissus où l'activité de filtration des fluides est importante notamment dans les reins ou le foie (Aird, 2007).

➤ **Les capillaires**

Les capillaires sont responsables de la majorité des échanges entre la circulation sanguine et le tissu. La structure de l'endothélium des capillaires dans le cœur est de type continue et non fenestré et possède un nombre plus élevé de cavéole par rapport aux artères. Les cavéoles sont des structures intervenant dans le trafic vésiculaire favorisant les échanges entre les cellules endothéliales et les tissus environnants. La distance entre l'endothélium capillaire et les cardiomyocytes les plus proches est de 1µm.

➤ L'endocarde

L'endocarde qui est formé d'une mince membrane endothéliales tapisse les quatre cavités du cœur (oreillettes et ventricules). Les cellules endothéliales composant l'endocarde sont plus grandes par rapport aux autres types de cellules endothéliales du système circulatoire. Elles possèdent des microvillosités se projetant à l'intérieure de la cavité cardiaque. Les nombreux sillons et les microvillosités de l'endocarde augmentent sa surface suggérant que les cellules endothéliales aient un rôle de détecteur. Les cellules endothéliales de l'endocarde possèdent de nombreuses jonctions intercellulaires (gap junctions). Ce type de communication électrochimique entre les cellules endothéliales peut permettre une rapide transmission de l'information dans l'endothélium à partir de l'activation d'une cellule. Ce mécanisme de propagation du signal est en concordance avec l'hypothèse que l'endothélium de l'endocarde ait une fonction de détecteur. L'absence de gap junctions dans les cellules de l'endothélium capillaire suggère une interaction plus localisée avec le myocarde. Donc l'architecture de l'endothélium capillaire comme celle des cellules endothéliales de l'endocarde permet une interaction directe avec les cardiomyocytes (Aird, 2007; Brutsaert, 2003).

I – 2. b. L'endothélium, une interface active entre le sang et le tissu cardiaque

Le tissu cardiaque est composé majoritairement des cardiomyocytes représentant environ 75% du volume totale du cœur. La principale fonction du cœur est de pomper le sang pour assurer la circulation sanguine dans le système cardiovasculaire. Cette fonction est orchestrée par la succession de contraction et de relaxation des cardiomyocytes suite à une variation de la concentration du calcium cytoplasmique. La synchronisation des contractions des cardiomyocytes est assurée par un système cardiaque de conduction électrique (cellules « pacemaker », cellules du tissu nodal) et par contact électrique direct entre les cardiomyocytes (Brutsaert, 2003).

Les cardiomyocytes sont en interaction avec les cellules endothéliales permettant le maintien des fonctions cardiovasculaires. Ces interactions peuvent être indirectes, c'est le cas de l'endothélium vasculaire des artères coronaires modulant l'apport sanguin dans le myocarde (figure 4A). En revanche, l'interaction directe entre les cardiomyocytes et l'endothélium des

capillaires ou l'endothélium endocardique détermine la croissance cardiaque, les performances contractiles et le rythme cardiaque (figure 4B).

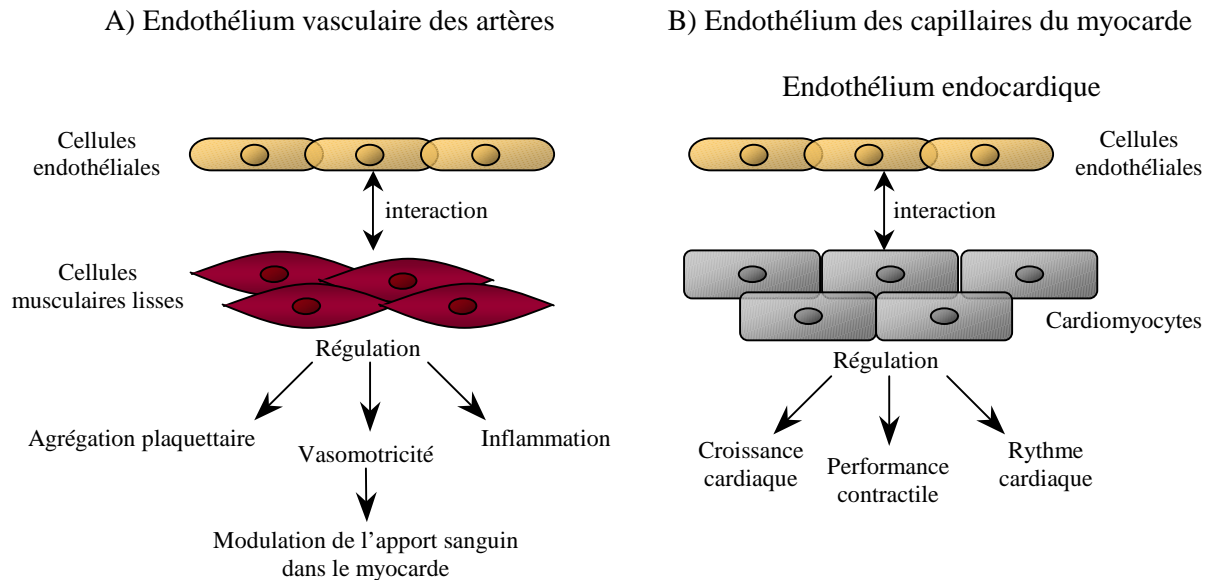


Figure 4. Contribution des principaux compartiments endothéliaux dans la régulation des fonctions cardiaques.

A) Intéraction indirecte entre l'endothélium vasculaire des artères coronaires et les cardiomyocytes. B) Intéraction directe entre l'endothélium des capillaires ou l'endothélium endocardique et les cardiomyocytes

➤ **Interaction entre les cellules endothéliales et les cardiomyocyte au stade embryonnaire**

Dans un premier temps, des études montrent que la communication entre les cellules endothéliales cardiaques et les cardiomyocytes est nécessaire lors du développement cardiaque. Au stade embryonnaire, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF, « vascular endothelial growth factor ») est sécrété principalement par les cardiomyocytes trabéculés. Ce facteur se lie sur son récepteur VEGFR-2 (ou Flk-1) qui est exprimé dans toutes les cellules endothéliales pour initier la différenciation et la prolifération de l'endothélium de l'endocarde. Donc l'ablation au stade embryonnaire de VEGFR-2 provoque une absence de l'endocarde et une perte de la maturation du myocarde entraînant la

mort embryonnaire. Le facteur paracrine, angiopoïétine-1, illustre également l'importance de la communication entre les cardiomyocytes et les cellules endothéliales lors du développement du cœur. L'angiopoïétine-1, produit par les cardiomyocytes, active le récepteur TIE-2 exprimé dans les cellules endothéliales. Cette signalisation permet de promouvoir le développement de l'endocarde adjacent.

La communication entre ces deux types cellulaires permet de réguler des étapes plus avancées lors de l'embryogenèse cardiaque notamment lorsque le myocarde trabéculé subit une compaction. L'érythropoïétine (EPO) est un facteur de croissance essentiel durant cette étape de compaction du myocarde. Or, le récepteur de l'érythropoïétine est exprimé dans les cellules endothéliales mais pas dans les cardiomyocytes. Donc EPO active indirectement la prolifération des cardiomyocytes par son action sur les cellules endothéliales de l'endocarde et des capillaires nouvellement formés dans le myocarde (Brutsaert, 2003).

➤ **Interaction entre les cellules endothéliales et les cardiomyocytes chez l'adulte**

La signalisation entre les cardiomyocytes et les cellules endothéliales est présente au cours de l'embryogenèse cardiaque et persiste au stade adulte. Cette communication cellulaire entre le myocarde et l'endothélium contrôle l'hypertrophie des cardiomyocytes. Certains facteurs sécrétés par les cellules endothéliales cardiaques adultes, tels que le monoxyde d'azote (NO), l'endothéline et l'angiopoïétine-2, ont la propriété de moduler la croissance du myocarde. En présence de NO, la badykinine n'est plus en mesure de stimuler la croissance des cardiomyocytes. Tandis que l'endothéline et l'angiopoïétine-2 participent à la stimulation de l'hypertrophie.

L'endothélium contribue à la régulation des performances contractiles via des facteurs paracrines. Le NO interagit avec la voie de signalisation β adrénergique responsable de la contraction des cardiomyocytes (Balligand, 1999). L'endothélium est également impliqué dans le contrôle du rythme cardiaque via la production de prostaglandine I₂ (PGI₂). Outre son potentiel vasodilatateur des coronaires, ce facteur est antiarrhythmique (Brutsaert, 2003).

L'implication directe de l'endothélium cardiaque lors de la régulation de la croissance du myocarde, de la contractilité et de la fréquence cardiaque suggère que son dysfonctionnement soit important dans la pathogenèse de l'insuffisance cardiaque.

I – 2. c. Rôle des cellules endothéliales dans la pathogenèse des cardiopathies coronariennes

Le dysfonctionnement des cellules endothéliales est causé par différents stress environnementaux tels que l'inflammation, le stress oxydatif, l'hypercholestérolémie, le diabète et le tabagisme. L'altération des fonctions de l'endothélium se traduit par la réduction de la vasodilatation, l'initiation du processus inflammatoire et l'activation des propriétés prothrombotiques de l'endothélium. Ces conditions pathologiques sont associées à l'hypertension, l'athérosclérose et l'insuffisance cardiaque chronique.

Un des principaux facteurs vasodilatateurs produits par les cellules endothéliales est le monoxyde d'azote, NO. L'altération de l'endothélium peut entraîner une réduction de la production et de la biodisponibilité du NO malgré la stimulation des cellules endothéliales par l'acétylcholine, la bradykinine ou la substance P. Par conséquent, on observe la réduction de la vasodilatation et l'initiation de la réponse inflammatoire. La réduction du NO engendre une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion dans l'endothélium telles que les intégrines (VCAM-1, vascular adhesion molecule-1 ; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1) et les sélectines (sélectine E, L, P). Les molécules d'adhésion se lient aux lymphocytes, participant à la première étape de l'invasion de la paroi vasculaire par les cellules inflammatoires. Cette inflammation va promouvoir l'initiation et l'évolution de l'athérosclérose. De plus, l'inhibition de l'agrégation des plaquettes n'est plus assurée par le NO dont la biodisponibilité est réduite (Brutsaert, 2003; Endemann and Schiffrin, 2004; Higashi et al., 2009; Libby et al., 2002).

Donc, la perte des capacités vasodilatatrices et la stimulation de la formation de thrombus sont des conditions favorisant l'infarctus du myocarde pouvant conduire à l'insuffisance cardiaque. Après un infarctus du myocarde, il est important de stimuler rapidement la formation de nouveaux vaisseaux pour limiter la dégénération du myocarde et ainsi éviter l'insuffisance cardiaque.

I – 2. d. Angiogenèse : stratégie thérapeutique après l’infarctus du myocarde

➤ **Développement du système vasculaire**

Durant la vie embryonnaire, la formation des vaisseaux se fait grâce à deux étapes successives, la vasculogenèse et l’angiogenèse. Le développement du premier réseau vasculaire, appelé « plexus capillaire primitif », correspond à l’étape de vasculogenèse. Il s’agit de tubes capillaires qui se constituent à partir des cellules embryonnaires générant l’endothélium : les angioblastes. Passé ce stade de formation capillaire primitif vient l’angiogenèse, c’est à dire la formation de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux préexistants. La stabilisation et la maturation des vaisseaux capillaires nouvellement formés s’effectuent au cours de l’artériogenèse. Ce processus est responsable de la migration des cellules musculaires lisses autour des artères et des veines naissantes et de la migration des péricytes autour des artérioles et des veinules. Les cellules musculaires lisses et les péricytes ont la capacité de se contracter, participant ainsi à la régulation du tonus vasculaire. La vascularisation va donc évoluer et se structurer en artérioles, artères, veinules ou veines et capillaires. Le système lymphatique se développe par transdifférenciation à partir des veines. Il assure le transport de la lymphe du tissu vers les ganglions lymphatiques puis il rejoint la veine sous clavière gauche (figure 5) (Carmeliet, 2000; Carmeliet, 2005).

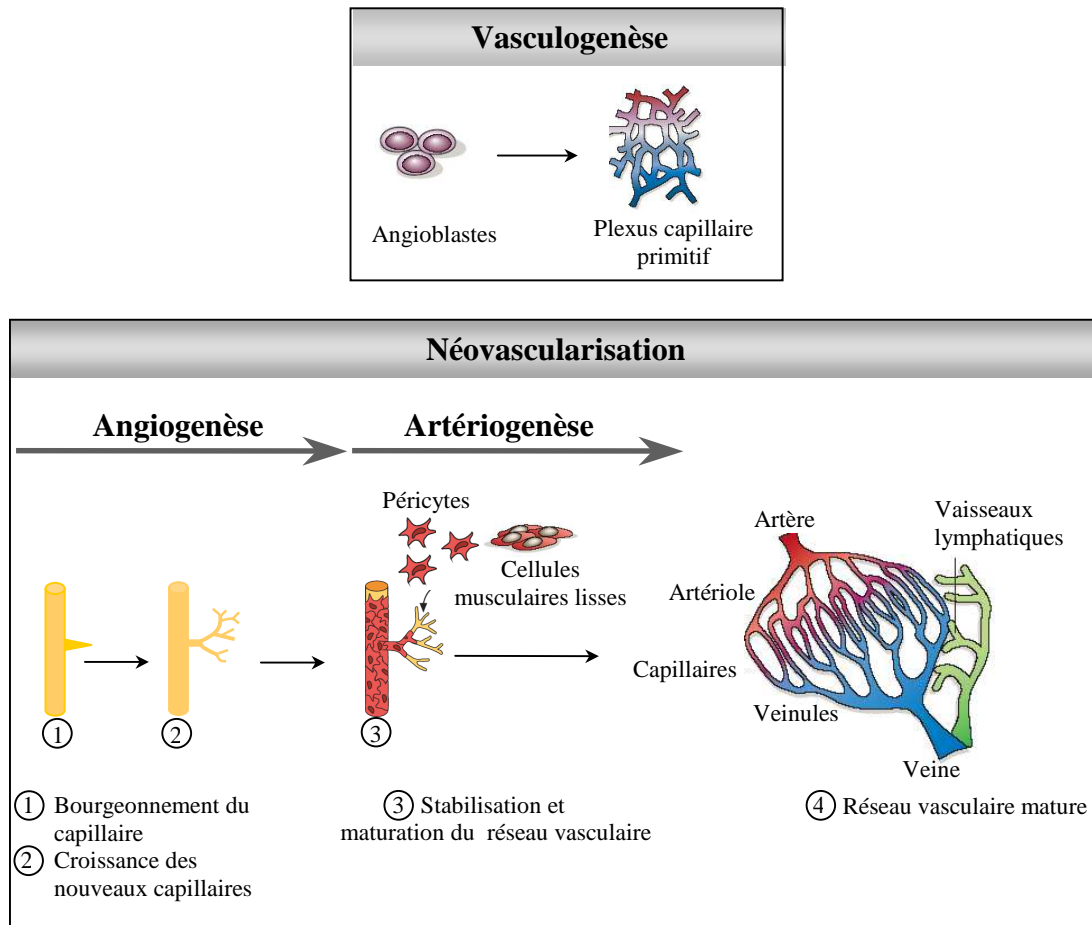
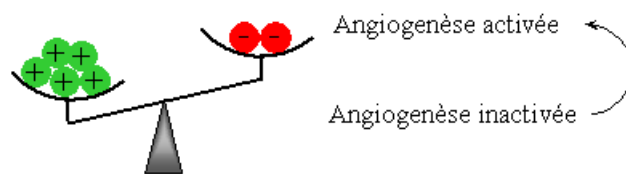


Figure 5. Formation du système vasculaire

➤ **Activation et régulation de l'angiogenèse après la naissance**

Après la naissance, l'angiogenèse est encore présente pour contribuer à la croissance des organes. A l'âge adulte, la majorité des vaisseaux matures restent à l'état quiescent. Le passage d'un endothélium quiescent à un endothélium activé constitue la première étape indispensable à la mise en route de l'angiogenèse. La néovascularisation résulte de la prépondérance des facteurs proangiogéniques par rapport aux facteurs antiangiogéniques (figure 6).



+ Facteurs proangiogéniques	- Facteurs antiangiogéniques
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Facteurs de croissance (VEGF, FGF, PDGF, PIGF) ➤ Angiopoïétine 1 ➤ Enzymes fibrinolytiques ➤ Protéases de la matrice extracellulaire ➤ Cytokines (TNF, TGF, IL8) 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Protéines de la matrice extracellulaire ➤ Inhibiteurs des protéases matricielles ➤ Angiopoïétine 2 ➤ Cytokines (IL10) ➤ Angiostatine, Endostatine ➤ Thrombospondines

Figure 6. Quelques facteurs intervenant dans la balance angiogénique (Ahn et al., 2008a)

L'angiogenèse s'observe physiologiquement, au cours du cycle ovarien, dans le placenta et les glandes mammaires durant une grossesse, lors de la réparation tissulaire ou lors d'une inflammation. La création de nouveaux vaisseaux est également induite pendant l'ischémie tissulaire essentiellement au niveau du cœur, des membres et du cerveau. La dérégulation de la balance angiogénique entraîne diverses pathologies. La stimulation excessive de l'angiogenèse est observée à titre d'exemple dans la rétinopathie diabétique, l'arthrite rhumatoïde, l'hémangiome juvénile, les maladies infectieuses, l'obésité, et au cours de la croissance tumorale. Au contraire, une activation insuffisante de l'angiogenèse est mise en évidence dans les pathologies telles que l'accident vasculaire cérébral, les cardiopathies ischémiques, l'infertilité, les ulcères et la maladie d'Alzheimer (Ahn et al., 2008a; Carmeliet, 2003; Carmeliet, 2005).

Dans le contexte de l'infarctus du myocarde, l'enclenchement de l'activation angiogénique est produit par l'hypoxie. Le facteur de transcription HIF-1 est inductible par l'hypoxie (HIF, Hypoxia-Inducible Factor). La molécule HIF-1 possède un domaine de liaison à l'ADN pour assurer l'activité transcriptionnelle et une région située dans la partie C-terminale qui est modifiable en fonction du taux intracellulaire d'oxygène. Lorsque la teneur en oxygène est normale, certains acides aminés (proline, asparagine) de la région sensible à l'oxygène sont hydroxylés. Ce facteur HIF-1 est alors rapidement dégradé dans le cytoplasme lorsque les

prolines sont hydroxylées. L'hydroxylation de l'asparagine conduit à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle du facteur HIF-1. En cas d'hypoxie, l'activité enzymatique hydroxylase est inhibée. HIF-1 pénètre dans le noyau et interagit avec un partenaire transcriptionnel, l'ARNT (« aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator »). Ce complexe HIF-ARNT induit la transcription de l'ARN et secondairement la synthèse protéique. HIF-1 induit ainsi la synthèse de diverses molécules impliquées dans l'angiogenèse telles que le VEGF et son récepteur VEGFR1, l'angiopoïétine-1/-2, PDGF. HIF-1 active également la synthèse d'enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire (prolyl-4-hydroxylase du collagène, TIMP-1) (Fong, 2008; Pugh and Ratcliffe, 2003).

Lorsque l'activation de l'angiogenèse est insuffisante, on observe alors une cardiopathie ischémique. Ainsi, la compréhension des mécanismes de néovascularisation ouvre des voies thérapeutiques pour des avancées cliniques dans la modulation positive ou négative de l'angiogenèse.

➤ **Mécanisme de l'angiogenèse**

La première étape de l'angiogenèse consiste à activer les cellules endothéliales. L'angiopoïétine-2 est un facteur proangiogénique qui se lie sélectivement sur son récepteur Tie-2 exprimé dans les cellules endothéliales. Ce facteur inactive l'effet stabilisateur de l'angiopoïétine-1 et conduit au détachement des cellules périvasculaires (péricytes ou cellules musculaires lisses) des cellules endothéliales. Cette étape de déstabilisation de la paroi vasculaire rend l'endothélium plus susceptible de répondre aux signaux angiogéniques activateurs comme le VEGF.

La régénération d'un vaisseau à partir d'un vaisseau préexistant nécessite ensuite une dégradation de la membrane basale qui enchâsse les cellules endothéliales. Cette membrane basale ou matrice extracellulaire de l'endothélium est dégradée partiellement sous le contrôle des protéinases (métalloprotéases matricielles (MMP), activateur du plasminogène) et des inhibiteurs des protéases matricielles (TIMP « Tissue Inhibitor of MetalloProteinase »). Ce processus est indispensable à la migration des cellules endothéliales dans la matrice extracellulaire, à leur prolifération et à la formation d'une lumière vasculaire primitive. Des molécules d'adhésion comme les intégrines stabilisent le bourgeon capillaire. Le facteur TGF-

β (transforming growth factor) participe à l'inhibition de deux processus : la migration et la prolifération des cellules endothéliales (figure 7).

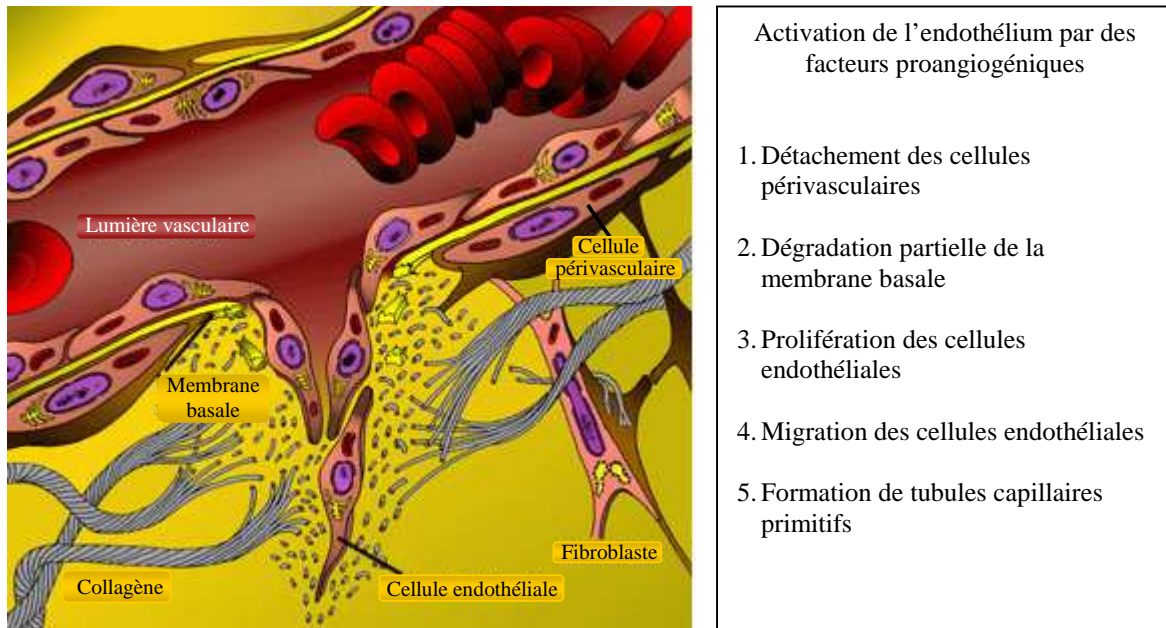


Figure 7. Les principales étapes de l'angiogenèse

Au cours de l'artériogenèse, les cellules péri-vasculaires sont recrutées par des facteurs tels que TGF- β , PDGF-BB (platelet-derived growth factor) et l'angiopoïétine-1 (figure 5). La cellule musculaire lisse vasculaire, outre sa fonction de maintien et de régulation du diamètre du vaisseau, produit et sécrète des protéines composant la matrice extracellulaire. La reconstitution d'une membrane basale et l'apposition de nouvelles cellules péri-vasculaires permettent la stabilisation du nouveau vaisseau (Ahn et al., 2008a; Carmeliet, 2000; Carmeliet, 2003).

➤ **Approches thérapeutiques stimulant l'angiogenèse**

Les études précliniques chez l'animal ont montré que l'injection des protéines VEGF ou FGF a des effets bénéfiques dans le traitement des cardiopathies ischémiques. La protéine FGF-1, génétiquement modifiée pour améliorer son efficacité, est injectée localement dans les tissus péri-vasculaires du cœur d'un modèle animal d'ischémie cardiaque. Le traitement par FGF-1 permet d'augmenter le flux coronaire participant au maintien de la perfusion sanguine et à l'amélioration des fonctions du ventricule gauche (Ahn et al., 2008b; Lopez et al., 1998a). L'infusion intracoronaire de la protéine recombinante FGF-2 permet de réduire la zone

ischémique et d'augmenter la formation des vaisseaux collatéraux conduisant à l'amélioration des fonctions systolique du ventricule gauche (Ahn et al., 2008b; Horrigan et al., 1999).

Pour déterminer la voie d'administration la plus favorable permettant d'optimiser le développement de la vascularisation collatérale, plusieurs voies d'administration ont été testées sur un modèle animal d'ischémie cardiaque. Les quatre méthodes utilisées sont : l'injection par voie intraveineuse périphérique, l'infusion dans le système veineux central (dans l'appendice atrial droit), l'injection intracoronaire et enfin l'administration péricardique. La technique la plus appropriée pour favoriser la formation de nouveaux vaisseaux est l'injection intracoronaire du FGF-2. Les traitements des ischémies du myocarde par injection des protéines VEGF dans l'artère coronaire participe également à l'amélioration des fonctions cardiaques notamment en stimulant l'angiogenèse *in vivo* (Harada et al., 1996; Lopez et al., 1998b). Afin de potentialiser l'activité biologique des facteurs angiogéniques, il est nécessaire d'injecter la protéine (FGF ou VEGF) à proximité de la zone ischémique et le plus rapidement après l'induction de l'ischémie (Rajanayagam et al., 2000).

La seconde stratégie thérapeutique, visant à améliorer la perfusion du cœur, est la thérapie génique consistant à injecter le gène codant pour les facteurs angiogéniques VEGF ou FGF. L'ADN codant VEGF est administré sous une forme nu ou intégré dans un vecteur (adénovirus ou plasmide). L'injection de l'ADN (nu ou vectorisé), directement dans le myocarde, exprime une quantité de protéines VEGF suffisante pour engendrer l'angiogenèse et protéger les fonctions cardiaques (Ahn et al., 2008b). Des études ont montré que les protéines VEGF participent à la mobilisation des progéniteurs des cellules endothéliales chez la souris au cours de la néovascularisation (Asahara et al., 1999).

La thérapie cellulaire est une nouvelle stratégie préclinique utilisée pour induire la néovascularisation après une ischémie cardiaque. Cette stratégie consiste à injecter des cellules souches pour favoriser la néovascularisation en intégrant ces cellules dans les vaisseaux nouvellement formés. Les cellules transplantées pourraient participer également à la régénération cardiovasculaire en sécrétant des facteurs paracrines. L'hypothèse émise est que, les facteurs sécrétés par les cellules souches sont supposés stimuler l'angiogenèse, inhiber l'apoptose et l'inflammation, stimuler le recrutement d'autres cellules souches et moduler l'activité des protéases impliquées dans la lésion du myocarde (Joggerst and Hatzopoulos, 2009; Losordo and Dimmeler, 2004).

Les résultats des études précliniques ont permis de mettre en place des essais cliniques sur divers traitements (injection des protéines angiogéniques, thérapies géniques, thérapies cellulaires). Actuellement le principal facteur utilisé dans les essais cliniques pour stimuler l'angiogenèse est le VEGF. Les essais cliniques utilisant les protéines VEGF ou FGF sont en phase II tandis que les thérapies cellulaires développées plus récemment sont en phase I (Ahn et al., 2008b).

La thérapie cellulaire dans les cardiopathies ischémiques soulève plusieurs questions. Un des points critiques est l'identification et la définition de la population de cellules souches. Un autre point consiste à déterminer par quel processus ces cellules induisent la néovascularisation et quel est leur potentiel dans la régénération du myocarde.

I – 2. e. Régénération cardiovasculaire et cellules souches

➤ **Les cellules souches**

Les cellules souches sont caractérisées par leurs capacités à s'auto-renouveler et à se différencier en une diversité de types cellulaires fonctionnels. Les cellules totipotentes ont la capacité d'engendrer n'importe quel tissu, y compris le tissu extra-embryonnaire tel que le placenta. Seul l'œuf fécondé et les blastomères précoces possèdent cette totipotence. Les cellules pluripotentes ont la propriété d'engendrer la plupart des types cellulaires, excepté le tissu extra-embryonnaire. Ces cellules comprennent les cellules souches embryonnaires et les cellules souches pluripotentes induites (iPS). Les cellules souches multipotentes sont capables de se différencier en un nombre limité de divers types cellulaires. Parfois, les cellules souches multipotentes font référence aux cellules souches adultes. Tandis que les cellules souches embryonnaires sont isolées de la masse interne d'un blastocyte, les cellules souches adultes proviennent des tissus post-nataux. Hormis le fait que les cellules souches adultes sont principalement multipotentes et non pluripotentes, ces cellules ont une capacité d'auto-renouvellement plus faible que les cellules souches embryonnaires. Les cellules hématopoïétiques sont par exemple des cellules souches adultes multipotentes se différenciant

en diverses cellules du sang. Les cellules souches ou les progéniteurs unipotents ont la capacité de se différencier en un seul type cellulaire (figure 8) (Sieveking and Ng, 2009).

➤ **Les progéniteurs**

Les progéniteurs correspondent aux cellules où le profil transcriptionnel des cellules souches embryonnaires ou adultes «stemness» coexiste avec les facteurs de transcription caractéristiques des cellules spécialisées (Urbanek et al., 2006). Il existe une certaine confusion lors de l'utilisation des termes cellules souches adultes et progéniteurs. Ces deux types cellulaires peuvent être distingués par leur capacité d'auto renouvellement et leur potentiel de différenciation. Les cellules souches adultes sont souvent multipotentes et possèdent une capacité d'auto renouvellement plus élevée que les progéniteurs souvent unipotents (figure 8) (Sieveking and Ng, 2009).

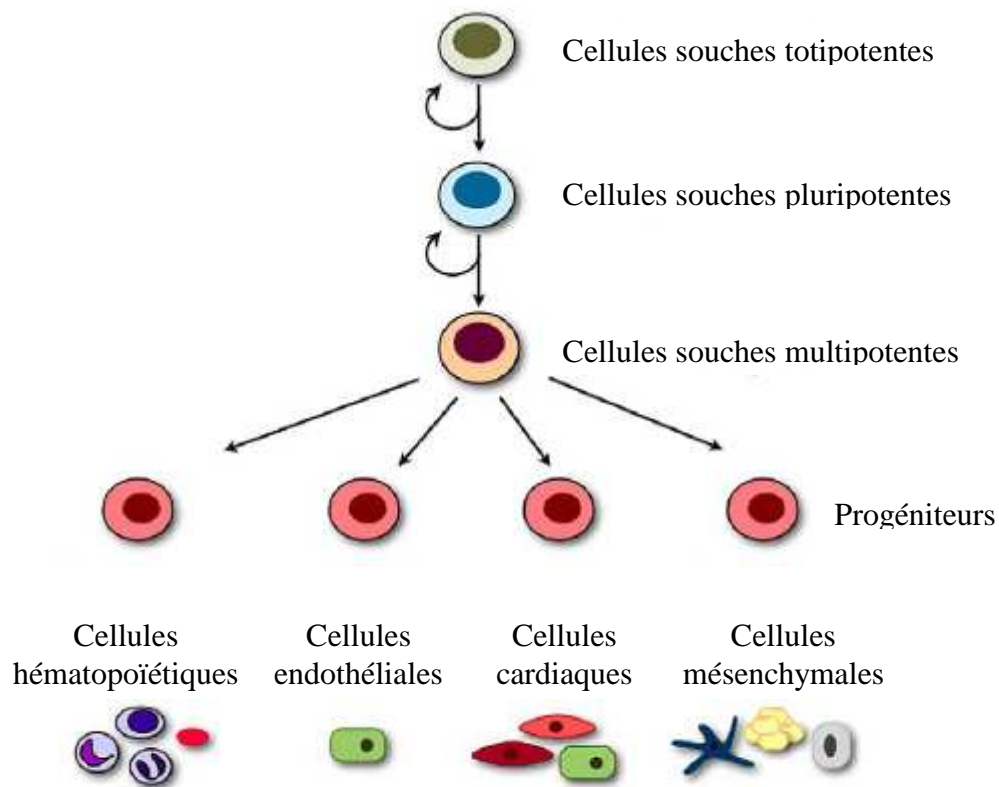


Figure 8. Hiérarchie des cellules souches

➤ La régénération cardiovasculaire

Le cœur possède une capacité intrinsèque de régénération du myocarde extrêmement limitée. Des études récentes ont montré la régénération des cardiomyocytes grâce à l'intégration du carbone 14 (^{14}C) dans l'ADN génomique humain de ces cellules. Il a été possible d'établir l'âge des cardiomyocytes en mesurant la quantité de ^{14}C présente dans l'ADN des personnes exposées aux essais nucléaires durant la guerre froide. Selon cette étude, le turnover des cardiomyocytes est d'environ 1% à 25 ans puis de 0,45% à l'âge de 75 ans (Bergmann et al., 2009). Après un infarctus du myocarde, la régénération des cardiomyocytes peut être engendrée par leur prolifération (Anversa and Nadal-Ginard, 2002; Beltrami et al., 2001). Après la naissance, la prolifération des cardiomyocytes est très faible ne permettant pas de compenser la perte des cardiomyocytes après un infarctus du myocarde (Woodcock and Matkovich, 2005). La présence des cellules souches dans le cœur adulte ouvre des nouvelles perspectives thérapeutiques pour la régénération du myocarde (Barile et al., 2007a; Barile et al., 2007b; Ott et al., 2007; Urbanek et al., 2006).

La régénération cardiovasculaire peut avoir lieu via le remplacement des cardiomyocytes et/ou le processus de néovascularisation.

La suite de ce manuscrit traitera plus particulièrement de l'implication des cellules souches lors de la néovascularisation. Les cellules vasculaires sont importantes lors de la réparation du myocarde pour deux raisons. Premièrement, la néovascularisation protège les cardiomyocytes en périphérie de la zone ischémique aidant ainsi à préserver les fonctions cardiaques. Deuxièmement, les cardiomyocytes issus de la différenciation des cellules souches transplantées ont besoin d'un apport de sang supplémentaire. En particulier, lorsque la fibrose cardiaque isole les cellules injectées du réseau vasculaire du tissu hôte, la formation de nouveaux vaisseaux est nécessaire pour assurer la survie des cellules injectées (Passier et al., 2008).

Après l'ischémie du myocarde le recrutement des cellules souches endogènes est insuffisant pour induire la régénération cardiovasculaire. Ceci peut être expliqué par le fait que l'ischémie, l'inflammation excessive et une fibrose dense créent un environnement hostile réduisant l'activation des cellules souches endogènes (Barile et al., 2007a).

Le premier challenge permettant la régénération cardiovasculaire après l'ischémie du myocarde consiste à introduire dans le cœur des cellules souches ayant la capacité de se différencier en cellules endothéliales, en cellules musculaires lisses (néovascularisation) ou en cardiomyocytes. Un des mécanismes potentiels des cellules transplantées est la sécrétion de facteurs paracines participant à l'activation des cellules souches endogènes. Les cellules injectées dans le cœur peuvent être des cellules souches se différenciant *in vivo* ou des cellules souches préalablement différenciées *in vitro*. Cependant la transplantation des cellules pré-différenciées présente un faible taux de survie, de prolifération et d'intégration dans le tissu hôte par rapport à l'injection directe des cellules souches (Passier et al., 2008). L'avantage de cette méthode utilisant des cellules pré-différenciées est le contrôle de la spécificité de différenciation *in vitro* limitant ainsi les risques de formation des tératomes.

Les premiers résultats précliniques sur des modèles animaux d'infarctus du myocarde utilisant la thérapie cellulaire sont encourageants. La transplantation des cellules souches dérivées de la moelle osseuse ou des progéniteurs des cellules endothéliales (appelés aussi cellules souches du sang périphérique) participe à la revascularisation et à la régénération des cardiomyocytes améliorant les fonctions cardiaques (Jujo et al., 2008; Kajstura et al., 2005; Orlic et al., 2001; Rota et al., 2007). Pour optimiser la survie des cellules mononucléaires de la moelle osseuse injectées dans le myocarde, ces cellules sont transfectées par un plasmide codant pour VEGF (Xu et al., 2004). Les essais cliniques utilisant les cellules dérivées de la moelle osseuse ou les progéniteurs des cellules endothéliales présentent une modeste amélioration des fonctions cardiaques. Ces différents résultats peuvent être en partie expliqués par une hétérogénéité de la préparation des cellules et une hétérogénéité de la définition des progéniteurs des cellules endothéliales (Joggerst and Hatzopoulos, 2009; Jujo et al., 2008; Krenning et al., 2009)

Les cellules souches dérivées de la moelle osseuse (hématopoïétiques ou mésenchymales) et les progéniteurs des cellules endothéliales dérivées du sang sont les premières cellules étudiées en thérapie cellulaire. Les autres candidats étudiés pour la régénération cardiovasculaire sont les cellules souches embryonnaires et les cellules souches cardiaques endogènes. Ces deux types de cellules souches ont la capacité de générer des cellules fonctionnelles telles que les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les cardiomyocytes. *In vivo*, ces cellules contribuent à l'amélioration des fonctions cardiaques (Ott et al., 2007; Passier et al., 2008; Zhu et al., 2009).

Pour que la thérapie cellulaire soit efficace après un infarctus du myocarde, il est important que les cellules greffées survivent à long terme, s'intègrent de manière fonctionnelle et soient physiologiquement compatibles avec le tissu hôte. Les étapes clés de la thérapie cellulaire sont : l'isolation des cellules, l'administration des cellules dans le cœur, leur survie et leur prolifération, l'intégration des cellules dans le myocarde, puis la stabilité et l'innocuité des cellules greffées à long terme (Segers and Lee, 2008) (figure 9).

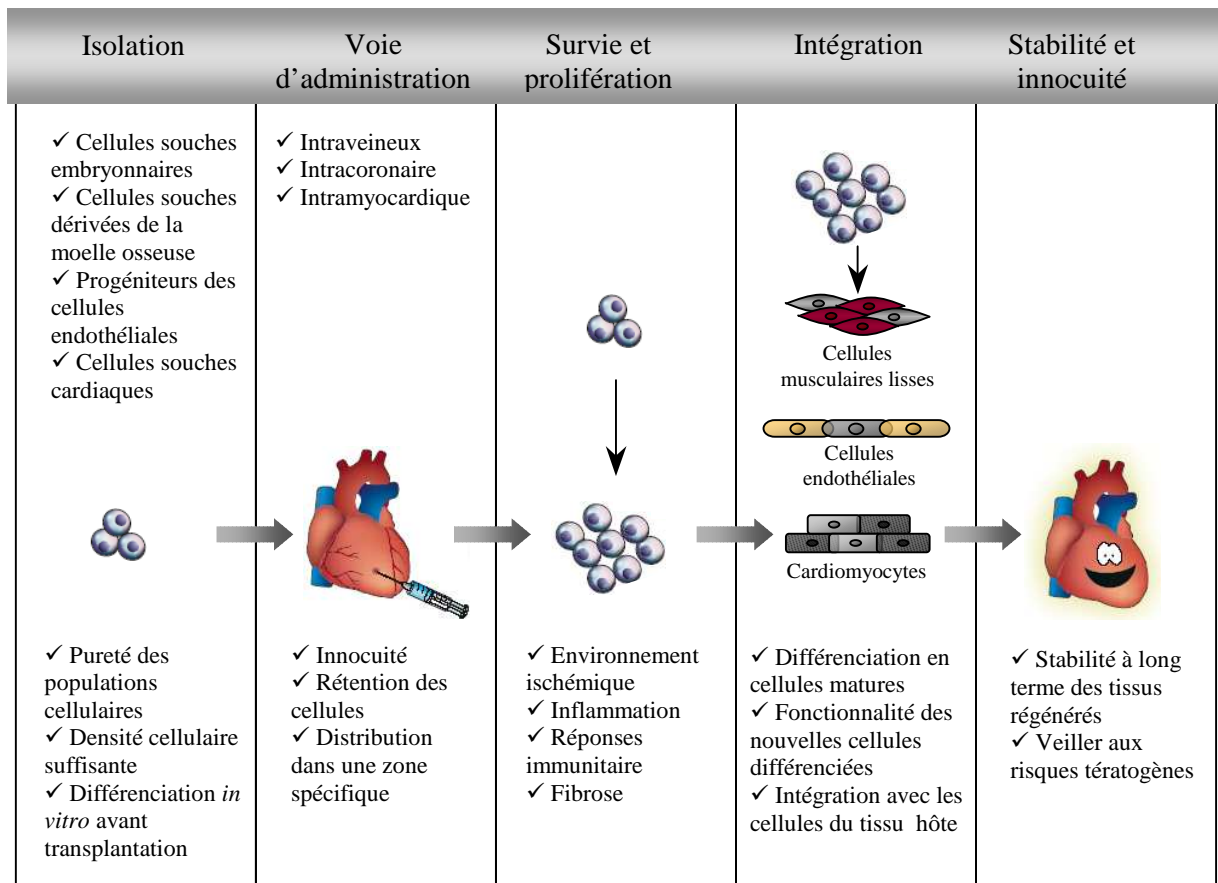


Figure 9. Les différents challenges de la régénération cardiovasculaire via la thérapie cellulaire.

Une des problématiques actuelles est le faible taux d'intégration des cellules injectées, dans le tissu cardiaque pour former des nouveaux vaisseaux ou des cardiomyocytes. Néanmoins, l'injection des cellules souches a des effets bénéfiques en stimulant la néovascularisation et la survie des cardiomyocytes via la sécrétion de composés actifs. L'approche alternative consiste à reproduire les effets paracrines en administrant directement le facteur d'intérêt (Passier et al., 2008).

Ainsi, le second challenge permettant la régénération cardiovasculaire après l'ischémie du myocarde consiste à identifier un facteur capable d'induire la prolifération et la différenciation des cellules souches cardiaques endogènes en cellules vasculaires et/ou cardiomyocytes. Cette technique peut être limitée par la quantité de cellules souches endogènes. L'avantage de cette technique permettrait d'éviter les risques de différenciation non spécifique des cellules *in vivo* (ostéoblaste, fibroblaste). Cette méthode permettrait de contourner les problèmes rencontrés lors de l'isolation des cellules souches tels que l'optimisation de la pureté des cellules ou le risque de contamination avec les composés du milieu de culture des cellules (Smart and Riley, 2008).

➤ Les cellules candidates

Le choix du type cellulaire pour induire la néovascularisation est la première étape de la thérapie cellulaire. Chaque type cellulaire possède ses avantages et ses limites.

Cellules souches embryonnaires

L'utilisation des cellules souches embryonnaires est confrontée à des questions éthiques concernant l'utilisation d'embryon humain. L'emploi de ces cellules nécessite l'immunosuppression, afin d'éviter le rejet des cellules transplantées compliquant le traitement de l'ischémie du myocarde. Ces deux problèmes sont résolus par le développement des cellules souches pluripotentes induites (iPS). Cependant le risque de former des tératomes suite à la transplantation des cellules souches embryonnaires ou des cellules iPS dans le cœur n'est pas résolue. Actuellement ce risque constitue un obstacle majeur concernant l'utilisation des cellules souches embryonnaires (Joggerst and Hatzopoulos, 2009).

Progéniteurs des cellules endothéliales

Quant aux progéniteurs des cellules endothéliales leur quantité dans le sang est réduite chez les patients atteints de diabète, d'hypercholestérolémie, d'hypertension, chez les fumeurs ou les personnes âgées. Les patients touchés par ces pathologies présentent un risque élevé d'infarctus du myocarde et pourront être difficilement traités par les progéniteurs des cellules endothéliales présents dans le sang (Jujo et al., 2008; Smart et al., 2009).

Cellules souches dérivées de la moelle osseuse

En 1960, McCulloch et Till identifient des cellules souches dérivées de la moelle osseuse capables de reconstituer l'hématopoïèse chez la souris (McCulloch and Till, 1960). Trois ans plus tard, cette même équipe démontre le potentiel clonogénique de ces cellules (Becker et al., 1963). Actuellement, les résultats obtenus avec les cellules souches dérivées de la moelle osseuse n'ont pas donné des résultats permettant d'avancer les essais cliniques à la phase III (Ahn et al., 2008b). C'est pourquoi, d'autres recherches ont été menées sur les cellules souches cardiaques endogènes.

Cellules souches cardiaques

Le cœur humain adulte contient une petite population de cellules souches cardiaques caractérisée par l'expression des marqueurs de surfaces tels que c-kit, MDR1 et Sca-1.

C-kit est un récepteur des cellules souches impliqué dans la prolifération, la migration, la différenciation et la sécrétion. MDR1 nommé également glycoprotéine P est une protéine de transport permettant d'expulser des colorants, des substances toxiques ou des médicaments dans le compartiment extracellulaire. L'antigène 1 de la cellule souche (Sca-1) est impliqué dans la signalisation et l'adhésion cellulaire (Anversa and Nadal-Ginard, 2002). Ces cellules souches cardiaques positives pour c-kit, Sca-1 ou MDR1 sont intégrées dans des structures interstitielles du myocarde appelées niches cardiaques. Ces niches constituent un micro-environnement permettant de maintenir ces cellules souches cardiaques à l'état quiescent (Barile et al., 2007b; Urbanek et al., 2006).

Plus récemment, les cellules dérivées de l'épicarde (EPDC) ont été identifiées comme étant une nouvelle source de cellules souches adultes. Les cellules EPDC au stade embryonnaire sont essentielles pour la formation des coronaires. Les cellules EPDC adultes restent à l'état quiescent et semblent conserver leur potentiel de néovascularisation après stimulation. Smart N. et Riley P. ont observé que les EPDC, après activation, migrent en quantité suffisante dans le cœur adulte. Les EPDC constituent donc une cible thérapeutique potentielle pour la néovascularisation sans nécessiter l'expansion de ces cellules *ex vivo* (Smart et al., 2009; Smart and Riley, 2008).

Les deux types de cellules souches cardiaques adultes abordés dans ce manuscrit sont les cellules souches dérivées de l'épicarde (EPDC) et les cellules souches Sca-1 positives (Sca-1+).

➤ Les cellules souches dérivées de l'épicarde : EPDC

Chez l'embryon, les cellules EPDC issues de l'épicarde sont formées à partir des transitions épithélio-mésenchymateuse. Pendant le développement cardiaque, les EPDC contribuent à la formation des coronaires, des valves atrio-ventriculaires et des fibres de Purkinje (système de conduction périphérique). Les EPDC participent également à l'établissement de l'architecture du myocarde notamment lors de sa compaction. L'interaction entre les cardiomyocytes et les EPDC via des facteurs paracrines serait responsable de la régulation de la compaction du myocarde. La signalisation entre les EPDC et les cardiomyocytes est encore mal connue. Une des voies de signalisation la mieux décrite est celle de l'acide rétinoïque sécrété par les EPDC et influençant le développement du myocarde (Chen et al., 2002; Lie-Venema et al., 2007; Winter and Gittenberger-de Groot, 2007). Les EPDC expriment la principale enzyme de synthèse de l'acide rétinoïque, RALDH2. D'autre part, cette enzyme est absente dans les cardiomyocytes. L'acide rétinoïque sécrété par les EPDC va induire l'augmentation du taux des facteurs FGF. Les récepteurs 1 et 2 de FGF ainsi activés vont favoriser la prolifération des cardiomyocytes.

En outre lors du processus de formation des coronaires, les EPDC, provenant des transitions épithélio-mésenchymateuse, migrent dans le myocarde et se différencient en divers types cellulaires. L'interaction entre le myocarde et l'épicarde est essentielle pour soutenir la vascularisation coronarienne. Le myocarde sécrète les facteurs FGF activateurs et les facteurs TGF β inhibiteurs des transitions épithélio-mésenchymateuse. La libération de ces composés par le myocarde semble contrôler la localisation du développement des nouvelles artères coronaires. La migration des EPDC dans le myocarde est favorisée par la Thymosine β 4 (T β 4) qui est un facteur paracrine libéré par le myocarde (Smart et al., 2009).

Les EPDC se différencient ensuite en fibroblastes cardiaques, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et progéniteurs du sang (angioblastes). Les facteurs VEGF (vascular endothelial growth factor) et FGF-2 (fibroblast growth factor 2) sont responsables de la différenciation des EPDC en angioblastes et cellules endothéliales. En revanche, les facteurs PDGF (platelet-derived growth factor), BMP2 (bone morphogenetic protein 2) et TGF β (transforming growth factor β) activeraient la différenciation des EPDC en cellules musculaires lisses et fibroblastes (Kruithof et al., 2006; Wessels and Perez-Pomares, 2004).

En outre, les EPDC sont considérées comme des cellules souches cardiaques car elles ont les propriétés de s'auto-renouveler et de se différencier en divers types cellulaires (Smart et al., 2009; Wessels and Perez-Pomares, 2004; Winter and Gittenberger-de Groot, 2007). Pour résumer, les cellules EPDC ont un rôle important lors du développement du cœur via leur différenciation ou via la sécrétion de facteurs paracrines. Il est donc intéressant d'étudier si les EPDC adultes conservent ces caractéristiques embryonnaires lors de la régénération cardiovasculaire après un infarctus du myocarde.

Les cellules EPDC adultes isolées à partir de cœurs humains présentent un immunophénotype différent des autres populations de cellules souches cardiaques.

Les EPDC n'expriment pas les marqueurs :

- des cellules hématopoïétiques (CD11A-, CD14-, CD15-, CD19-, CD34-, CD45-),
- des progéniteurs des cellules endothéliales (vWF-, Flk1-, CD31-, VE-cadhérine-)
- ou des cellules souches cardiaques (Isl-1-).

Ces EPDC constituent donc une nouvelle source de cellules souches cardiaques (van Tuyn et al., 2007). Les cellules EPDC adultes, isolées à partir de cœurs humains, sont injectées dans le myocarde des souris immédiatement après l'induction de l'infarctus du myocarde. Deux semaines après l'infarctus du myocarde, les EPDC sont greffées dans le myocarde et expriment les marqueurs tels que α actine des cellules musculaires lisses ou vWF (von Willebrand factor) spécifique des cellules endothéliales. Les EPDC injectées sont négatives pour les marqueurs tels que la troponine I ou la myosine sarcomérique spécifique des cardiomyocytes. La vascularisation augmente après deux semaines, cependant aucune cellule EPDC n'est détectée dans les parois vasculaires. Après six semaines, la préservation des fonctions cardiaques, l'atténuation de la restructuration ventriculaire et l'augmentation du taux de survie sont encore observées chez les souris traitées par les EPDC. Néanmoins, six semaines après l'infarctus du myocarde peu de cellules EPDC ont pu être détectées. Les EPDC transplantées immédiatement après un infarctus du myocarde ont une influence bénéfique sur la survie des souris pendant les six semaines suivant l'intervention. Le mécanisme exact expliquant l'amélioration des fonctions cardiaques suite à la transplantation des EPDC dans le myocarde reste à être élucidé (Winter et al., 2007).

La thymosine β 4 est une protéine liant l'actine G qui est impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, processus nécessaire lors de la migration cellulaire. Jusqu'à présent, seule la thymosine β 4 peut induire la migration et la différenciation des EPDC dérivées des explants cardiaques de souris adultes en plusieurs types cellulaires : fibroblastes, cellules musculaires lisses et cellules endothéliales (Smart et al., 2007a). Il serait intéressant de découvrir une autre molécule activant la prolifération, la migration et la différenciation des EPDC en cellules vasculaires permettant la néovascularisation. La différenciation des EPDC en fibroblastes n'est pas souhaitable pour le traitement après l'infarctus du myocarde. La restructuration de la zone ischémique compense la perte des cardiomyocytes par le recrutement des fibroblastes. Une activation excessive de la fibrose via la différenciation des EPDC en fibroblastes serait alors néfaste pour maintenir les performances contractiles du myocarde.

➤ Les cellules souches Sca-1+

Les cellules souches Sca-1+ sont présentes dans les cœurs des souris adultes et peuvent être isolées soit par la digestion enzymatique soit par la migration des cellules à partir des explants cardiaques. La plupart des groupes de recherche, travaillant ces cinq dernières années sur l'étude du potentiel de différenciation des cellules Sca-1+, isolent ces cellules par digestion enzymatique des cœurs de souris (Matsuura et al., 2004; Rosenblatt-Velin et al., 2005; Wang et al., 2006). Cependant la digestion enzymatique peut, lors d'une exposition prolongée, dégrader l'intégrité des marqueurs des cellules souches. Ceci aurait comme conséquence la perte des caractéristiques définissant les cellules souches à savoir leurs capacités à s'auto-renouveler et à se différencier en une diversité de types cellulaires fonctionnels (Tang et al., 2007). L'autre alternative consiste à isoler les cellules souches cardiaques migrant des explants cardiaques (Tang et al., 2007).

D'autre part, ces cellules Sca-1+ isolées, en réponse au traitement par l'oxytocine, se différencient *in vitro* en cardiomyocytes matures. Les cardiomyocytes formés se contractent spontanément et la fréquence de contraction est augmentée après traitement par l'isoprotérénole. Ces résultats permettent de mettre en évidence la fonctionnalité des cardiomyocytes formés. Il est intéressant de noter que ces effets biologiques sont la conséquence de l'activation du récepteur de l'oxytocine qui est un récepteur couplé aux protéines de la famille Gq. Donc, pour la première fois il a été démontré qu'un RCPG peut

être impliqué dans la différenciation des cellules Sca-1+ (Matsuura et al., 2004). En outre, les cellules Sca-1+ adultes peuvent également se différencier *in vitro* en cardiomyocytes fonctionnels sous l'action d'un autre facteur le FGF-2 (Rosenblatt-Velin et al., 2005). D'autre part, les cellules Sca-1+ auraient le potentiel de générer *in vitro* des cellules endothéliales après traitement par le facteur VEGF (Wang et al., 2006). Ainsi suivant les facteurs stimulant, les cellules Sca-1+ ont la capacité de se différencier en cardiomyocytes ou en cellules endothéliales qui sont des constituants majeurs pour régénérer le cœur ischémié.

Des études *in vivo* montrent que le nombre de cellules Sca-1+ détectées dans le ventricule gauche augmente après un infarctus du myocarde. Cette observation suggère la participation des cellules Sca-1+ au cours de la restructuration du myocarde. La transplantation des cellules Sca-1+ en périphérie de la zone ischémié, immédiatement après l'infarctus du myocarde, atténue le développement de la lésion du myocarde. Les souris traitées par les cellules Sca-1+ montrent une augmentation de l'angiogenèse autour de la zone ischémié. Néanmoins les cellules endothéliales et les cardiomyocytes, provenant de la différenciation des cellules Sca-1+, sont détectés en très faible quantité. Le mécanisme d'action des cellules Sca-1+ participant à la protection du myocarde n'est pas déterminé. Une des possibilités suggérée est l'interaction des cellules transplantées avec le tissu hôte par la sécrétion de facteurs paracrines agissant sur le développement vasculaire et la survie des cardiomyocytes (Wang et al., 2006). Les cellules Sca-1+ ont été également identifiées chez l'homme et constituent une cible potentielle lors de la régénération cardiovasculaire (van Vliet et al., 2008).

La transplantation des cellules souches, leur survie et leur intégration fonctionnelle dans le tissu hôte sont actuellement un challenge. L'alternative serait de trouver un facteur activant spécifiquement le recrutement des cellules souches cardiaques endogènes.

Actuellement environ 40% des médicaments ont pour cible les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Les récepteurs couplés aux protéines G présentent l'avantage de pouvoir contrôler spécifiquement leur activation via un agoniste ou leur inhibition via un antagoniste. Les RCPG interviennent notamment dans les processus de différenciation des adipocytes, des ostéoblastes et des cellules musculaires lisses (Wang and Wong, 2009). L'activation du récepteur couplé aux protéines Gq de l'oxytocine stimule *in vitro* la différenciation des cellules Sca-1+ en cardiomyocytes (Matsuura et al., 2004).

Donc l'identification de nouveaux RCPG impliqués dans la différenciation des cellules souches cardiaques est une perspective attractive.

I – 3. Implication des récepteurs couplés aux protéines G dans la régulation du système cardiovasculaire

I – 3. a. Classification et activation des récepteurs couplés aux protéines G

La communication intercellulaire se fait grâce à l'échange de stimuli qui agissent sur la face extracellulaire des récepteurs transmembranaires. Ce récepteur qui reconnaît le stimulus et l'effecteur, génère un signal intracellulaire aboutissant à une réponse biologique. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) constituent la famille des protéines membranaires la plus importante impliquée dans la transduction du signal.

Chez les vertébrés, cette famille contient 750 à 1000 membres et représente ainsi la plus grande famille de gènes (>1% du génome humain). Chez l'homme, l'analyse du génome a permis de recenser environ 750 RCPG, dont la majorité correspond aux récepteurs olfactifs et gustatifs (Fredriksson and Schioth, 2005). Les Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG) sont caractérisés par la présence de sept hélices α transmembranaires séparées alternativement par des boucles intracellulaires et extracellulaires (Rosenbaum et al., 2009).

Les RCPG sont classés en 5 familles en fonction de leur séquence et de leur similitude structurale. Cette classification dont l'acronyme est GRAFS est la suivante : **G**lutamate (appelé aussi famille B selon le système de classification A,B,C,D,E,F), **R**hodopsine (ou famille A), **A**dhésion (précédemment inclus dans la famille B), « **F**rizzled/taste2 » et **S**écrétine (ou famille C) (Bockaert and Pin, 1999; Fredriksson et al., 2003; Fredriksson and Schioth, 2005; Rosenbaum et al., 2009) (figure 10). La famille de la rhodopsine est la plus importante concernant le nombre et la diversité de ses RCPG. Les récepteurs de cette famille sont caractérisés par la conservation de motifs dans leur séquence, impliquant des caractéristiques structurales et des mécanismes d'activation communs. Malgré ces similitudes, chaque RCPG possède des combinaisons de transduction du signal unique.

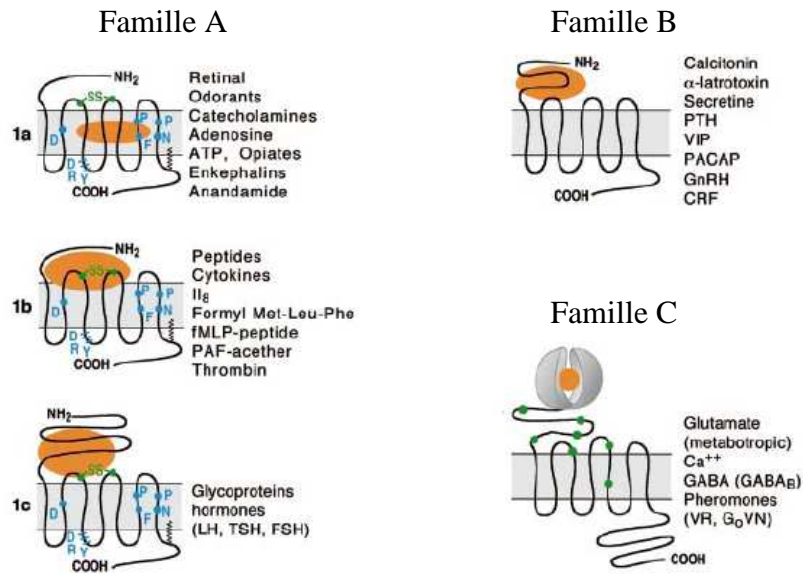


Figure 10. Principales familles de RCPG (Bockaert and Pin, 1999)

Les RCPG sont activés par une large variété de ligands tels que les amines biogéniques, les acides aminés, les ions, les lipides, les peptides, les protéines, les photons, les molécules odorantes, les phéromones ou les nucléotides (Flower, 1999; Marinissen and Gutkind, 2001). Les ligands endogènes sont connus pour plus de 200 RCPG. Lorsque le ligand physiologique n'est pas identifié, le GPCR est dit orphelin (Wettschureck and Offermanns, 2005). L'approche traditionnelle pour la conception de médicaments consiste à mimer ou inhiber l'action d'un ligand connu sur son récepteur cible. Les RCPG orphelins présentent un intérêt particulier pour les entreprises pharmaceutiques car ils constituent autant de cibles potentielles pour la découverte de nouvelles molécules.

Les récepteurs à sept domaines transmembranaires ont la particularité d'interagir avec les protéines G hétérotrimériques, d'où la terminologie de RCPG. Pour la majorité des RCPG, leur interaction avec les protéines G n'est pas encore démontrée, en particulier pour les gènes des récepteurs récemment séquencés. Les protéines G sont constituées de trois polypeptides, la sous unité α qui se lie et hydrolyse le GTP et le dimère composé des sous unités β et γ . La forme inactive de la protéine hétérotrimérique est composée de la sous unité α liée au GDP qui est associée au dimère $\beta\gamma$ (GDP- $\alpha\beta\gamma$). GDP- α peut interagir avec le récepteur. Toutefois l'association de la protéine G au récepteur se fait principalement via $\beta\gamma$. Le récepteur change alors de conformation en présence de son ligand ou de manière constitutive (Smit et al.,

2007). Ceci entraîne un changement de conformation de GDP- α et la réduction de l'affinité du GDP. Le GTP se lie alors à la sous unité α de la protéine hétérotrimérique. La forme active GTP- α provoque sa dissociation avec $\beta\gamma$ et le récepteur. La sous unité α conserve sa forme active jusqu'à ce que le GTP soit hydrolysé en GDP grâce à l'activité intrinsèque GTPase. Dès que le GTP est hydrolysé en GDP, la sous unité α s'associe avec le dimère $\beta\gamma$ et le récepteur (Neer, 1995). La fréquence et la durée d'activation des protéines G dépendent de la durée de vie de GTP- α . L'activité GTPase intrinsèque de la sous unité α peut être accélérée en présence des protéines GAP « GTPase-activating proteins » (figure 11). Le dimère $\beta\gamma$ participe à la désensibilisation des RCPG via son action sur les protéines kinases couplées aux protéines G (GRK). GRK2 activé par le dimère $\beta\gamma$ phosphoryle le GPCR induisant sa désensibilisation (Salazar et al., 2007). La sous unité $\beta\gamma$ interagit également avec divers effecteurs tels que la phospholipase C (PLC), l'adénylate cyclase (AC) ou le phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate kinase (PI3K) (Ford et al., 1998).

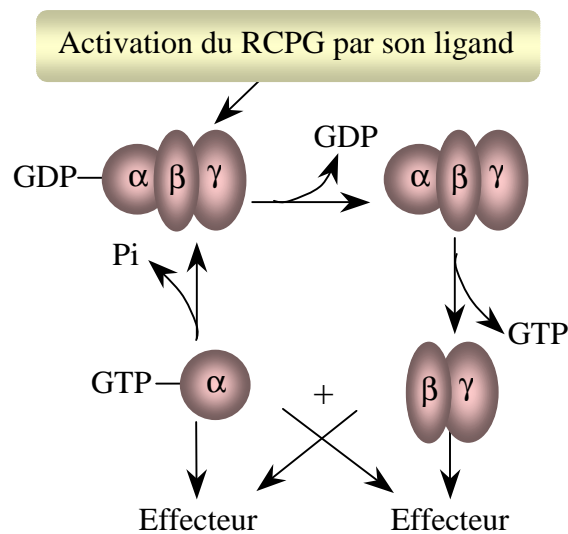


Figure 11- Régulation du cycle des protéines G hétérotrimériques.

Il existe différentes sous unités α constituant la protéine G. Selon la similarité des séquences d'acide aminé, quatre principales familles ont été définies : Gs (α_s , α_{olf}), Gi (α_{i-1} , α_{i-2} , α_{i-3} , α_0 , α_{t-1} , α_{t-2} , α_{gust} , α_z), Gq (α_q , α_{11} , α_{14} , α_{15} , α_{16}) et G₁₂ (α_{12} , α_{13}). La voie de signalisation dépend de la famille de protéine G qui interagit avec le RCPG. Chacune des sous unités α ou $\beta\gamma$ peut activer divers effecteurs tels que l'adénylyl et guanylyl cyclase, phosphodiesterase, phospholipase A2 (PLA2), phospholipase C (PLC), phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate

kinase (PI3K) et les canaux ioniques. La stimulation des différents effecteurs entraîne l'activation ou l'inhibition des seconds messagers pour induire diverses réponses biologiques. En effet les RCPG contrôlent de nombreux processus physiologiques dont le système endocrine et le métabolisme cellulaire, les réponses inflammatoires et immunitaires, la neurotransmission, le système sensoriel, le développement embryonnaire, la prolifération, la différenciation cellulaire et la régulation du système cardiovasculaire (Wettschureck and Offermanns, 2005).

Dans le cœur, les RCPG régulent des fonctions cardiovasculaires essentielles telles que la fréquence cardiaque, la contractilité, le tonus vasculaire. Plus de 100 RCPG différents sont exprimés dans le système cardiovasculaire et approximativement un tiers sont des récepteurs orphelins. Il est donc intéressant de poursuivre les études pour comprendre la transduction du signal et l'activité fonctionnelle des RCPG dans les cellules cardiaques en condition physiologique ou pathologique (Tang and Insel, 2004).

I – 3. b. Voies de signalisation des protéines Gs dans le système cardiovasculaire

Les RCPG couplés à Gs activent l'adénylate cyclase (AC). L'activation de l'AC est responsable de l'augmentation de la production d'adénosine 3', 5' cyclique monophosphate (AMPC).

➤ Signalisation de Gs dans les cardiomyocytes

La protéine kinase A (PKA) liée à l'AMPC régule la contractilité des cardiomyocytes. Dans le cœur, PKA est responsable de la phosphorylation des protéines telles que le canal Ca^{2+} type-L, le récepteur de la ryanodine, phospholambane, troponine I. Le canal Ca^{2+} type-L est localisé dans les tubules-T transverses. En réponse au potentiel d'action ce canal libère dans le cytoplasme des cardiomyocytes du calcium. En outre, la phosphorylation via PKA du récepteur de la ryanodine (RyR2), localisé dans le réticulum sarcoplasmique, libère dans le cytoplasme une grande quantité de Ca^{2+} . L'augmentation de la concentration du calcium dans le cytoplasme provoque la contraction des myofilaments des cardiomyocytes. D'autre part, la

relaxation des cardiomyocytes est due à une réduction du taux de Ca^{2+} cytoplasmique. Pour cela, le calcium cytoplasmique est transporté dans le réticulum sarcoplasmique via la pompe à calcium ATPase dépendante, SERCA. Ainsi, La phosphorylation de la protéine phospholambane augmente l'affinité de SERCA pour le Ca^{2+} permettant la relaxation des cardiomyocytes. De plus la phosphorylation de la protéine troponine I par PKA réduit la sensibilité des myofilaments au Ca^{2+} induisant une accélération de la relaxation des cardiomyocytes (figure 12).

➤ **Signalisation de Gs dans les cellules musculaires lisses**

L'activation de PKA via la signalisation de la protéine Gs intervient également lors de la relaxation des muscles lisses. L'état de relaxation est stimulé par la phosphatase des chaînes légères de la myosine (MLCP) qui déphosphoryle les chaînes légères de la myosine (MLC). PKA activant par phosphorylation MLCP est donc impliquée dans l'effet vasodilatateur (figure 12).

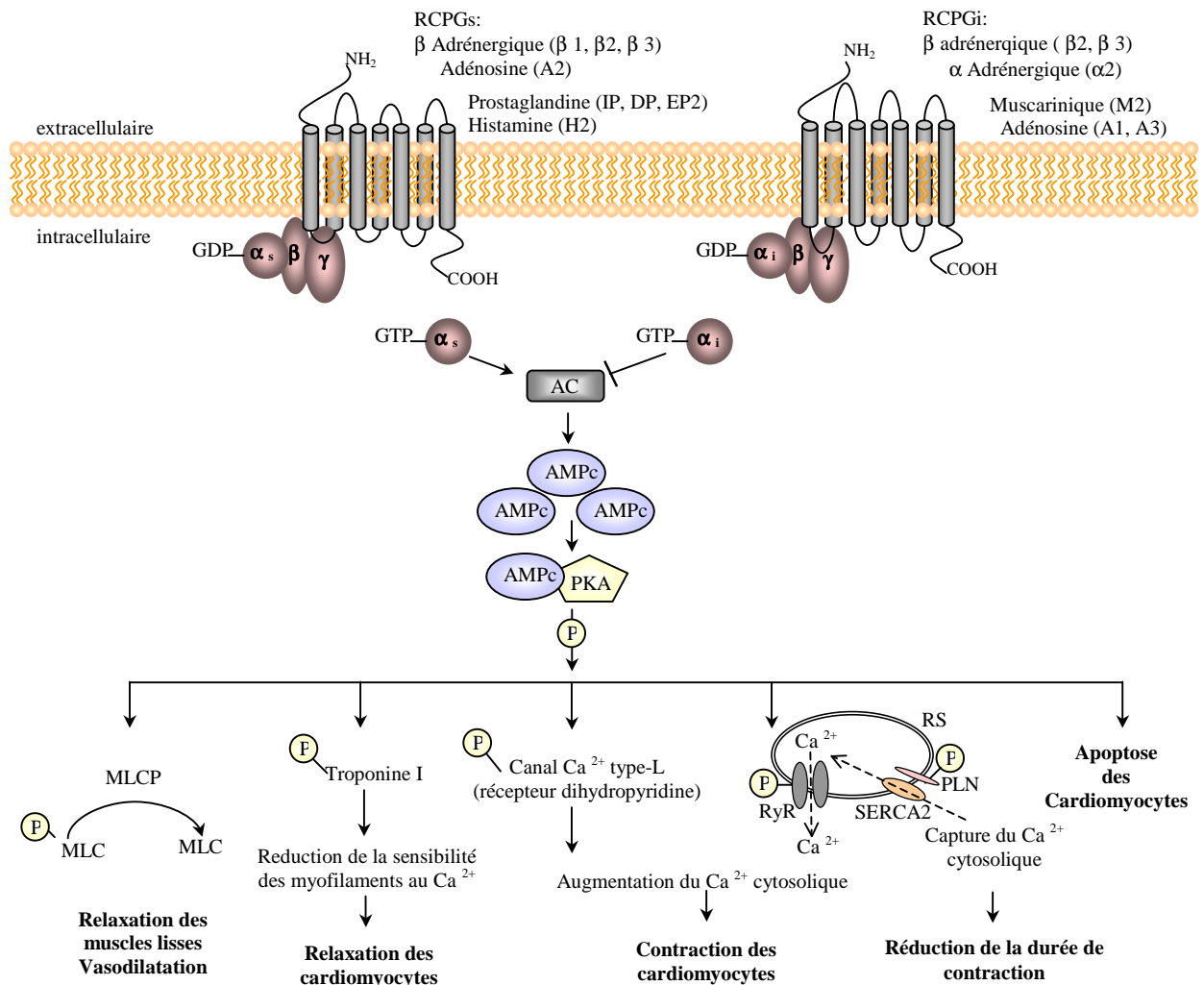


Figure 12. Principales voies de signalisation des protéines $G\alpha_s$ et $G\alpha_i$ dans le système cardiovasculaire.

(Adams and Brown, 2001; Chien, 1999; Salazar et al., 2007)

AC: adénylyl-cyclase, GDP: guanosine diphosphate, GTP: guanosine triphosphate, MLC: chaînes légères de la myosine, MLCP: phosphatase des chaînes légères de la myosine, P : phosphorylation, PKA : protéine kinase A, RS: réticulum sarcoplasmique, RyR: récepteur de la ryanodine, SERCA2: “sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase”

—→ activation, —| inhibition

➤ Modèles murins utilisés pour étudier la signalisation de Gs

Pour étudier les effets physiologiques de $G\alpha_s$ dans les pathologies cardiaques, des souris transgéniques surexprimant environ 3 fois $G\alpha_s$ spécifiquement dans les cardiomyocytes ont été générées. La contractilité du myocarde est dépendante de la densité des récepteurs β adrénergiques, de l'effecteur l'adénylate cyclase et du complexe GTP- $G\alpha_s$. Les souris surexprimant $G\alpha_s$ présentent un niveau basal de contraction du myocarde comparable aux souris sauvages. La protéine $G\alpha_s$ présente en excès dans le myocarde n'augmente pas l'activité maximale de l'adénylate cyclase (AC). Cependant la vitesse d'activation de l'AC est plus rapide chez les souris surexprimant $G\alpha_s$. Ces résultats suggèrent que la surexpression de $G\alpha_s$ améliore l'efficacité de la transduction du signal des récepteurs β adrénergiques couplés à $G\alpha_s$. Ceci se traduit par l'augmentation des réponses chronotropes et inotropes positives. Cependant ces souris transgéniques présentent à long terme des anomalies structurales du tissu cardiaque, notamment l'hypertrophie cellulaire, la fibrose et la nécrose. Ces observations ont permis de conclure que l'activation chronique de la voie de signalisation de $G\alpha_s$ dans le cœur conduit à l'hypertrophie cardiaque, la fibrose et l'insuffisance cardiaque (Iwase et al., 1996).

➤ Quelques récepteurs couplés aux protéines Gs

Les récepteurs adrénergiques constituent une classe importante de RCPG responsables de la transduction du signal initié par le système nerveux sympathique pour réguler le système cardiovasculaire. La contractilité et la fréquence cardiaque sont principalement régulées par les récepteurs β adrénergiques (β AR). Trois sous types des β AR sont exprimés dans le cœur. β 1AR couplé à $G\alpha_s$ représente environs 80% des β AR et joue un rôle majeur lors de la régulation des fonctions contractiles. Les sous types β 2 et β 3 sont tous deux couplés aux protéines $G\alpha_s$ et $G\alpha_i$. La relaxation des muscles lisses est régulée par une variété de mécanisme dont l'activation des RCPG α_s . Ainsi le récepteur adénosine A_2 , le récepteur β 2 adrénergique ou le récepteur prostaglandine (sous type IP,DP, EP₂) stimulent la vasodilatation via $G\alpha_s$. (Salazar et al., 2007; Wettschureck and Offermanns, 2005).

I – 3. c. Voies de signalisation des protéines Gi dans le système cardiovasculaire

Dans le cœur, la voie de signalisation de $G\alpha_i$ est opposée à celle de $G\alpha_s$ en inhibant l'activation de l'adénylyl cyclase (figure 12).

➤ **Quelques récepteurs couplés aux protéines Gi**

Les récepteurs adénosines 1 et 3 (A1,A3), les récepteurs muscariniques 2 (M2) et les récepteurs α_2 adrénergiques (α_2AR) sont couplés à $G\alpha_i$. L'administration d'adénosine avant l'ischémie réduit la taille de la zone lésée et améliore la restauration des fonctions ventriculaires pendant la reperfusion précoce. Cet effet cardioprotecteur est secondaire à l'activation du récepteur adénosine 1 (Donato and Gelpi, 2003).

➤ **Signalisation de Gi dans les cardiomyocytes**

L'activation du récepteur muscarinique 2 induit des effets inotropes négatifs via $G\alpha_i$ tandis que la sous unité $G\beta\gamma$ est responsable des effets chronotropes négatifs en stimulant les canaux potassiques K_{Ach} (Logothetis et al., 1987; Wettschureck and Offermanns, 2005). Chez l'homme, l'infusion d'acétylcholine ne modifie pas la force de contraction basale mais atténue l'augmentation de la force de contraction induite par l'activation des βAR (Newton et al., 1996).

Les récepteurs α_2 adrénergiques présynaptiques participent à l'inhibition de la libération des norépinéphrines par les nerfs sympathiques innervant le cœur. Ce mécanisme permet de réguler le système sympathique activé par les récepteurs βAR et $\alpha_1 AR$. Lorsque les récepteurs αAR sont déficients chez la souris, on observe une augmentation des catécholamines et un dysfonctionnement de la contraction cardiaque (Bodi et al., 2005; Ponicke et al., 1998).

Certaines formes d'insuffisance cardiaque chez l'homme montrent une augmentation de l'activité des récepteurs couplés à $G\alpha_i$. On observe alors une réduction de l'influx de calcium et une dégradation des myofilaments conduisant aux cardiopathies dilatées. L'augmentation de l'expression de $G\alpha_i$ est observée dans les modèles de cardiopathie dilatées mais pas dans les cardiopathies ischémiques (Bohm et al., 1990; McCloskey et al., 2008). L'inhibition

sélective de la signalisation de $G\alpha_i$ dans les cardiomyocytes révèle une augmentation de l'apoptose suite à l'ischémie et la reperfusion. L'activation de $G\alpha_i$ serait une réponse adaptative après l'ischémie et la reperfusion pour promouvoir la survie cellulaire (Adams and Brown, 2001; DeGeorge et al., 2008).

I – 3. d. Voies de signalisation des protéines Gq dans le système cardiovasculaire

Les RCPG couplés à Gq activent la phospholipase C β (PLC β). PLC β est responsable de l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5 diphosphate (PIP2) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG). La formation d'IP3 permet l'augmentation du calcium cytoplasmique initialement stocké dans le réticulum sarcoplasmique (figure 13).

➤ **Signalisation de Gq dans les cellules musculaires lisses**

Dans les cellules musculaires lisses, l'augmentation du calcium cytoplasmique via IP3 permet la formation du complexe Ca^{2+} -calmoduline. Ce complexe active la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK). La phosphorylation des chaînes légères de la myosine (MLC) entraîne la contraction des muscles lisses c'est-à-dire une vasoconstriction (Wettschureck and Offermanns, 2005) (figure 13).

➤ **Signalisation de Gq dans les cellules endothéliales**

Dans les cellules endothéliales, le complexe Ca^{2+} -calmoduline active la eNO-synthase (eNOS). Cette enzyme catalyse la formation de la L-citrulline et du monoxyde d'azote (NO) à partir de L-arginine. Le NO ainsi formé active les guanylyl-cyclases solubles (sGC) dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses, ceci conduit à la formation de cGMP à partir du GTP. Puis, le cGMP active la protéine kinase G-1 (PKG-1), qui déphosphoryle MLC par la phosphatase des chaînes légères de la myosine. Cette signalisation en cascade a pour résultat la relaxation des cellules musculaires lisses ou vasodilatation (figure 13) (Mombouli and Vanhoutte, 1999).

➤ Signalisation de Gq dans les cardiomyocytes

Les RCPG couplés à Gq activent un premier effecteur : la phospholipase C β (PLC β) qui est responsable de la formation des composés IP3 et DAG.

Dans les cardiomyocytes le calcium libéré via IP3 est couplé à la calmoduline (Ca^{2+} -calomoduline) pour activer la calcineurine phosphatase. Le facteur de transcription NFAT « Nuclear Factor of Activated T cells » est déphosphorylé par la calcineurine phosphatase, permettant ainsi l'activation de la transcription des gènes favorisant l'hypertrophie (Dorn and Force, 2005; Wettschureck and Offermanns, 2005) (figure 13)

Le second messenger, DAG active les protéines kinases C (PKC). Les quatre isoformes possédant des fonctions majeures dans le cœur sont PKC α , β (activées par DAG et Ca^{2+}) et PKC δ , ϵ (activées par DAG uniquement) (Dorn and Force, 2005; Hubbard and Hepler, 2006). PKC α réduit la déphosphorylation de phospholamban entraînant une activation prolongée de la pompe SERCA2, responsable du transport du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique. Ainsi une augmentation de l'expression de PKC α a pour conséquence une réduction de la contractilité du myocarde. Les souris présentant une déficience complète de PKC α dans le cœur, montrent une hypercontractilité. Donc PKC α régule principalement la contractilité cardiaque en agissant sur phospholamban et SERCA2. (Braz et al., 2004).

L'activation de PKC β favorise l'hypertrophie et provoque des déficiences de la contractilité cardiaque et de la croissance des cardiomyocytes néonatales (Bowman et al., 1997; Wakasaki et al., 1997). Plus récemment, il a été montré que la délétion de PKC β dans un modèle murin d'ischémie/reperfusion du myocarde induit la réduction de la zone apoptotique et atténue les dysfonctionnement cardiaques (Kong et al., 2008)

L'activation de PKC ϵ protège le cœur lors d'une ischémie/reperfusion. Tandis que le rôle cardioprotecteur de PKC δ post ischémique reste controversé (Inagaki et al., 2006). Il est établi que les pathologies humaines telles que l'hypertrophie cardiaque et l'insuffisance cardiaque révèlent une augmentation de l'expression des PKC α , β et ϵ (Dorn and Force, 2005)

D'autre part, les RCPG couplés à Gq activent un second effecteur, PI3K. L'activation de la protéine kinase B (PKB) appelée aussi Akt, favorise la survie des cardiomyocytes (Howes et al., 2003; Howes et al., 2006) (figure 13).

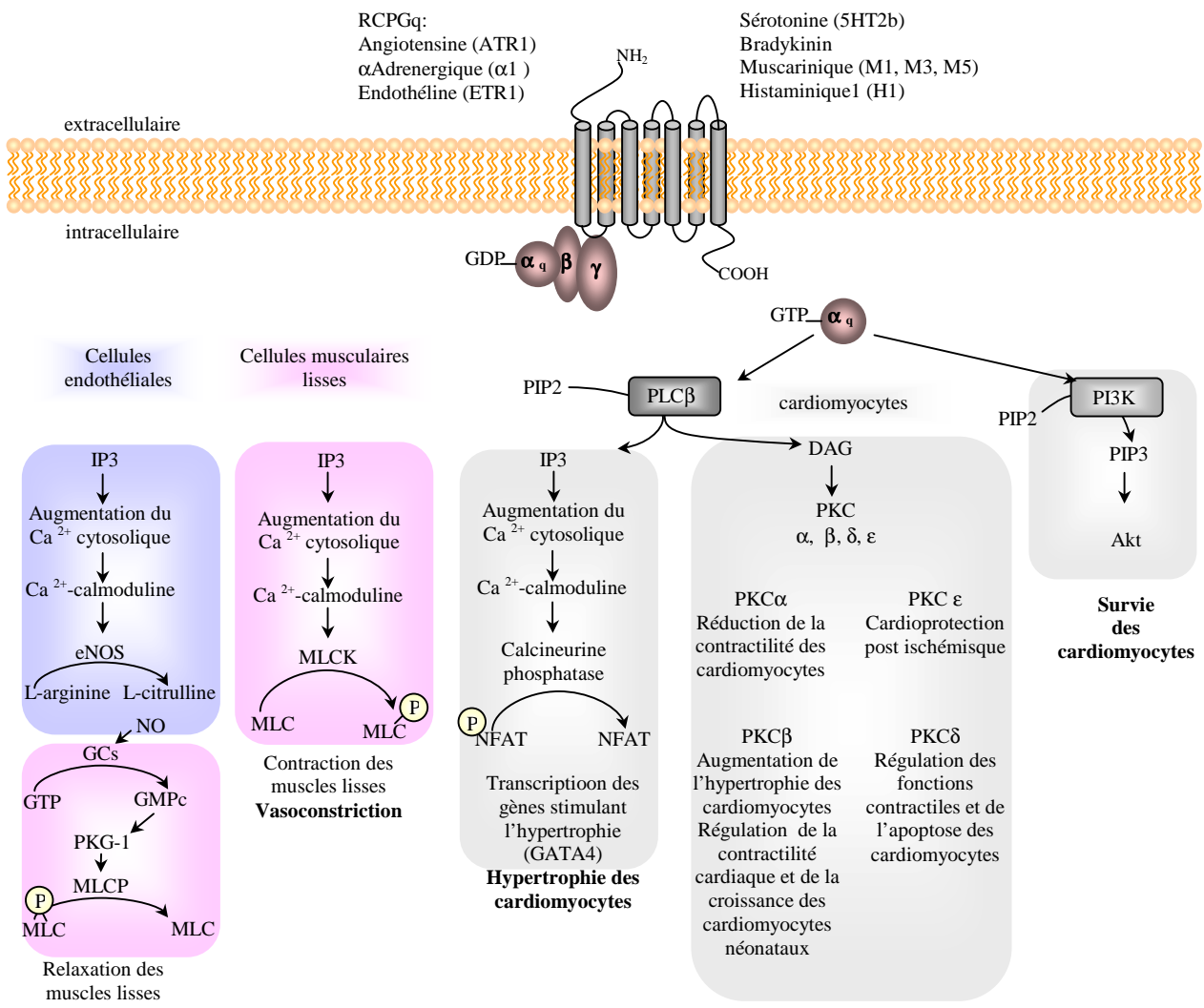


Figure 13. Principales voies de signalisation des protéines Gq dans le système cardiovasculaire.

Les cadres de couleur indiquent dans quel type cellulaire à lieu la cascade de signalisation. Cadre bleu : cellules endothéliales, cadre rose : cellules musculaires lisses, cadre gris : cardiomyocytes. \textcircled{P} : phosphorylation, \longrightarrow activation

(Dorn and Force, 2005; Howes et al., 2003; Howes et al., 2006; Salazar et al., 2007; Wetschurck and Offermanns, 2005)

➤ Modèles murins utilisés pour étudier la signalisation de Gq

Des modèles animaux ont permis de comprendre les fonctions de plusieurs RCPGq dans le système cardiovasculaire. Par exemple, les souris surexprimant le récepteur 1 de l'angiotensine (ATR1) développent une hypertrophie cardiaque conduisant à une mort prématurée suite à une insuffisance cardiaque congestive (Paradis et al., 2000). Lorsque ATR1 est aboli dans les cardiomyocytes, les souris ne présentent pas d'insuffisance cardiaque et leur survie est significativement améliorée (Harada et al., 1999). Un autre modèle murin surexprimant le récepteur 1 de l'endothéline (ETR1) montre que ce RCPG cardiaque stimule également la restructuration cardiaque et l'hypertrophie. De plus l'activation de ces deux récepteurs ATR1 et ETR1 ont un potentiel vasoconstricteur. Donc l'inactivation de ces deux récepteurs peut avoir des effets bénéfiques sur les fonctions cardiaques comme l'hypertension et l'insuffisance cardiaque. L'activation du récepteur α_1 adrénergique participe également activement au contrôle : du tonus vasculaire (vasoconstriction), de la contraction et de la croissance des cardiomyocytes (Salazar et al., 2007). Les récepteurs muscariniques (M1, M3, M5) sont impliqués dans la régulation de la signalisation antiapoptotique (Budd et al., 2003). D'autre part, les récepteurs de la sérotonine (5HT2b) sont indispensables lors du développement embryonnaire du cœur (Nebigil et al., 2000). Donc les RCPGq contrôlent diverses fonctions cardiaques du stade embryonnaire jusqu'au stade adulte.

La modulation de l'expression de Gq directement permet d'étudier l'implication de cette voie de signalisation dans le cœur, indépendamment des RCPGq pouvant présenter des redondances fonctionnelles. Lorsque $G\alpha_q$ et $G\alpha_{11}$ (principales sous unité de la famille Gq) sont totalement inactivés par mutation, les souris meurent au 11^{ème} jour du stade embryonnaire suite à une hypoplasie du myocarde (Offermanns et al., 1998). Si $G\alpha_q$ et $G\alpha_{11}$ sont inactivés uniquement dans les cardiomyocytes au stade adulte, alors l'hypertrophie ventriculaire n'est pas détectée suite à une constriction de l'aorte. Lorsque la pression artérielle augmente suite à une constriction de l'aorte, le cœur doit s'adapter pour assurer la circulation sanguine dans l'organisme. Ce mécanisme d'adaptation peut être provoqué via la voie de signalisation Gq en stimulant l'hypertrophie ventriculaire (Wettschureck et al., 2001). Suivant le degré d'activation de Gq surexprimé dans les cardiomyocytes, l'hypertrophie évolue vers la cardiopathie dilatée avec apoptose des cardiomyocytes pouvant induire une insuffisance cardiaque (Adams et al., 1998; D'Angelo et al., 1997).

I – 3. e. Les récepteurs couplés aux protéines G12 dans le système cardiovasculaire

La plupart des RCPG ayant un effet vasoconstricteur, tels que les récepteurs de l'angiotensine II (ATR1), l'endothelin-1 (ETR1), ou le tromboxane A2 induisent la contraction des cellules musculaires lisses via les protéines Gq et G12.

➤ **Signalisation de G12 dans les cellules musculaires lisses**

La famille G12 comprenant $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ activent les protéines RhoGEF « Rho guanine nucleotide exchange factors » permettant la formation de RhoA-GTP. La kinase activée par RhoA-GTP inhibe la phosphatase des chaînes légères de la myosine induisant la contraction des cellules musculaires lisses. La signalisation de G12 avec RhoGEF comme effecteur est la mieux caractérisée (Wirth et al., 2008; Worzfeld et al., 2008) (figure 14).

➤ **Signalisation de $G\alpha_{13}$ dans les cellules endothéliales**

Dans les cellules endothéliales, l'activation de $G\alpha_{13}$ est indispensable lors du développement vasculaire embryonnaire. Ainsi, la délétion de $G\alpha_{13}$, spécifiquement dans les cellules endothéliales, est létale au stade embryonnaire (Ruppel et al., 2005). L'inactivation de $G\alpha_{13}$ ne semble pas affecter la différenciation des cellules progénitrices en cellules endothéliales. Cependant l'inactivation de $G\alpha_{13}$ affecte certaines étapes de l'angiogenèse telles que la migration et l'interaction des cellules endothéliales avec la matrice extracellulaire. Ceci entraînant alors un dysfonctionnement du développement vasculaire (Offermanns et al., 1997; Ruppel et al., 2005; Worzfeld et al., 2008).

➤ **Modèles murins utilisés pour étudier la signalisation de G12 et Gq**

Pour comprendre le rôle des voies de signalisation de $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ et $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ lors de la régulation du tonus vasculaire, des souris présentant une délétion de $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ ou $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ spécifiquement dans les cellules musculaires lisses ont été étudiées. Cette étude révèle que $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ est nécessaire pour maintenir la pression sanguine à son niveau basal et pour développer l'hypertension suite à un régime sodé. Au contraire la signalisation de $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$

via RhoGEF n'intervient pas dans la régulation du tonus vasculaire basal mais participe à l'augmentation de la pression sanguine suite à un régime sodé (Wirth et al., 2008; Worzfeld et al., 2008).

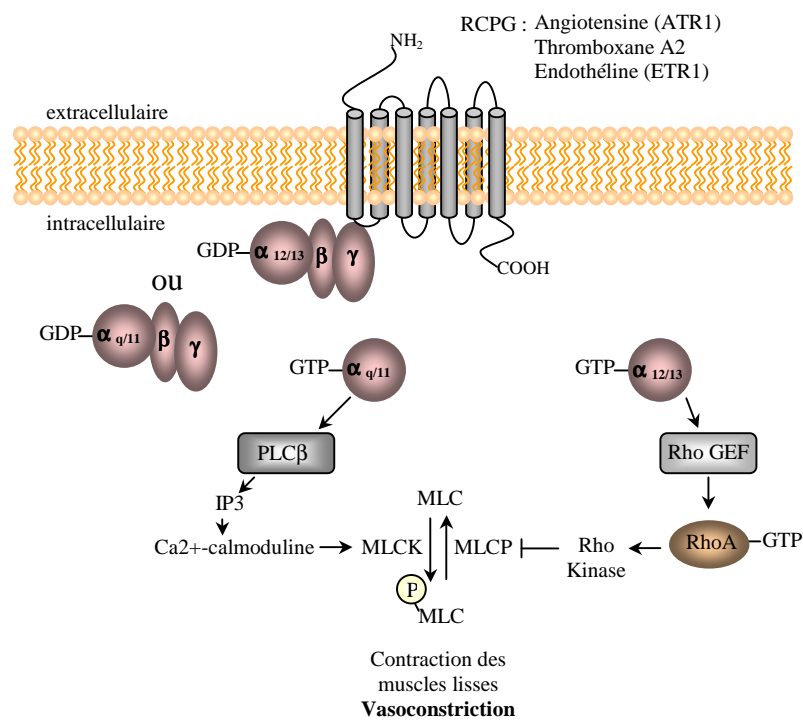


Figure 14. Régulation du tonus vasculaire via $G\alpha_q/G\beta_{13}$ et $G\alpha_{12}/G\beta_{13}$.

Dans le système cardiovasculaire, les RCPGs jouent un rôle central dans la régulation des principales fonctions telles que la fréquence cardiaque, la contractilité, le tonus vasculaire et le développement embryonnaire du cœur. De plus, les RCPG de la thrombine (PAR) et de l'angiotensine II participent à la modulation de l'angiogenèse notamment via la stimulation de la sécrétion des cytokines (VEGF, PDGF, FGF-2) (Richard et al., 2001).

Donc l'étude des RCPG nouvellement identifiés dans le cœur est une stratégie thérapeutique intéressante. Ainsi l'identification d'un nouveau RCPG, impliqué directement dans la stimulation de l'angiogenèse et dans la différenciation des cellules souches cardiaques pour régénérer le tissu cardiovasculaire, est un challenge attractif.

I – 4. Le système des prokinéticines

I – 4. a. Structure des prokinéticines

Les prokinéticines sont une nouvelle famille de protéines sécrétées et classées en deux types, prokinéticine-1 (PK-1) et prokinéticine-2 (PK-2). En 1980 Joubert et Strydom découvrent dans le venin du serpent *mamba* une petite protéine non toxique appelée alors protéine A. L'étude fonctionnelle de cette protéine montre qu'elle stimule la contraction de l'iléon chez le cochon d'inde. Cette protéine est alors nommée, toxine intestinale 1 du serpent *mamba* (MIT1) (Schweitz et al., 1999). Une autre petite protéine Bv8 sécrétée par la peau des grenouilles *Bombina variegata* est isolée. Elle présente une séquence protéique très proche de MIT1 et active également la contraction de l'iléon (Kaser et al., 2003; Mollay et al., 1999). Les séquences d'ADN codant MIT1 et Bv8 ont été utilisées comme sonde pour recherche des homologues dans la base de donnée du génome humain. Ainsi, deux nouveaux ADN codant sont clonés en se basant sur la similarité des séquences des protéines MIT1 et Bv8 (Li et al., 2001).

Chez l'homme, la prokinéticine-1 est l'homologue de la toxine intestinale 1 du serpent *mamba* (MIT1). La prokinéticine-2 a pour homologue une protéine de la peau d'une grenouille, *Bombina varieta* (Bv8) (Mollay et al., 1999). Les prokinéticines humaines ont été identifiées pour la première fois dans le système gastro-intestinal. Ces protéines stimulent spécifiquement la contraction des cellules musculaires lisses de l'iléon (partie inférieure de l'intestin grêle) (Li et al., 2001). La forme mature de la prokinéticine-1 (PK-1) chez l'homme est constituée de 86 acides aminés et la forme mature de la prokinéticine-2 (PK-2) est composée de 81 acides aminés (figure 15). Les séquences protéiques de PK-1 et PK-2 partagent environ 40% d'identité (Kaser et al., 2003).

La prokinéticine-1, Bv8, MIT1 et la prokinéticine-2 partagent un même motif structural : cinq ponts disulfures. Toutes ces protéines matures ont une séquence amino-terminale identique (AVITGA) (figure 15). Les quatre premiers acides aminés N-terminaux (AVIT) sont utilisés pour nommer cette famille de protéine (Kaser et al., 2003). La complète conservation du domaine N-terminal (AVITGA) est essentielle pour maintenir leur activité. Tandis qu'une

conservation modérée de la partie C-terminale est tolérée pour assurer l'activité des prokinéticines (Bullock et al., 2004).

		↓	↓	↓↓	↓	↓		↓	↓	↓
H 1	AVITGACERDVQCGAGTCCAISLWLRGLRMCTPLGREGEECHPGSHKVPFFR-KRKHHTCPCLPNLLC									
R 1	AVITGACERDVQCGAGTCCAISLWLRGLRLCTPLGREGEECHPGSHKIPFFR-KRQHHTCPCSPSLLC									
S 1	AVITGACERDIQCGAGTCCAISLWLRGLRLCTPLGREGEECHPGSHKIPFLR-KRQHHTCPCSPSLLC									
Mam	AVITGACERDLQCGKGTCCAVSLWIKSVRVCTPVGTSGEDCHPASHKIPFSGQRKMHTCPCAPNLAC									
Bom	AVITGACDKDVQCGSGTCCAASAWSRNIRFCIPLGNSGEDCHPASHKVPYDG-KRLSSLCPCKSGLTC									
H 2	AVITGACDKDSQCGGGMCCAIVWKSIRICTPMGKLGDSCHPLTRKVPFFG-RRMHHTCPCLPGLAC									
S 2	AVITGACDKDSQCGGGMCCAIVWKSIRICTPMGQVGDSCCHPLTRKVPFFG-RRMHHTCPCLPGLAC									
R 2	AVITGACDKDSQCGGGMCCAIVWKSIRICTPMGQVGDSCCHPLTRKVPFFG-RRMHHTCPCLPGLAC									

		↓	
H 1	SRFPDGRYRCSMDLKNINF		86
R 1	SRFPDGRYRCSQDLKNVNF		86
S 1	SRFPDGRYRCFRDLKNANF		86
Mam	VQTSPKKFKCLSK		80
Bom	SKSGE-KFKCS		77
H 2	LRTSFNRFICLAQK		81
S 2	LRTSFNRFI CLARK		81
R 2	LRTSFNRFI CLARK		81

Figure 15. Séquence des protéines matures de la famille AVIT dans différentes espèces.

Le numéro fait référence au type 1 ou au type 2 des prokinéticines. H : homme, R : rat, S : souris, Mam : serpent *mamba*, Bom : grenouille *Bombina varieta*. Les flèches bleues indiquent les 10 cystéines constituant les 5 ponts disulfures. Les rectangles bleus montrent les acides aminés conservés. ○ Indique le nombre d'acide aminé chez l'homme. (Kaser et al., 2003)

Le gène codant pour la prokinéticine-1 est localisé chez l'homme sur le chromosome 1p21 et sur le chromosome 3 chez la souris. En ce qui concerne le gène de la prokinéticine-2, il est localisé sur le chromosome 3p21.1 chez l'homme et sur le chromosome 6 chez la souris (Kaser et al., 2003). Des analyses sur les gènes de la prokinéticine-2 chez l'homme et la souris montrent que la prokinéticine-2 est codée par 4 exons, le 3^{ème} exon est sujet à l'épissage alternatif. Ainsi, on identifie deux isoformes de la prokinéticine-2. La forme courte est composée de 81 acides aminés (codée par les exons 1, 2 et 4) et la forme longue (PK-2L) avec 102 acides aminés (codée par les quatre exons). L'insertion des 21 acides aminés supplémentaires par rapport à PK-2 proviennent de l'exon 3 (Chen et al., 2005). PK-2L peut

être clivée *in vitro* au niveau de la région des 21 acides aminés insérés. La protéine PK-2 β générée par la protéolyse de PK-2L est fonctionnelle *in vitro*. Jusqu'à présent le clivage des prokinéticines *in vivo* par des protéases extracellulaires n'a pas été mis en évidence (figure 16).



Figure 16. Comparaison des séquences d'acide aminé PK-2 et PK-2L chez l'homme.

Les 21 acides aminés supplémentaires dans PK-2L sont en gras. Les séquences reconnues par la protéase furine sont surlignées et la flèche indique le site de clivage (Chen et al., 2005).

La prokinéticine-1 est codée par 3 exons. Aucune isoforme de la prokinéticine-1 issu de l'épissage alternatif est connue (Kaser et al., 2003). La prokinéticine-1, est initialement appelée facteur endothélial vasculaire dérivé des glandes endocrines (« Endocrine-Gland derived Vascular Endothelial Growth Factor ou EG-VEGF ») du fait de sa similitude fonctionnelle avec le VEGF (LeCouter et al., 2001).

I – 4. b. Les récepteurs des prokinéticines

Les prokinéticines exercent leurs fonctions biologiques en se liant à deux récepteurs couplés aux protéines G, le récepteur 1 de la prokinéticine (PKR1) et le récepteur 2 de la prokinéticine (PKR2). Les avancées technologiques du séquençage du génome ont permis la découverte de nombreux RCPG orphelins. Trois équipes indépendantes ont identifié chez les mammifères, les récepteurs des prokinéticines (PKR1 et PKR2) parmi ces récepteurs orphelins (Lin et al., 2002a; Masuda et al., 2002; Soga et al., 2002). PKR1 et PKR2 ont environ 85% d'acides aminés identiques. Les gènes correspondant à PKR1 et PKR2 sont localisés respectivement sur les chromosomes 2 et 20 chez l'homme. Cette localisation chromosomique distincte indique que ces deux RCPG sont codés dans le génome humain par des gènes indépendants (Kaser et al., 2003; Lin et al., 2002a). Les deux RCPG sont composés de deux exons codant

393 acides aminés pour PKR1 et 384 acides aminés pour PKR2 (figure 17) (Soga et al., 2002).

PKR1	METIMGFMD	NAINTSTSF	SVLNPHGAHA	TSFPFNFSYS	DYDMPLEDE	50
PKR2	MA-----	-AQNNTSFT	PNFNPPQDHA	SSLSFNFSYG	DYDLPMDEDE	41
TM1						
PKR1	DVTNSRTFFA	AKIVIGMALV	GIMLVCGIGN	FIFIAALVRY	KCLRNLINLL	100
PKR2	DMTKTRTFFA	AKIVIGIALA	GIMLVCGIGN	FVFIAALTRY	KCLRNLINLL	91
TM2						
PKR1	IANLAISDFL	VAIVCCPFEM	DYYVVRQLSW	EHGHVLCSTV	NYLRTVSLYV	150
PKR2	IANLAISDFL	VAIICCPFEM	DYYVVRQLSW	EHGHVLCASV	NYLRTVSLYV	141
TM3						
PKR1	STNALLAIAI	DRYLAI VHPL	RPRMKCQTAT	GLIALVWTVS	ILIAIPSAFY	200
PKR2	STNALLAIAI	DRYLAI VHPL	KPRMNYQTAS	FLIALVWTVS	ILIAIPSAFY	191
TM4						
PKR1	TTETVLVIVK	SQEKIFCGQI	WPVDQQLYYK	SYFLFIFGIE	FVGPVVTMTL	250
PKR2	ATETVLFIVK	SQEKIFCGQI	WPVDQQLYYK	SYFLFIFGVE	FVGPVVTMTL	241
TM5						
PKR1	CYARISRELW	FKAVPGFQTE	QIRKRLRCRR	KTVLVLMCIL	TAYVLCWAPF	300
PKR2	CYARISRELW	FKAVPGFQTE	QIRKRLRCRR	KTVLVLMCIL	TAYVLCWAPF	291
TM6						
PKR1	YGFTIVRDFE	PTV FVKEKHY	LTAFYIVECI	AMSNSMINTL	CFVTVKNDTV	350
PKR2	YGFTIVRDFE	PTV FVKEKHY	LTAFYVVECI	AMSNSMINTV	CFVTVKNTM	341
TM7						
PKR1	KYFKKIMLLH	WKASYNGGKS	SADLDLKTIG	MPATEEVDCI	RLK	393
PKR2	KYFKKMMLLH	WRPSQRGSKS	SADLDLRTNG	VPTTEEVDIC	RLK	384

Figure 17. Alignement des séquences protéiques des récepteurs humains PKR1 et PKR2.

Les rectangles gris indiquent les acides aminés identiques. La flèche montre la jonction des deux exons dans la séquence codante. Les séquences transmembranaires (TM) des récepteurs sont identifiées par des cadres noirs. 393 Indique le nombre d'acide aminé chez l'homme. (Soga et al., 2002)

Les prokinétines se lient aux récepteurs PKR1 et PKR2 avec différentes affinités. PK-2 a une plus forte affinité pour les deux récepteurs PKR1 et PKR2 que PK-1. Le classement des différentes affinités des ligands pour PKR1 est : PK-2 > PK-2 β \cong PK-1. Le classement des affinités des ligands pour PKR2 est le suivant : PK-2 > PK-1 >> PK-2 β . Ce classement est établi à partir des comparaisons des valeurs des concentrations d'inhibition (CI 50) des études de compétition de liaison des radioligands (test de « binding ») sur les récepteurs PKR1 et PKR2 (Figure 18) (Chen et al., 2005).

	PKR1	PKR2
PK-1	27,6 ± 8,2 nM	52,2 ± 16,4 nM
PK-2	4,5 ± 0,8 nM	6,4 ± 1,3 nM
PK-2β	34,6 ± 13,5 nM	>1000 nM

Figure 18. Comparaison des constantes d'inhibition 50, des ligands PK-1, PK-2, et PK-2β, au cours des études de compétition de liaison des radioligands sur les récepteurs PKR1 et PKR2 (Chen et al., 2005).

Dans les systèmes cellulaires hétérologues, PKR1 et PKR2 peuvent se coupler aux protéines Gq et Gs pour induire respectivement la mobilisation du calcium intracellulaire et une accumulation d'AMPc. L'implication de la protéine Gi, dans la signalisation des récepteurs PKR1 et PKR2, est également suggérée (Chen et al., 2005). Suivant le profil d'expression des protéines G dans un type cellulaire, les prokinéticines via leurs récepteurs endogènes pourraient stimuler différentes fonctions physiologiques. Ainsi il a été montré que l'activation des récepteurs des prokinéticines régulent la prolifération, les processus anti-apoptotiques, la différenciation et la migration des cellules cibles dans divers systèmes (Kaser et al., 2003; Maldonado-Perez et al., 2007; Ngan et al., 2008).

Les prokinéticines et leurs récepteurs sont exprimés dans une large variété de tissus tels que les ovaires, les testicules, les glandes surrénales, le placenta, l'utérus, le cerveau, le système digestif et la moelle osseuse (Ngan and Tam, 2008). Cette diversité de la distribution tissulaire suggère que les prokinéticines soient impliquées dans une multitude de fonctions *in vivo*. En effet, les prokinéticines sont impliquées dans diverses fonctions biologiques telles que : la motilité gastro-intestinale (Li et al., 2001), la sensibilité à la douleur (Hu et al., 2006; Negri et al., 2006; Negri et al., 2002), l'angiogenèse (LeCouter et al., 2001; LeCouter et al., 2003), le rythme circadien (Cheng et al., 2002), l'activation du développement du bulbe olfactif (Ng et al., 2005), l'hématopoïèse (LeCouter et al., 2004), le cycle menstruel (Battersby et al., 2004; Ngan et al., 2006), la reproduction (Maldonado-Perez et al., 2007).

I – 4. c. Activités biologiques des prokinéticines

La première fonction biologique des prokinéticines identifiée est la contraction des cellules musculaires lisses de l'iléon (Li et al., 2001). Puis l'activité angiogénique des prokinéticines a été largement étudiée notamment par le groupe de N.Ferrara.

➤ **L'angiogenèse**

Initialement, les prokinéticines ont été identifiées comme étant un nouveau facteur angiogénique spécifique de l'endothélium des glandes endocrines et en particulier les glandes surrénales, les ovaires, les testicules et le placenta. L'expression de PK-1 et PK-2 est augmentée dans un environnement hypoxique. Les séquences d'ADN des prokinéticines possèdent un promoteur reconnu par le facteur de transcription HIF-1. HIF-1 induit la transcription de l'ARN et secondairement la synthèse des prokinéticines (LeCouter et al., 2001; LeCouter et al., 2003).

Les glandes endocrines, sécrétant des stéroïdes possèdent une activité métabolique importante qui nécessite une constante évolution de la vascularisation et une certaine perméabilité de l'endothélium permettant les échanges des métabolites. Le gène codant PK-1 possède un site de liaison potentiel pour les facteurs stéroïdes. Ainsi les hormones telles que l'œstrogène, la progestérone, régulent l'expression de PK-1 dans le système reproductif. Les prokinéticines PK-1 et PK-2 et leurs récepteurs sont exprimés dans l'endomètre humain. L'endomètre est un des tissus où l'angiogenèse est activement régulée dans les conditions physiologiques, au cours du cycle menstruel. Les études de S. Battersby et E.S.W. Ngan suggèrent que PK-1 participe à la régulation de l'angiogenèse dans l'endomètre (Battersby et al., 2004; Maldonado-Perez et al., 2007; Ngan et al., 2006). La prokinéticine-1 et la prokinéticine-2 stimulent la prolifération, la migration et la fenestration des cellules endothéliales dérivées de la glande surrénale. Les effets mitogènes et la capacité de PK-1 à favoriser la survie des cellules endothéliales dérivées des glandes surrénales sont liés à l'activation des protéines kinases MAPK et Akt (Lin et al., 2002b). En outre, le traitement par PK-1 des cellules endothéliales dérivées de l'utérus stimule la prolifération et l'angiogenèse principalement via PKR1. L'activation de la voie de signalisation de MAPK contribue directement à l'activation de la prolifération et de l'angiogenèse dans les cellules endothéliales dérivées de l'utérus

traitées par PK-1. Les effets de PK-1 sur les cellules endothéliales varient selon l'origine des cellules. PK-1 favorise la prolifération des cellules dérivées de la glande surrénale en activant Akt et MAPK (Lin et al., 2002b). Cependant, le traitement des cellules endothéliales dérivées de l'utérus par PK-1 active la prolifération via la signalisation de MAPK mais pas Akt (Lee et al., 2009). Dans ces deux types cellulaires, PK-1 active directement leur prolifération et l'angiogenèse sans la participation de VEGF. En revanche, le traitement des cellules endothéliales dérivées du corps jaune par PK-1 stimule l'angiogenèse via VEGF (Kisliouk et al., 2005). D'autre part, PK-1 n'active pas la prolifération des cellules endothéliales dérivées de la veine ombilicale humaine (LeCouter et al., 2001). Ainsi, suivant l'origine tissulaire des cellules endothéliales, le profil d'expression des récepteurs des prokinétines varie. Les cellules endothéliales dérivées du corps jaune expriment PKR1 et PKR2 contrairement aux cellules endothéliales dérivées de l'aorte ou des capillaires du cerveau qui expriment uniquement PKR1. Cette variété d'expression suggère des fonctions de l'endothélium distinctes. Des études récentes suggèrent que le récepteur PKR1 soit impliqué au cours de la prolifération et la survie des cellules endothéliales. Ces études proposent également que PKR2 soit impliqué dans la survie des cellules endothéliales. En outre, la présence de PKR2 semble indispensable lors de la stimulation de la perméabilisation des cellules endothéliales (Podlovni et al., 2006).

Les prokinétines-1 et 2 et leurs récepteurs ont été identifiés dans un premier temps comme étant une nouvelle famille de facteur angiogénique spécifique de l'endothélium des glandes endocrines. Cependant leur rôle physiologique et leur mécanisme d'action contrôlant la régulation de l'angiogenèse dans le système cardiovasculaire ne sont pas encore élucidés.

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

Chez l'homme et la souris, les deux récepteurs PKR1 et PKR2 sont exprimés dans les cellules souches hématopoïétiques et dans certaines cellules sanguines matures telle que les lymphocytes. PK-2 est exprimé par les neutrophiles sur le site de l'inflammation et peut stimuler la migration des monocytes (LeCouter et al., 2004). Les neutrophiles, les monocytes et les cellules dendritiques sont des effecteurs du système immunitaire inné. Ils sont essentiellement des coactivateurs dans la réponse immunitaire acquise. Les neutrophiles sont rapidement recrutés vers le foyer d'infection. Ils ont alors un rôle de phagocytose lorsqu'ils rencontrent une cellule étrangère ou infectée. Les monocytes (macrophages) peuvent

éventuellement s'infiltrer, sécréter des cytokines impliquées dans les processus de réparation de l'inflammation tissulaire (Beutler, 2004). Les cellules hématopoïétiques sont régénérées tout au long de la vie. Or LeCouter J. et ses collaborateurs ont identifié un autre facteur impliqué dans la croissance et la survie de ces cellules : les prokinéticines. PK-2 et PK-1 augment le nombre de colonies de granulocytes et monocytes, formées lors de la culture des cellules souches hématopoïétiques humaine ou de souris. De plus PK-2, PK-1 peuvent favoriser la survie et la différenciation des granulocytes et des monocytes (LeCouter et al., 2004) (Dorsch et al., 2005).

Les prokinéticines présentent également une activité au niveau du système nerveux central et périphérique.

➤ **Fonctions biologiques des prokinéticines dans le système nerveux central**

La prokinéticine-2 régule divers processus biologiques dans le système nerveux central. PK-2 est largement exprimé dans le cerveau des souris et agit en tant que facteur neurotrophique endogène pour favoriser la survie neuronale (Melchiorri et al., 2001). Dans le bulbe olfactif, PK-2 induit la migration des progéniteurs neuronales dérivés de la zone subventriculaire (Ng et al., 2005). PK-2/PKR2 ont un rôle critique au cours du développement du bulbe olfactif qui est une région où la neurogenèse persiste à l'âge adulte. L'ablation de PK-2 ou PKR2 chez les souris, montre une hypoplasie et une architecture anormale du bulbe olfactif. Ce phénomène n'est pas observé chez les souris où l'expression de PKR1 est totalement abolie (Matsumoto et al., 2006; Ng et al., 2005).

PK-2/PKR2 sont également exprimés dans le noyau suprachiasmatique (NSC) et contrôlent le rythme circadien. Chez les rats, l'expression de PK-2 est élevée le jour et diminue la nuit dans le noyau suprachiasmatique. De plus, l'expression de PK-2 dans le noyau suprachiasmatique est directement augmentée par la lumière. Les rats ont une activité de déplacement plus élevée la nuit en absence de lumière. Cependant, l'administration intracérébroventriculaire de PK-2 durant la phase sans lumière inhibe l'activité locomotrice des rats. Ces résultats suggèrent que PK-2 est un transmetteur du noyau suprachiasmatique intervenant dans le rythme circadien du comportement (Cheng et al., 2002).

➤ **Fonctions biologiques des prokinéticines dans le système nerveux périphérique**

Les récepteurs PKR1 et PKR2 sont exprimés dans les ganglions de la racine dorsale (ganglions spinaux) et PK-2 augmente la sensibilité à la douleur mécanique ou thermique. Les souris, où l'expression de PK-2 est totalement abolie, montrent une forte réduction du seuil de tolérance à la douleur induite par la chaleur ou par un stimuli chimique (capsaïcine) (Hu et al., 2006; Negri et al., 2002). La sensibilité à la douleur mécanique, thermique ou chimique est également réduite lorsque PKR1 est génétiquement supprimé chez les souris. Ce modèle murin où PKR1 est absent, présente une réduction de l'hyperalgésie thermique suite à une inflammation aiguë. Ces études mettent en évidence le rôle du récepteur PKR1 sur la modulation de la nociception. En outre, la délétion du gène codant le récepteur de la capsaïcine (TRPV1) réduit fortement l'hyperalgésie thermique causée par PK-2. Negri L. et ses collaborateurs suggèrent une interaction pharmacologique entre TRPV1 et PKR1 lors de la nociception (Negri et al., 2006).

Les prokinéticines et leurs récepteurs sont donc exprimés dans divers organes périphériques et dans le cerveau. Ainsi une modification de la signalisation des prokinéticines pourrait être associée à diverses pathologies (figure 19).

Tissus	Fonctions biologiques	Pathologies associées	Références
système gastro-intestinale	contraction des cellules musculaires lisses		(Li et al., 2001)
ovaires	angiogenèse		
testicules	angiogenèse	Hypervascularisation, cancer des testicules	(LeCouter et al., 2003; Maldonado-Perez et al., 2007)
prostate	angiogenèse	Cancer de la prostate	(Maldonado-Perez et al., 2007)
endomètre	angiogenèse		(Maldonado-Perez et al., 2007)
glandes surrénales	angiogenèse	neuroblastome	(LeCouter et al., 2001; Ngan et al., 2008)
bulbe olfactif	morphogenèse du bulbe olfactif	Syndrome de Kallmann (développement anormal du bulbe olfactif, hypogonadisme)	(Ng et al., 2005; Pitteloud et al., 2007)
ganglions de la racine dorsale	nociception	hyperalgésie	(Hu et al., 2006; Negri et al., 2006)
Moelle osseuse et cellules sanguines périphériques	Hématopoïèse, réponse immunitaire innée		(LeCouter et al., 2004)

Figure 19. Rôles physiologiques et pathologiques des prokinétines (Ngan and Tam, 2008)

L'identification et la compréhension de la signalisation des prokinétines permettraient de mettre au point une stratégie thérapeutique afin de rétablir un équilibre. Le développement d'anticorps neutralisants ou d'agonistes/antagonistes spécifiques de PKR1 ou PKR2 permettraient de comprendre les voies de signalisation. Ces approches auraient pour objectif d'aboutir à l'élaboration de thérapies ciblées. Ainsi le potentiel angiogénique des prokinétines serait d'une part inhibé pour le traitement du cancer. D'autre part, le potentiel angiogénique des prokinétines serait stimulé dans l'endomètre ou le placenta pour traiter l'infertilité. En outre la stimulation de l'angiogenèse est essentielle dans le traitement de l'infarctus du myocarde. L'identification et l'étude des prokinétines dans le système cardiovasculaire est une perspective intéressante.

CHAPITRE II – OBJECTIFS

Les cardiopathies coronariennes sont une maladie initiée par l'obstruction partielle ou totale des artères coronaires. Lorsque l'obstruction de l'artère coronaire est totale cela entraîne une ischémie cardiaque et éventuellement une insuffisance cardiaque. Afin de limiter la propagation de l'apoptose du myocarde, une des stratégies envisagée est la revascularisation de la zone ischémique pendant un infarctus du myocarde. La première étape consiste à stimuler directement l'angiogenèse. Ensuite, pour promouvoir la néovascularisation, il est nécessaire d'activer la différenciation des cellules souches cardiaques en cellules vasculaires : cellules musculaires lisses et cellules endothéliales. La formation de nouveaux vaisseaux matures est importante pour assurer leur stabilité au cours du temps et rétablir un débit sanguin normal.

Les récepteurs de la prokinéticine semblent être une cible potentielle pour activer la néovascularisation cardiaque. En effet, il a été montré que les prokinéticines sont des nouveaux facteurs angiogéniques et en particulier dans les glandes endocrines. Des précédentes recherches menées au laboratoire ont mis en évidence l'expression des prokinéticines PK-1, PK-2 et des récepteurs PKR1, PKR2 dans le cœur. L'utilisation des facteurs angiogéniques pour traiter l'infarctus du myocarde est une piste thérapeutique largement étudiée. Ces facteurs sont utilisés dans des essais cliniques en phase II. Les traitements des ischémies du myocarde par injection des protéines VEGF ou FGF-2, participent à l'amélioration des fonctions cardiaques notamment en stimulant l'angiogenèse *in vivo* (Ahn et al., 2008b).

En outre, la régénération cardiovasculaire par un facteur activant spécifiquement le recrutement et la différenciation des cellules souches cardiaques endogènes est un nouveau challenge. Un récepteur couplé à la protéine Gq participe à la différenciation des cellules souches cardiaques (Sca-1+) en cardiomyocytes. L'identification d'un RCPG impliqué dans l'angiogenèse et dans la différenciation des cellules souches cardiaques en cellules vasculaires est une perspective intéressante. Les récepteurs de la prokinéticine font partis de la famille des RCPG qui représente environ 40% des cibles médicamenteuses actuelles. Les récepteurs des prokinéticines constituent donc une cible d'intérêt dans l'étude de la néovascularisation pendant l'infarctus du myocarde.

Mon projet de recherche consistait à répondre à deux principales questions :

- 1 – Quelle est la fonction de PKR1 dans les cellules endothéliales dérivées du cœur ?
- 2 – Quel est le rôle de PKR1 dans les cellules souches cardiaques ?

Dans le cadre de mon projet de Doctorat, les objectifs suivants ont été définis :

- déterminer si les prokinétines ont la capacité de stimuler la prolifération et la migration des cellules endothéliales dérivées du cœur,
- tester si les prokinétines peuvent stimuler l'angiogenèse *in vitro* à partir des cellules dérivées du cœur,
- spécifier quel récepteur des prokinétines est impliqué dans le modèle de l'angiogenèse,
- identifier la voie de signalisation du récepteur de la prokinétine lors de l'angiogenèse *in vitro*.

La seconde partie de mes recherches consistait à étudier le rôle de PK-2/PKR1 dans les cellules souches cardiaques et en particulier les cellules dérivées de l'épicarde (EPDC).

Les objectifs de ce deuxième projet ont été les suivants :

- caractériser l'existence d'interactions potentielles entre un modèle de cardiomyocytes de rat surexprimant PKR1 et les cellules EPDC isolées des explants cardiaques des souris néonatales,
- évaluer le rôle de la prokinétine-2 sur la prolifération des cellules EPDC,
- déterminer si PK-2 est nécessaire pour restaurer la multipotence des EPDC néonatales,
- étudier l'implication de PKR1 lors de la différenciation des EPDC,
- spécifier si les EPDC isolées des souris adultes conservent leur potentiel de différenciation en cellules vasculaires après traitement par PK-2,
- déterminer si PK-2/PKR1 stimule la différenciation des EPDC adultes humaines en cellules vasculaires,
- études préliminaires sur un autre type de cellule souche cardiaque (Sca-1+) à partir des explants cardiaques de souris néonatales,

CHAPITRE III – RESULTATS

III – 1. Fonction de PKR1 dans les cellules endothéliales cardiaques

Les précédentes recherches menées au laboratoire ont mis en évidence l'expression des prokinétines PK-1, PK-2 et des récepteurs PKR1, PKR2 dans le cœur des souris. L'expression de PKR1 est détectée en particulier dans le myocarde, l'épicarde et dans les cellules endothéliales de l'aorte. Des études *in vivo* au laboratoire ont montré que l'injection transitoire d'un adénovirus exprimant PKR1 dans la zone ischémique d'un modèle murin d'infarctus du myocarde favorise la survie des souris. Les effets bénéfiques de la thérapie génique via PKR1 sont expliqués par la réduction de l'apoptose des cardiomyocytes dans les modèles *in vivo* et *in vitro* ainsi qu'une augmentation des capillaires *in vivo*. L'hypothèse émise est que PKR1 peut être impliqué indirectement ou directement lors de la formation des nouveaux capillaires dans le cœur.

La première partie de mon projet de recherche avait pour objectif de répondre à la question suivante : quelle est la fonction de PKR1 dans les cellules endothéliales dérivées du cœur ?

Mes travaux de recherche montrent pour la première fois que le récepteur 1 de la prokinétine (PKR1) exprimé dans des cellules endothéliales dérivées du cœur, permet d'activer directement l'angiogenèse.

La lignée de cellules endothéliales H5V provient du laboratoire de Dr. Annuciata Vecchi (Istituto Clinico Humanitas, Rozzano, Italie) (Garlanda et al., 1994). Ces cellules H5V sont utilisées dans les expérimentations visant à comprendre le rôle de PKR1. Les cellules H5V ne sont pas utilisées au-delà de 10 repiquages pour éviter leur dégénération (changement de morphologie, réduction de leur prolifération). Les prokinétines PK-1, PK-2 et leurs récepteurs sont exprimés dans les cellules endothéliales H5V. Pour évaluer le rôle de PKR1 lors de l'angiogenèse *in vitro*, les principales étapes de l'angiogenèse ont été étudiées.

III – 1. a. Prolifération et migration des cellules endothéliales H5V traitées par la prokinéticine-2

Le traitement des cellules H5V par la prokinéticine-2 (PK-2) montre une augmentation significative de leur prolifération par rapport aux cellules non traitées après quatre jours. Pour déterminer si PKR1 est impliqué spécifiquement dans la prolifération des cellules H5V, différentes méthodes sont utilisées pour inactiver ce récepteur. La première approche consiste à inhiber la liaison du ligand PK-2 au récepteur en utilisant un anticorps spécifique neutralisant PKR1. La seconde méthode consiste à réduire l'expression du gène codant PKR1 via la technique des petits ARN d'interférences (si RNA). Cette technique a permis de réduire spécifiquement l'expression de PKR1 de 65,6% sans modifier significativement l'expression de PKR2. L'expression du gène codant PKR2 est diminuée de 63,5% en utilisant un siRNA spécifique qui n'altère pas l'expression de PKR1 (figure 20).

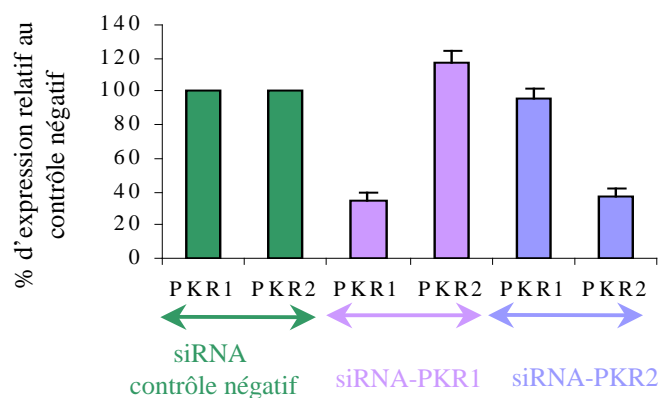


Figure 20. Identification de la spécificité des petits ARN d'interférences (si RNA) réduisant l'expression de PKR1 ou PKR2.

Analyse de l'expression de PKR1 et PKR2 par réaction en chaîne par polymérase (PCR) semi-quantitative.

Lorsque PKR1 est inactivé, la prolifération des cellules H5V traitées par PK-2 est inhibée. Néanmoins, la réduction de l'expression de PKR2 ne semble pas modifier l'augmentation de la prolifération après traitement par PK-2. Ces deux technologies (anticorps neutralisant et siRNA) sont également mises en œuvre pour observer l'implication de PKR1 lors de la migration des cellules H5V. Le traitement des cellules H5V par PK-2 induit leur migration.

Ce processus est inhibé lorsque PKR1 est inactivé. La réduction de l'expression de PKR2 ne modifie pas la migration des cellules endothéliales H5V traitées par PK-2.

Donc PK-2/PKR1 est nécessaire pour stimuler la prolifération et la migration des cellules endothéliales.

III – 1. b. Le traitement des cellules endothéliales H5V par la prokinéticine-2 active l'angiogenèse *in vitro*

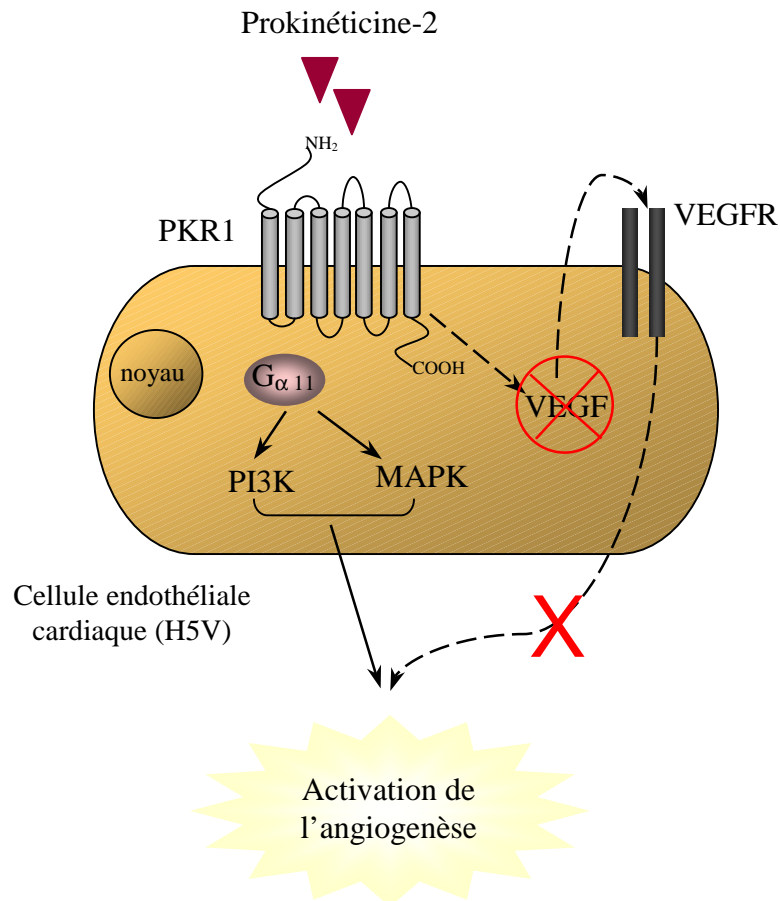
Le modèle *in vitro* de l'angiogenèse montre que l'activation de PKR1 par PK-2 ou la surexpression de PKR1 dans ces cellules conduisent à la formation des structures de type capillaire. De plus, l'angiogenèse *in vitro* est inhibée lorsque PKR1 est neutralisé ou lorsque son expression est réduite. La question qui se pose alors est de déterminer si la stimulation de PKR1 agit directement sur l'angiogenèse ou indirectement par l'intermédiaire d'autres facteurs angiogéniques. Or il a été montré que le traitement des cellules endothéliales dérivées du corps jaune par la prokinéticine-1 stimule l'angiogenèse via VEGF (Kisliouk et al., 2005). Cependant, le facteur VEGF ne semble pas être impliqué dans la voie de signalisation de PKR1 car son expression et son taux de protéines restent inchangés dans les cellules endothéliales H5V traitées par PK-2. De plus, la neutralisation de VEGF par un anticorps spécifique n'altère pas l'angiogenèse *in vitro* activé par PK-2. Pour confirmer l'implication de PKR1 lors de l'angiogenèse, des cellules endothéliales humaines dérivées de l'aorte (HAEC) sont utilisées. Les cellules HAEC expriment PKR1 mais pas PKR2. Après activation des cellules HAEC par PK-2, des structures de type capillaire sont observées. Ces résultats indiquent que PKR1 stimule directement l'angiogenèse dans le modèle *in vitro* sans l'intervention du récepteur PKR2.

III – 1. c. Identification de la voie de signalisation de PKR1 dans les cellules endothéliales H5V au cours de l'angiogenèse

L'étude de la signalisation de PKR1 dans les cellules H5V lors de l'angiogenèse montre que PKR1 est couplé à la protéine $G\alpha_{11}$. L'expression de $G\alpha_{11}$ est réduite de 65% sans modifier l'expression de $G\alpha_q$. Cette diminution de l'expression de $G\alpha_{11}$ dans les cellules H5V inhibe l'angiogenèse stimulée par PK-2. La formation des structures de type capillaire *in vitro* est abolie par des inhibiteurs de PI3K ou de MAPK et ceci malgré l'activation de PKR1 par PK-2. Ces résultats montrent que la stimulation de PKR1 favorise l'angiogenèse *in vitro* via l'activation des protéines kinases Akt et MAPK. On observe par western blot, une augmentation de l'activation des MAPK (Erk1 et Erk2) et Akt après le traitement par PK-2. L'activation de MAPK et Akt est inhibée lorsque l'expression de PKR1 ou l'expression de $G\alpha_{11}$ est réduite et ceci malgré la stimulation des cellules H5V par PK-2.

Ces travaux sur les cellules endothéliales H5V dérivées du cœur démontrent pour la première fois que PKR1 active directement l'angiogenèse *in vitro*. Dans cette lignée cellulaire, le récepteur PKR1 est couplé aux protéines $G\alpha_{11}$ pour activer les voies de signalisation PI3K et MAPK lors de l'angiogenèse.

III – 1. d. Synthèse sur la fonction de PKR1 dans les cellules endothéliales cardiaques



Article 1

« The prokineticin receptor-1 (GPR73) promotes cardiomyocyte survival and angiogenesis. *Faseb J* 21, 2980-2993. (2007) »

Article 2

« Divergent roles of prokineticin receptors in the endothelium: angiogenesis and fenestration. »

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

The prokineticin receptor-1 (GPR73) promotes cardiomyocyte survival and angiogenesis

Kyoji URAYAMA, Célia GUILINI, Nadia MESSADDEQ, Kai HU, Marja STEENMAN, Hitoshi KUROSE, Georg ERT and Canan G. NEBIGIL

The FASEB Journal, 2007, vol. 21, pages 2980-2993

Pages 67-... :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1096/fj.07-8116com>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Divergent Roles of Prokineticin Receptors in the Endothelium: Angiogenesis and Fenestration

Célia Guilini^{1†}, Kyoji Urayama^{1†}, Gulen Turkeri¹, Deniz B. Dedeoglu¹, Hitoshi Kurose²,
Nadia Messaddeq³, and Canan G. Nebigil^{1*}

Running title: Divergent role of PKR1 and PKR2 in endothelium

¹IREBS FRE3211, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)/Université de Strasbourg (UdS), Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Illkirch France,

²Department of Pharmacology and Toxicology, Kyushu University, Fukuoka, Japan

³Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire, Illkirch France

*Address correspondence to Canan G. Nebigil. Ph.D.
ESBS, Bld. Sébastien Brandt BP. 10413, F-67412 Illkirch, France.

Phone: 33 390 24 47 56

Fax: 33 390 24 48 29

canan.nebigil-desaubry@unistra.fr

[†]K.U. and C.G. contributed equally to this work.

Abstract

Prokineticins are secreted peptides that activate two G protein-coupled receptors: PKR1 and PKR2. Prokineticins induce angiogenesis and fenestration, but the cognate receptors involved in these functions are unknown. We hypothesized a role for prokineticin receptor signaling pathways and expression profiles in determining the selective effects of prokineticins on coronary endothelial cells (H5V). Activation of the PKR1/MAPK/Akt signaling pathway stimulates proliferation, migration and angiogenesis in H5V cells, in which PKR1 predominates over PKR2. PKR1 was colocalized with G α 11 and was internalized following the stimulation of these cells with prokineticin-2. Knock-down of PKR1 or G α 11 expression in H5V cells effectively inhibited prokineticin-2-induced vessel formation and MAPK/Akt activation, indicating a role for PKR1/G α 11 in this process. However, in conditions in which PKR2 predominated over PKR1, these cells displayed a fenestrated endothelial cell phenotype. H5V cells overexpressing PKR2 displayed large numbers of multivesicular bodies and caveolar clusters and a disruption of the distribution of ZO-1 tight junction protein. Prokineticin-2 induced the colocalization of PKR2 with G α 12, and activated G α 12, which bound to ZO-1 to trigger the degradation of this protein in these cells. Prokineticin-2 induced the formation of vessel-like structures by human aortic endothelial cells expressing only PKR1, and disorganized the tight junctions in human hepatic sinusoidal endothelial cells expressing only PKR2, confirming the divergent roles of these receptors. Our findings show that the functional characteristics of coronary endothelial cells depend on the expression of PKR1 and PKR2 levels and the divergent

signaling pathways used by these receptors.

Introduction

The prokineticins, prokineticin-1 (also called EG-VEGF) and prokineticin-2 (also called Bv8), belong to the AVIT family of secreted proteins (1). Prokineticins were first identified in the gastrointestinal tract as potent agents mediating muscle contraction (2), and have been isolated from cow's milk (3). They have been shown to be widely distributed in mammalian tissues (4). Prokineticins are potent angiogenic factors (5) also involved in the regulation of hematopoiesis (6), monocyte differentiation (7) macrophage activation (8) and olfactory bulb activation (9, 10), pain sensitization (11, 12), circadian rhythm (13, 14), the coordination of circadian behavior and physiology (15). In addition to their role in angiogenesis, prokineticins seem to be potent survival/mitogenic factors in various cells, including endothelial cells (16), neuronal cells (17), lymphocytes, hematopoietic stem cells and cardiomyocytes (18). Prokineticins exert their biological activities by stimulating two similar G protein-coupled receptors (GPCRs): PKR1 and PKR2 (19). Prokineticin-2 is the most potent agonist of both receptors (20). These receptors are ubiquitously expressed in mammalian tissues (3) including cardiac tissues (18). Their amino-acid sequences are 85% identical but they play very different roles in the heart. The interaction of prokineticin-2 with PKR1 protects cardiomyocytes against hypoxia-induced apoptosis (18). Transient expression of a PKR1 transgene decreases mortality and preserves left ventricular function, by promoting angiogenesis and cardiomyocyte survival, in a mouse model of myocardial infarction (18). Transgenic mice overexpressing PKR1 in cardiomyocytes display postnatal coronary angiogenesis

and vasculogenesis under paracrine regulation (21). However, transgenic mice overexpressing PKR2 in cardiomyocytes display eccentric hypertrophy and vascular leakage under paracrine regulation (22). These data demonstrate the functional importance of prokineticin receptors and show that the PKR1 and PKR2 signaling pathways may have opposite effects in heart.

PKR1 is strongly expressed in endothelial cells of arterioles and vessels, whereas PKR2 is strongly expressed in fenestrated endothelial cells (23). The cell-autonomous functions and signaling pathways of these receptors have not yet been studied in the endothelial cell system. We investigated the divergent functions of prokineticins and the functions of PKR1 and PKR2 signaling and their coupling to G proteins in endothelial cells. We used coronary endothelial cells (H5V), which constitute an excellent model system for studying the role of prokineticin receptors, because they express both PKR1 and PKR2 (21, 22). We confirmed the divergent role of these receptors in human aortic endothelial cells (HAEC) expressing only PKR1 and in human hepatic sinusoidal endothelial cells (HHSEC) expressing only PKR2.

The expression profiles of these receptors and the divergent roles of the signaling pathways they mediate may determine the cell-autonomous phenotypic heterogeneity of endothelial cells. An understanding of these roles may facilitate the development of new treatments targeting PKR1 and PKR2 in cardiovascular diseases.

Materials and Methods

Reagents—Human recombinant prokineticin-2 was purchased from Peprtech (France). Growth factor-reduced Matrigel was obtained from BD Biosciences, and

gelatin and collagen were obtained from Sigma. Antibodies against Akt, phospho-Akt, MAPK and phospho-MAPK, were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA), and antibodies against Gα12, 13, Gαq/11 and caveolin-1 were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Antibodies against ZO-1 (Invitrogen), PKR2 (Abcam) and PKR1 (IGBMC) were also used. Specific inhibitors of PI3K (LY294002) and of members of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family (PD98059) were purchased from Calbiochem.

Cell culture—H5V endothelial cells derived from mouse heart were kindly provided by Dr. Annunciata Vecchi (Istituto Clinico Humanitas, Rozzano, Italy). Human hepatic sinusoidal endothelial cells (HHSEC), provided by Innoprot, were isolated by ScienCell Research Laboratories from human liver. Human aortic endothelial cells (HAEC) were purchased from Invitrogen. Cells were maintained as described in the supplementary data.

Proliferation assay—H5V cells (2×10^4 /well) were used to seed 24-well plates containing Dulbecco's modified Eagle medium, (DMEM) supplemented with 2% FCS and the cells were then incubated with or without prokineticin-2 (1-15 nM) for 1 or 4 days. Cells were counted, in a hemocytometer, at t_0 and t_{1-4} .

Wound healing migration assay—Cells were counted at seeding and equal numbers of cells (7 or 8×10^5 cells per well) were incubated in a six-well plate containing DMEM supplemented with 10% FCS for 24 hours (24). Confluent H5V cells were kept in DMEM supplemented with 2% FCS for 24 hours and were then wounded with a pipette tip and subjected to prokineticin-2 stimulation. Cells at the edge of the wound migrated into the wound, gradually closing it. The wound was photographed within 4 h. The cells

were cultured for an additional 20 hours and then photographed again.

Assessment of the formation of capillary-like structures by endothelial cells— H5V cells or H5V cells transfected with siRNA (for the negative control), PKR1 or G α 11 constructs were used to seed 24-well culture plates coated with Matrigel. The cells were then incubated in the presence or absence of prokineticin-2 for 24 hours (BD Biosciences, Bedford, MA) according to the manufacturer's instructions and as previously described (18) (see supplementary data).

Transfection— H5V cells were transfected with a control plasmid (pcDNA3.1), or with plasmids encoding G α 12, G α 12QL or PKR2, in the presence of Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Cells were stimulated, 48 hours after transfection, with or without 5 nM prokineticin-2, at 37°C, under an atmosphere containing 5% CO₂, for the times indicated. The reaction was stopped by washing twice with cold PBS on ice. The washed cells were used for western blot or immunofluorescence analyses.

siRNA transfection— H5V cells were transfected in siPORT Amine Transfection reagent (Ambion, Austin, TX, USA), with 100 nM siGENOME siRNA for mouse G α 11 (Dharmacon, Lafayette, CO), 100 nM siRNA for the negative control (Ambion siRNA #AM4611) 100 nM siRNA for mouse PKR1 (Ambion siRNA #181827; UAUCAGAUAGUUAACAGCTT) or mouse PKR2 (Ambion siRNA ID# 152628, CAUCCGUGGUUCAAGGGTG), according to the manufacturer's instructions (Ambion) (18) (see supplementary data, Figure I).

Western blot analysis— H5V cells were lysed in lysis buffer. Total protein was separated by SDS-PAGE in 7 or 12% acrylamide gels and blotted onto PVDF membranes. The membrane was blocked and incubated with primary antibodies. It was

then incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary immunoglobulins. The signal was then detected by enhanced chemiluminescence (Pierce), according to the manufacturer's protocol (see supplementary data)

Immunoprecipitation with anti-Gα12 antibody—H5V cells growing in a 10 cm dish were starved of serum (only 2% serum in the medium) overnight and stimulated with prokineticin-2 (5 nM) at 37°C for the time indicated. The reaction in stimulated H5V cells were stopped by washing with cold PBS on ice and the cells were then lysed in lysis buffer. The lysates were cleared by centrifugation at 15,000 g for 20 minutes. Total protein concentration was adjusted and, 32 h later, the lysates were precleared on Protein A/G PLUS Agarose (Santa Cruz biotechnology) for 30 minutes at 4°C. Gα12 proteins were immunoprecipitated from the precleared lysates by incubation with 2 μg/ml anti - Gα12 or anti-ZO-1 antibody followed by 20 μl of Protein A/G agarose. The agarose beads were washed three times with lysis buffer, boiled in SDS-PAGE loading buffer, and subjected to SDS-PAGE and immunoblotting (25).

Measurement of Gα12 activity - We investigated Gα12 activity in H5V cells cotransfected with constructs encoding constitutively active Gα12QL or Gα12 and PKR2, using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The transfected cells were stimulated by incubation with 5 nM prokineticin-2 for the times indicated, and the supernatant was incubated with 5 μg of GST-TPR and glutathione-Sepharose beads overnight at 4°C. The beads were washed with ice-cold lysis buffer and the bound proteins were eluted in Laemmli sample buffer and analyzed by

SDS-PAGE and immunoblotting with anti-G α 12 antibody (26). Densitometric analyses were performed with NIH Image software (see supplementary data).

Immunofluorescence and microscopy—Immunofluorescence analysis was performed on H5V cells, as previously described (21). Fluorescent signals were visualized and photographed with a Leica microscope equipped with a digital camera. In some of the confocal microscopy analyses, signal intensity was quantified on digitized images, as the product of averaged pixel intensity per unit area. Densitometric analysis was carried out with LEICA software. The laser was selected according to the sample and was used to compare pixel intensity and pixel distribution. We analyzed these data, using pixel data from which background intensity had been subtracted (18).

Statistical analysis—Data are expressed as means \pm SEM. Multigroup comparisons were performed by one-way ANOVA with post hoc correction. Comparisons between pairs of groups were made with the unpaired Student's t test. For all analyses, $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Prokineticin-2 enhances endothelial cell proliferation and migration

We investigated the possible mechanisms underlying the direct angiogenic effects of prokineticin-2 on endothelial cells, by analyzing the effects of prokineticin-2 on the major steps of angiogenesis *in vitro*: endothelial cell proliferation, and migration. We investigated the possible effects of prokineticin-2 on the rate of proliferation of H5V cells, by counting cells four days after treatment with various concentrations of prokineticin-2 (Fig. 1A). Cell numbers were maximal at a prokineticin-2 concentration of

5 nM, for cell counts on both days 1 and 4 ($p^* < 0.05$, Fig. 1B). No mitogenic effect of prokineticin-2 was seen in cells previously treated with a neutralizing antibody against PKR1 (18), (Fig. 1B). Prokineticin-2-mediated the stimulation of endothelial cell proliferation was completely abolished by knocking down PKR1 expression in H5V cells (siRNA-PKR1), (Fig. 1B). However, knocking down PKR2 expression in H5V cells (siRNA-PKR2) had no effect on prokineticin-2-mediated proliferation (Fig. 1B), consistent with the involvement of PKR1, but not of PKR2.

We investigated the involvement of prokineticin-2 in inducing endothelial cell migration, by carrying out a wound-healing assay. Prokineticin-2 treatment significantly increased the level of cell migration, within 24 h (Fig. 1C upper panel). The motogenic effect of prokineticin-2 was not seen in cells previously treated with the neutralizing antibody against PKR1 or in siRNA-PKR1 cells (Fig. 1D lower panel), consistent with the involvement of PKR1. However, prokineticin-2-mediated motogenic effect was not affected by knocking down the expression of PKR2 in siRNA-PKR2 cells (Fig. 1D upper panel).

Prokineticin-2/PKR1 signaling promotes vessel-like formation: involvement of kinases

We have previously shown that the activation or overexpression of PKR1 induces vessel-like formation in Matrigel, used as an *in vitro* model of angiogenesis (18). We investigated the downstream signaling pathway for prokineticin-2/PKR1 induced vessel-like formation by H5V cells, by initially treating cells with specific inhibitors of various kinases, along with prokineticin-2. Inhibitors of PI3K (LY294002) and MAPK kinase-1 (PD98059) significantly inhibited the formation of vessel like structures in response to

prokineticin in Matrigel (Fig. 2A). In light of these findings, suggesting that the PI3K/Akt and MAPK signaling pathways play a critical role in the prokineticin-2-induced formation of vessel-like structures by H5V cells, we further investigated the activation of these pathways. Prokineticin-2 induced Akt phosphorylation, within 1 minute ($p^* < 0.05$, Fig. 2B upper panel). It also induced phosphorylation of the ERK1 and ERK2 kinases within 1 minute ($p^* < 0.05$, Fig. 2B lower panel). We investigated the role of PKR1, by carrying out similar experiments with the siRNA-PKR1 cells. Knocking down PKR1 expression in H5V cells abolished the effects of prokineticin-2 on Akt and MAPK phosphorylation, indicating PKR1 involvement (Fig. 2C and 2D).

PKR1 binds Gαq/11 to promote angiogenesis in H5V cells

We then investigated whether the classic Gαq/11 signaling axis mediated the endothelial cell activity. We assessed the colocalization of Gαq/11 (red) and PKR1 (green) in H5V cells by confocal microscopy. In resting cells, both PKR1 and Gαq/11 were diffusely distributed in the cytosol. After PKR1 activation, some colocalization of PKR1 and Gαq/11 was observed at the tips and bases of membrane protrusions (Fig. 3A middle panel). Confocal analyses revealed that staining for Gαq/11 and PKR1 overlapped within one minute of the prokineticin-2 treatment of cells. PKR1 was completely internalized within five minutes of PKR1 activation (Fig. 3A lower panel).

We addressed the involvement of Gαq/11 signaling in PKR1-mediated angiogenesis, by knocking down Gα11 expression in H5V cells. Surprisingly, knocking down Gα11 expression in H5V cells abolished the prokineticin-2-mediated formation of vessel-like

structures (Fig 3B). It also significantly inhibited prokineticin-2-mediated MAPK and Akt activation, consistent with the binding of PKR1 specifically to G α 11 to activate MAPK and Akt (Fig 3C).

PKR2 signaling does not induce angiogenesis in vitro

We then altered the ratio of PKR2 to PKR1 in H5V cells, by overexpressing PKR2. We investigated whether PKR2 overexpression in H5V (H5V-PKR2) cells could induce angiogenesis *in vitro*. In H5V-PKR2 cells, PKR2 transcript and protein levels were increased 3 and 1.8 times higher, respectively, than those in H5V cells ($p^* < 0.05$). H5V-PKR2 cells were placed in Matrigel for 24 h, and the formation of vessel-like structures was quantified. The overexpression of PKR2 or stimulation with prokineticin-2 did not result in any vessel-like structures similar to those seen in cells transfected with the positive control vector (H5V-control; Fig. 4A). Thus, PKR2 overexpression, unlike PKR1 overexpression, does not trigger angiogenic signaling in H5V cells.

PKR2 signaling increases the formation of caveolin clusters and vesicle trafficking in the endothelial cells

H5V-PKR2 cells had a morphology different from that of H5V-control cells (Fig. 4B). H5V-PKR2 cells were rounder, with visible vacuoles in the cytoplasm. PKR1 overexpression did not induce fenestration of the endothelial cells, ruling out the possibility of a transfection- or overexpression-dependent effect of PKR2 in H5V-PKR2 cells. We then investigated whether PKR2 signaling in endothelial cells impaired function and led to the pathologic fenestration of endothelial cells. Electron microscopy

showed that H5V-PKR2 cells had larger numbers of lysosomes, multivesicular bodies, phagolysosomes and clathrin-coated endocytotic vesicles, and vesiculo-vacuolar permeability organelles typical of fenestrated endothelial cells (27) (Fig. 4C and D). H5V-PKR2 cells displayed prominent caveolin-1-positive aggregates in their cytoplasm, particularly around the nucleus (Fig. 4E). Western blot analyses confirmed the presence of larger amounts of caveolin-1 in the H5V-PKR2 cells ($p^* < 0.05$, Fig. 4F). These studies suggest that PKR2 overexpression in H5V endothelial cells resulted in a phenotype more like that of fenestrated endothelial cells.

PKR2 binds G α 12 in H5V cells

As PKR1 and PKR2 are 85% identical but have different effects in endothelial cells, we investigated the possibility of binding to different G proteins for PKR2. In resting cells, both PKR2 (red) and G α 12 (green) were diffusely distributed throughout the cytosol. One minute after the treatment of H5V-PKR2 cells with prokineticin-2, confocal analyses demonstrated the colocalization of G α 12 with PKR2 (Fig. 5A). PKR2 was fully internalized after 1 minute of prokineticin-2 treatment. Similar results were obtained following the activation of endogenous PKR2 by prokineticin-2.

GST-TPR pulldown assays of activated G α 12 showed that prokineticin-2 activated G α 12 within one minute, this activation lasting from 5 to 10 min in H5V cells (Fig. 5B left). As expected, we detected a robust activation of G α 12 by prokineticin-2 treatment in H5V-PKR2 cells similar to that observed with the constitutively active form of G α 12, G α 12QL expressing cells (Fig. 5B right).

Prokineticin treatment leads to the association of Ga12 with ZO-1, altering the distribution of ZO-1 in H5V cells

Gα12 has been shown to associate with the ZO-1 junctional protein to regulate the cell permeability (28). We therefore investigated whether prokineticin-2 induced the association of Gα12 with ZO-1 and regulated the distribution or expression of ZO-1. ZO-1 was co-immunoprecipitated with Gα12, five minutes after prokineticin-2 treatment. (Fig. 6A). Moreover, the ZO-1 protein was internalized within 10 minutes of prokineticin-2 treatment of the H5V-PKR2 cells (Fig. 6B). Western blot analyses on cell lysates from H5V-PKR2 cells confirmed that H5V-PKR2 cells had lower levels of ZO-1 than controls within 24 hours (Fig. 6C).

Divergent roles of PKR1 and PKR2 receptors in human endothelial cells

Human primary aortic endothelial cells (HAEC) express only PKR1, whereas human hepatic sinusoidal endothelial cells (HHSEC) express only PKR2. Both receptors are present in human explanted heart samples (HEHS; Figure 7A). HAEC stimulation with prokineticin-2 induced the formation of vessel-like structures in Matrigel (Figure 7B). The prokineticin-2 treatment of HHSEC led to the internalization of ZO-1 protein within 60 minutes and the disruption of cell organization, resulting in a clear punctate pattern of staining for ZO-1 (Figure. 7C). These data clearly highlight the divergent roles of the two prokineticin receptors in human endothelial cells as a function of their expression profiles.

Discussion

There is evidence to suggest that there is structural and functional heterogeneity in the endothelial cells of the vascular and microvascular beds of various organs that may be altered by pathological conditions (27). Current knowledge about the regulation of coronary endothelial cell structure and functional integrity is still fragmentary. Here we showed that a balance between PKR1 and PKR2 expression, and their coupling to different G protein signaling pathways could be particularly important for regulation of the coronary endothelial structure and function. The prokineticin receptors have been shown to be coupled to different G proteins. Ca^{2+} mobilization and phosphoinositide turnover by prokineticins may be consistent with coupling to $G\alpha_q/11$. Prokineticins have also been shown to induce cAMP accumulation in cells overexpressing prokineticin receptors (19). The involvement of $G\alpha_i/o$ proteins in prokineticin signaling has also been suggested (29). The functional significance of the interactions between prokineticin receptors and their cognate G proteins remains unclear in the endothelial cells.

We report here the divergent roles of PKR1 and PKR2, possibly due to their coupling to different G proteins, defining the functional heterogeneity of endothelial cells. We found that the activation of endogenously high levels of PKR1 in H5V coronary endothelial cells or the overexpression of PKR1 in these cells promoted the formation of vessel-like structures. However, in conditions in which PKR2 predominated over PKR1, these cells displayed a fenestrated endothelial cell phenotype. Prokineticin-2-mediated angiogenesis resulted principally from the stimulation of endothelial cell proliferation and migration, both of which were completely abolished by prior treatment of the cells

with a neutralizing antibody against PKR1 or by knocking down PKR1 expression in H5V cells. We previously showed that the overexpression of PKR1 in H5V cells in the absence of the ligand of this receptor promoted angiogenesis *in vitro* (18), consistent with a role for PKR1 in this process. Our findings indicate that MAPK and PI3K are involved in the prokineticin-mediated angiogenesis signaling pathway, because prokineticin-2 activated MAPK and Akt kinase, and prokineticin-2/PKR1-mediated formation of vessel-like structures was inhibited by pharmacological inhibitors of these kinases. Our findings are consistent with those of previous studies showing that prokineticin activates MAPK in steroidogenic adrenocortical cells (30) and enteric neural crest cells (17) and induces the PI3K pathway to promote the survival of neuroblastoma cells (31). In this study, we found that G α 11 colocalized with PKR1 and that the knocking down of G α 11 expression abolished PKR1-mediated angiogenesis and the activity of MAPK and Akt in H5V cells.

Heterotrimeric G proteins regulate fundamental endothelial cell properties, interacting with structural proteins. G α q/11 proteins have shown to be involved in endothelial cell proliferation rather than fenestration, via the tyrosine phosphorylation of VEGFR-2 in HUVEC cells (32). A number of G α q/11-coupled receptors have been shown to play a role in angiogenesis (33). For example, the activation of thrombin (34) or angiotensin II receptors (35) regulates microcapillary endothelial cell activation to induce angiogenesis. By interacting with G α q/11-coupled receptors, oxytocin stimulates the phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) via the phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3-K)/AKT pathway, thereby promoting migration and angiogenesis in HUVEC cells (36). We provide here the first demonstration of a direct role of G α 11 signaling in PKR1-

mediated angiogenesis.

It has recently been shown that PKR2 is strongly expressed in fenestrated endothelial cells, such as those found in the endocrine glands (37), corpus luteum, kidney, and liver (38), indicating the possible involvement of PKR2 in endothelial cell fenestration (23). We provide here the first evidence that the overexpression of PKR2 in H5V cells, conferring a phenotype more like that of fenestrated endothelial cells, increases endothelial subcellular injury levels, thereby increasing cell permeability. The overexpression of PKR2, unlike that of PKR1, did not induce angiogenesis *in vitro* in H5V cells. PKR2 overexpression increased the formation of vesiculo-vacuolar permeability organelles and caveolae, -small invaginations of the plasma membrane facilitating the vesicular transport of small proteins through the cytoplasm of an individual endothelial cell, thereby increasing the transcellular permeability of H5V cells. PKR2 signaling leads to an abnormal organization of endothelial cells and the disconnection of cells, through effects on the cell-cell adhesion molecule ZO-1 at tight junctions. Through G α 12-ZO-1 protein interactions, PKR2 may regulate the paracellular permeability between cells (39). An additional role has also recently been described for G α 12 signaling, in increasing permeability and tight junctional disassembly via interaction with ZO-1 in MDCK cells (40). We provide here the first demonstration that PKR2 signaling is involved in the activation of G α 12, which then interacts with ZO-1, thereby downregulating ZO-1-mediated cell-cell adhesion.

The divergent roles of prokineticin-2 action via these two receptors were evident in two different types of cell, each expressing only one of the receptors. In HAEC, which express only PKR1, prokineticin-2 induced angiogenesis. In HHSEC, which express only

PKR2, prokineticin-2 promoted cellular disorganization through changes in the distribution of ZO-1.

In conclusion, our data provide *in vitro* evidence that two highly similar GPCRs have divergent endothelial cell functions due to their coupling to two different G proteins for signaling. It is unclear how representative H5V cells are of the coronary endothelium *in vivo*, but our findings indicate that prokineticin receptor expression profile may determine the selective effects of prokineticins on coronary endothelial cells, favoring endothelial cell barrier dysfunction or compensatory angiogenesis during myocardial infarction. In samples from humans with end-stage heart failure, a specific decrease in PKR1 levels has been observed (18). PKR1/PKR2 levels in cardiovascular diseases remain to be investigated. Our study should facilitate the discovery of specific agonists and antagonists targeting PKR1 and PKR2 for possible use in the treatment of cardiovascular diseases.

Acknowledgments

We would like to thank Pascal Dolle for critical reading and discussion. We also wish to thank Mihaela Enashe for technical assistance.

Grants

K.U. is supported by fellowships from JSPS and Fondation de Lalande, CG is supported by the CNRS, GT by Egide, and DBD is supported by Istanbul University. This work

was supported by grants from the CNRS, *Fondation France*, *Association pour la Recherche sur le Cancer*, and *Association Francaise contre les Myopathies* (to CGN).

Disclosures: None

References

1. Kaser A, Winklmayr M, Lepperdinger G and Kreil G (2003) The AVIT protein family. Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions. *EMBO Rep.* **4**:469-473.
2. Li M, Bullock, CM, Knauer, DJ, Ehlert FJ, and Zhou QY (2001) Identification of two prokineticin cDNAs: recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. *Mol Pharmacol.* **59**: 692-698.
3. Masuda Y, Takatsu Y, Terao Y, Kumano S, Ishibashi Y, Suenaga M, Abe M, Fukusumi S, Watanabe T, Shintani Y, Yamada T, Hinuma S, Inatomi N, Ohtaki T, Onda H, and Fujino M (2002) Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* **293**:396-402.
4. Bullock CM, Li JD, Zhou QY (2003) Structural determinants required for the bioactivities of prokineticins and identification of prokineticin receptor antagonists. *Mol Pharmacol.* **65**:582-588.
5. LeCouter J, Lin R, Tejada M, Frantz G, Peale F, Hillan KJ and Ferrara N (2003) The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: Localization of Bv8 receptors to endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **100**:2685-2690.
6. Le Couter J, Zlot C, Tejada M, Peale F and Ferrara N (2004) Bv8 and endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization. *Proc Natl Acad Sci USA.* **101**:16813-16818.

7. Dorsch M, Qiu Y, Soler D, Frank N, Duong T, Goodearl A, O'Neil S, Lora J, Fraser CC. PK1/EG-VEGF induces monocyte differentiation and activation. *J Leukoc Biol.* 2005;**78**:426-434.
8. Martucci C, Franchi S, Giannini E, Tian H, Melchiorri P, Negri L and Sacerdote P (2006) Bv8, the amphibian homologue of the mammalian prokineticins, induces a proinflammatory phenotype of mouse macrophages. *Br J Pharmacol.* **147**:225-234.
9. Ng KL, Li JD, Cheng MY, Leslie FM, Lee AG and Zhou QY (2005) Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science.* **308**:1923-1927.
10. Matsumoto S, Yamazaki C, Masumoto KH, Nagano M, Naito M, Soga T, Hiyama H, Matsumoto M, Takasaki J, Kamohara M, Matsuo A, Ishii H, Kobori M, Katoh M, Matsushime H, Furuichi K, Shigeyoshi Y. (2006) Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. *Proc Natl Acad Sci USA.* **103**:4140-4145.
11. Negri L, Lattanzi R, Giannini E, Colucci M, Margheriti F, Melchiorri P, Vellani V, Tian H, De Felice M and Porreca F (2006) Impaired nociception and inflammatory pain sensation in mice lacking the prokineticin receptor PKR1: focus on interaction between PKR1 and the capsaicin receptor TRPV1 in pain behavior. *J Neurosci.* **26**:6716-6727.
12. Hu WP, Zhang C, Li JD, Luo ZD, Amadesi S, Bunnett N and Zhou QY (2006) Impaired pain sensation in mice lacking prokineticin 2. *Mol Pain.***2**:35-39.

13. Cheng MY, Bullock CM, Li C, Lee AG, Bermak JC, Belluzzi J, Weaver DR, Leslie FM, and Zhou QY (2002) Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature*. **417**:405-410.
14. Li JD, Hu WP, Boehmer L, Cheng MY, Lee AG, Jilek A, Siegel JM and Zhou QY (2006) Attenuated circadian rhythms in mice lacking the prokineticin 2 gene. *J Neurosci*. **26**:11615-11623.
15. Prosser HM, Bradley A, Chesham JE, Ebling FJ, Hastings MH and Maywood ES (2007) Prokineticin receptor 2 (Prokr2) is essential for the regulation of circadian behavior by the suprachiasmatic nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA*. **104**:648-653.
16. Kisliouk T, Podlovni H, Spanel-Borowski K, Ovadia O, Zhou QY and Meidan R (2005) Prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and BV8) in the bovine ovary: expression and role as mitogens and survival factors for corpus luteum-derived endothelial cells. *Endocrinology*. **146**:3950-3958.
17. Ngan ES, Lee KY, Sit FY, Poon HC, Chan JK, Sham MH, Lui VC, and Tam PK (2007) Prokineticin-1 modulates proliferation and differentiation of enteric neural crest cells. *Biochim Biophys Acta* . **1773**:536-545.
18. Urayama K, Guilini C, Messaddeq N, Hu K, Steenman M, Kurose H, Ert G and Nebigil CG. The prokineticin receptor-1 (GPR73) promotes cardiomyocyte survival and angiogenesis. *FASEB J*. **21**:2980-2993.
19. Lin DC, Bullock CM, Ehlert FJ, Chen JL, Tian H and Zhou QY (2002) Identification and molecular characterization of two closely related G protein-

- coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* **277**:19276-19280.
20. Soga T, Matsumoto S, Oda T, Saito T, Hiyama H, Takasaki J, Kamohara M, Ohishi T, Matsushime H and Furuichi K (2002) Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochim Biophys Acta.* **1579**:173-179.
21. Urayama K, Guilini C, Turkeri G, Takir S, Kurose H, Messaddeq N, Dierich A and Nebigil CG (2008) Prokineticin receptor-1 induces neovascularization and epicardial-derived progenitor cell differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **28**:841-849.
22. Urayama K, Dedeoglu DB, Guilini C, Frantz S, Ertl G, Messaddeq N and Nebigil CG (2009) Transgenic myocardial overexpression of prokineticin receptor-2 (GPR73b) induces hypertrophy and capillary vessel leakage. *Cardiovasc Res.* **81**:28-37.
23. Podlovni H, Ovadia O, Kisliouk T, Klipper E, Zhou QY, Friedman A, Alfaidy N and Meidan R (2006) Differential expression of prokineticin receptors by endothelial cells derived from different vascular beds: a physiological basis for distinct endothelial function. *Cell Physiol Biochem.* **18**:315-326.
24. Mahadev K, Wu X, Donnelly S, Ouedraogo R, Eckhart AD and Goldstein BJ (2008) Adiponectin inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration of human coronary artery endothelial cells. *Cardiovasc Res.* **78**:376-384.
25. Meyer TN, Schwesinger C and Denker BM (2002) Zonula occludens-1 is a scaffolding protein for signaling molecules. Galpha(12) directly binds to the Src

- homology 3 domain and regulates paracellular permeability in epithelial cells. *J Biol Chem.* **277**:24855-24858.
26. Yamaguchi Y, Katoh H, Mori K and Negishi M (2002) Galpha(12) and Galpha(13) interact with Ser/Thr protein phosphatase type 5 and stimulate its phosphatase activity. *Curr Biol.* **12**:1353-8.
27. Aird WC (2007) Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res.* **100**:174-90.
28. Meigs TE, Fields TA, McKee DD and Casey PJ (2001) Interaction of Galpha 12 and Galpha 13 with the cytoplasmic domain of cadherin provides a mechanism for beta -catenin release. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**:519-524.
29. Chen J, Kuei C, Sutton S, Wilson S, Yu J, Kamme F, Mazur C, Lovenberg T, Liu C . (2005) Identification and pharmacological characterization of prokineticin 2 beta as a selective ligand for prokineticin receptor 1. *Mol Pharmacol* **67**:2070-2076.
30. Keramidas M, Faudot C, Cibiel A, Feige JJ and Thomas M (2008) Mitogenic functions of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bombina variegata 8 on steroidogenic adrenocortical cells. *J Endocrinol.* **196**:473-482.
31. Ngan ES, Sit FY, Lee K, Miao X, Yuan Z, Wang W, Nicholls JM, Wong KK, Garcia-Barcelo M, Lui VC and Tam PK (2007) Implications of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 signaling in human neuroblastoma progression. *Clin Cancer Res.* **13**:868-75.

32. Zeng H, Zhao D and Mukhopadhyay D (2002) KDR stimulates endothelial cell migration through heterotrimeric G protein Gq/11-mediated activation of a small GTPase RhoA. *J Biol Chem.* **277**:46791-46798.
33. Richard DE V-CV and Pouyssegur J (2001) Angiogenesis and G protein-coupled receptors: signals that bridge the gap. *Oncogene.* **20**:1556-62.
34. McLaughlin JN, MM, Cleator JH, Earls L, Perdigoto AL, Brooks JD, Muldowney JA 3rd, Vaughan DE and Hamm HE (2005) Thrombin modulates the expression of a set of genes including thrombospondin-1 in human microvascular endothelial cells. *J Biol Chem.* **280**:22172-80.
35. Fujiyama S MH, Nozawa Y, Maruyama K, Mori Y, Tsutsumi Y, Masaki H, Uchiyama Y, Koyama Y, Nose A, Iba O, Tateishi E, Ogata N, Jyo N, Higashiyama S and Iwasaka T (2001) Angiotensin AT(1) and AT(2) receptors differentially regulate angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis by modulating heparin binding-epidermal growth factor (EGF)-mediated EGF receptor transactivation. *Circ Res.* **88**:22-9.
36. Cattaneo MG, Chini B, and Vicentini LM (2008) Oxytocin stimulates migration and invasion in human endothelial cells. *Br J Pharmacol.* **153**:728-736.
37. LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, Frantz G, Rangell L, DeGuzman L, Keller GA, Peale F, Gurney A, Hillan KJ and Ferrara N (2001) Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature.* **412**:877-884.
38. Monnier J, Piquet-Pellorce C, Feige JJ, Musso O, Clement B, Turlin B, Theret N and Samson M (2008) Prokineticin 2/Bv8 is expressed in Kupffer cells in liver

and is down regulated in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* **214**:1182-1191.

39. Weis SM and Cheresh DA (2005) Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature.* 437:497-504.
40. Sabath E, Negoro H, Beaudry S, Paniagua M, Angelow S, Shah J, Grammatikakis N, Yu AS and Denker BM (2008) Galpha12 regulates protein interactions within the MDCK cell tight junction and inhibits tight-junction assembly. *J Cell Sci.* **121**:814-824.

Figure legends

Figure 1. A) Proliferation rate of coronary endothelial cells (H5V) 4 days after treatment with prokineticin-2 (PK-2) at various concentration (n=3, * shows $p < 0.05$). **B)** Treatment with 5 nM PK-2 resulted in the largest increase in cell number on days 1 and 4. PK-2-mediated cell proliferation (4 days) was completely abolished in H5V cells treated with the neutralizing anti-PKR1 antibody or in which PKR1 expression was knocked down, but not in cells in which PKR2 expression was knocked down. **C)** Migration assays 4 and 24 hours after the PK-2 (5 nM) treatment of H5V cells. The discontinuous line (limit of the blue marker) shows area from which cells were scraped at the time zero. PK-2 induces cell migration within 24 h (upper panel). Prior treatment of the cells with neutralizing antibody against PKR1 completely inhibits PK-2-mediated cell migration (n=3, lower). **D)** PK-2 induced migration in siRNA-PKR2-transfected cells (upper panel), but had no effect in siRNA-PKR1-transfected cells (lower). Red arrows show the migrating cell distances between the edges of the wound cells (discontinuous line) at the wound edge (time zero) migrated into the wound (time 4 h), closing it over time (24h after PK-2 treatment).

Figure 2. A) Representative demonstration of the formation of vessel-like structures by H5V cells. We observed the formation of vessel-like structures 24 h after treatment of the H5V cells with prokineticin-2 (PK-2, 5 nM), whereas no such structures were induced in untreated cells (vehicle; n=4, $p < 0.001$). Original magnification=X10. The PK-2-induced formation of vessel-like structures was completely abolished by inhibitors of PI3 kinase (LY294002, middle panel) and MAPK (PD98059, lower panel). **B)** Relative intensity of phosphorylated versus total Akt and MAPK protein signals in the presence of PK-2 (5 nM). Western blot analysis revealed that

the PK-2 treatment of H5V cells increased the amounts of the phosphorylated forms of Akt (56 kDa, upper panel) and MAPK (42/44 kDa lower panel) without altering total Akt and MAPK protein levels (n=3, p < 0.05). **C)** Representative PK-2-mediated Akt activation detected by an antibody recognizing phosphorylated Akt within 1 minute and completely abolished by knocking down PKR1 expression in siRNA-PKR1 cells. **D)** Representative PK-2-mediated MAPK activation detected by an antibody recognizing phosphorylated ERK1 (42) and ERK2 (44) within 5 minutes. This activation was completely abolished by knocking down PKR1 expression in H5V cells (siRNA-PKR1).

Figure 3. A) Localization of PKR1 (green) and Gαq/11 (red) in the H5V cells before and after PK-2 treatment at the indicated times. The cell nuclei are stained with DAPI (blue;n=3). PKR1 and Gαq/11 staining overlapped 1 minute after the PK-2 treatment of the cells (yellow). **B)** Representative demonstration of the formation of vessel-like structures in response to PK-2 in H5V cells transfected with the siRNA negative control (nc) or siRNA-Gα11. The formation of vessel-like structures (upper panel) was observed 24 h after the treatment of siRNA-nc-transformed H5V cells with prokineticin-2 (PK2, 5 nM). Knocking down Gα11 expression in H5V cells completely abolished the formation of vessel-like structures induced by PK-2 (lower panel). Original magnification=X2.5. **C)** Quantitative analyses of PK-2-mediated Akt (upper) and MAPK (lower) activation, based on detection with an antibody recognizing phosphorylated forms of the proteins in the siRNA negative control (nc) and in the siRNA-Gα11 cells (pink lines).

Figure 4. **A)** Formation of vessel-like structures in Matrigel by H5V cells transfected with control vector (H5V-control) alone or vector carrying PKR2 cDNA (H5V-PKR2). No formation of vessel-like structures was observed in H5V-PKR2 cells upon treatment with prokineticin-2 (PK-2). Original magnification =X10. **B)** H5V-PKR2 cells were morphologically different to H5V-control cells. Original magnification =X20. **C)** Electron microscopy of H5V cells transfected with plasmid-control (H5V-control) or plasmid carrying PKR2 cDNA (H5V-PKR2). **D)** H5V-PKR2 cells contained larger numbers of lysosomes (lys), multivesicular bodies (mvb), phagolysosomes (phlys) and clathrin-coated endocytotic vesicles (ccev). **E)** H5V-PKR2 cells have larger numbers of caveolin-1 clusters in the cytoplasm, as detected by immunostaining with caveolin-1-specific antibody. **F)** Western blot analyses showed that cells overexpressing PKR2 contained significantly larger amounts of caveolin-1 (histogram).

Figure 5. **A)** Localization of PKR2 (red) and G α 12 (green) in H5V-PKR2 cells before and after PK-2 treatment at the indicated times. Cell nuclei are stained with DAPI (blue; n=3). PKR2 and G α 12 staining overlapped, with internalization occurring within 1 minute of the PK-2 treatment of H5V-PKR2 cells. **B)** Relative G α 12 activity, detected by GST-TPR pull-down assay in cells cotransfected with H5V plasmid (left) or H5V PKR2 (right) and constructs encoding G α 12 or its constitutively active form, G α 12QL, after PK-2 treatment at the indicated times.

Figure 6. **A)** Co-immunoprecipitation of G α 12 and ZO-1. The H5V-control and H5V-PKR2 cells were stimulated, as indicated, with prokineticin-2 (5 nM) and subjected to immunoprecipitation with the anti-G α 12 antibody. The immunoprecipitated G α 12 was

immunoblotted with antibodies against $G\alpha_{12}$ or ZO-1. **B)** Representative demonstration of the internalization of ZO-1 protein in H5V-PKR2 cells 10 minutes after treatment with prokineticin-2. **C)** Quantitative analyses of ZO-1 expression in H5V-control and H5V-PKR2 cells, shown as a histogram.

Figure 7. **A)** RT-PCR analyses of PKR1, PKR2 and GAPDH (G) expression on human aortic endothelial cells (HAEC), human explanted heart samples (HEHS), and human hepatic sinusoidal endothelial cells (HHSEC). **B)** PK-2 induces the formation of vessel-like structures by HAEC expressing PKR1 in Matrigel. **C)** However, in PKR2-expressing HHSEC, treatment with PK-2 induces ZO-1 internalization and cellular disorganization within 60 minutes.

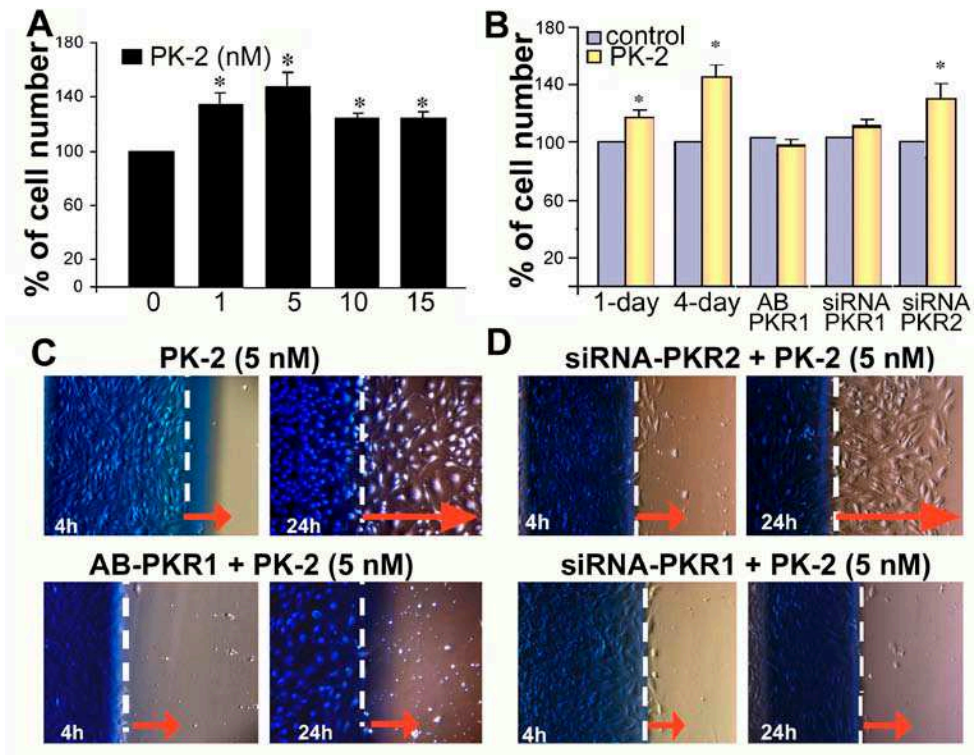


Figure 1.

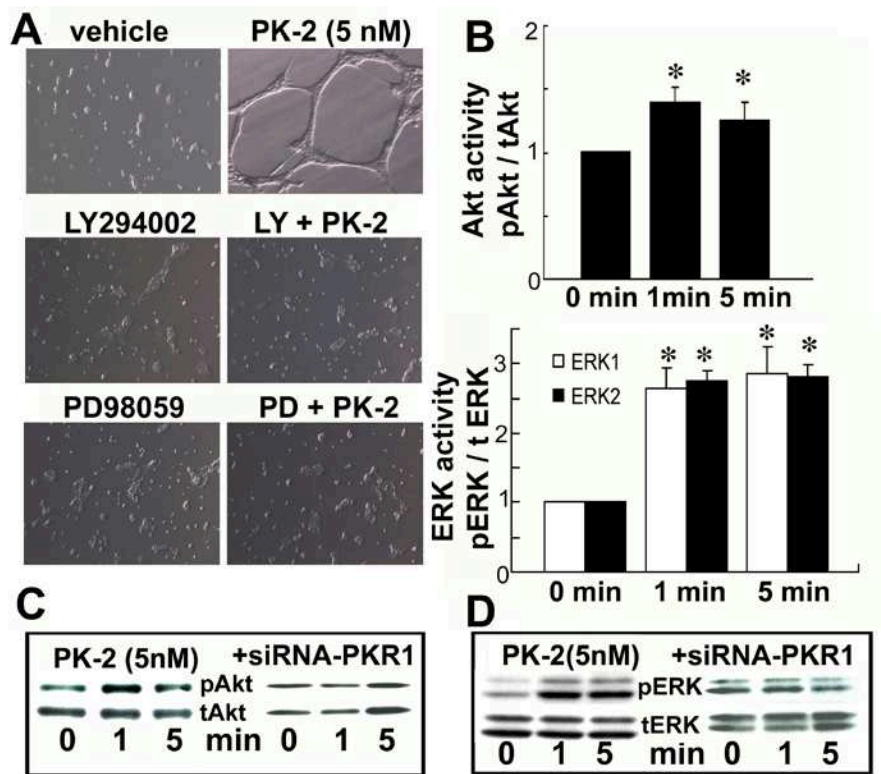


Figure 2.

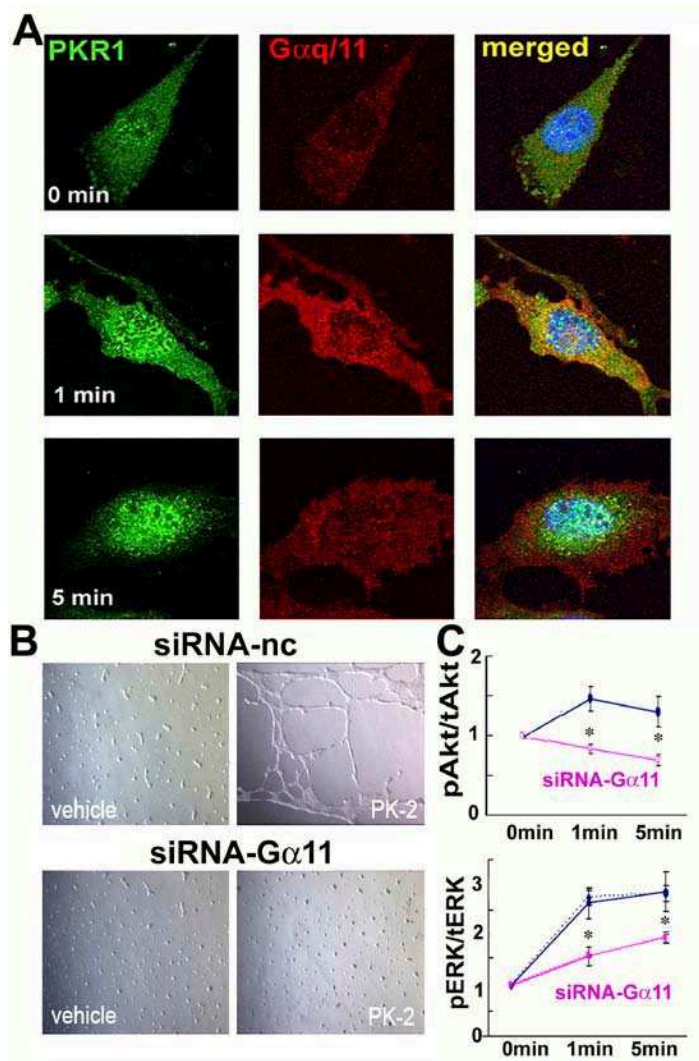


Figure 3.

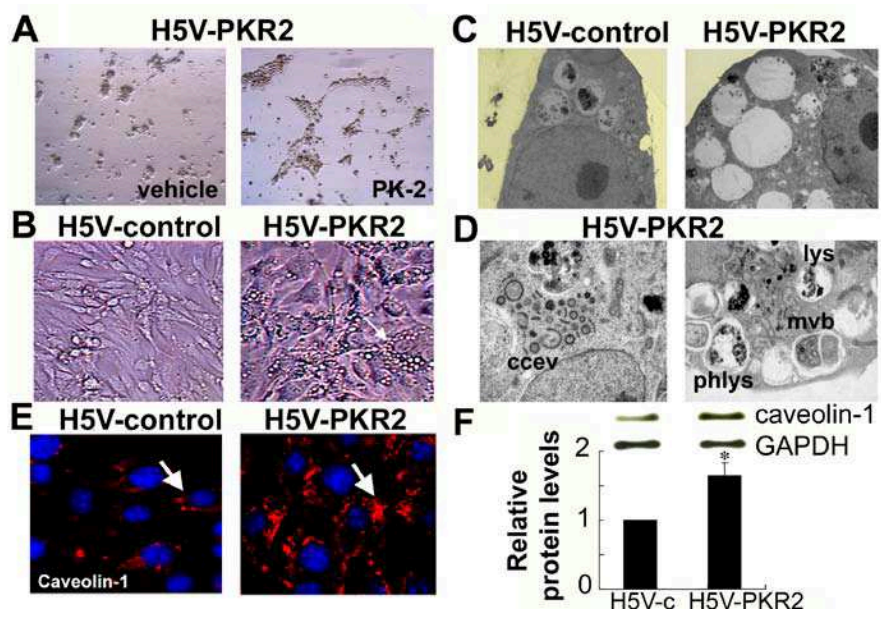


Figure.4

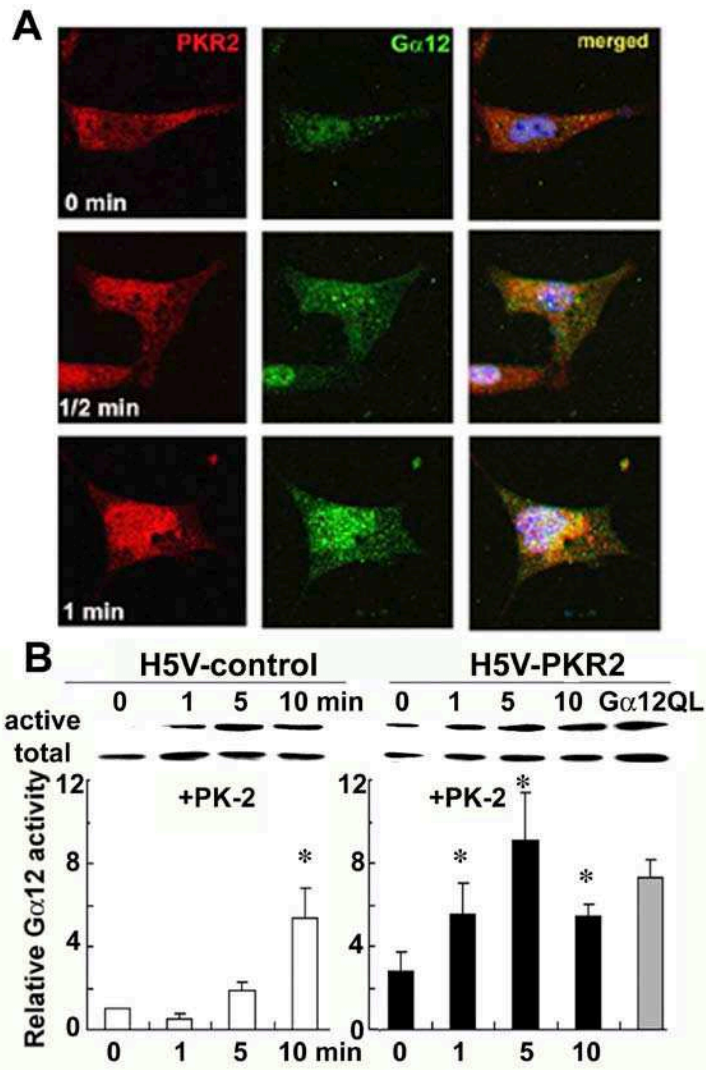


Figure 5.

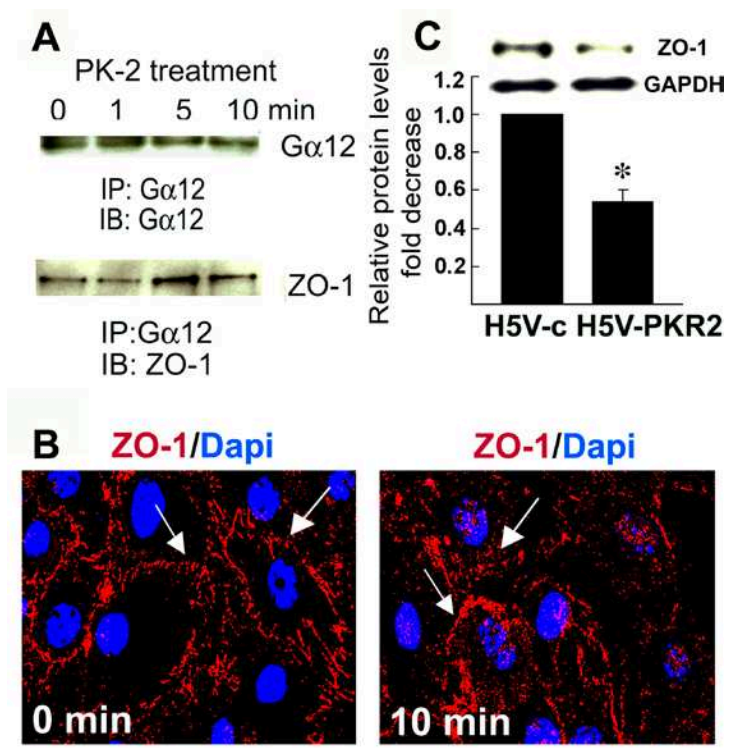


Figure 6.

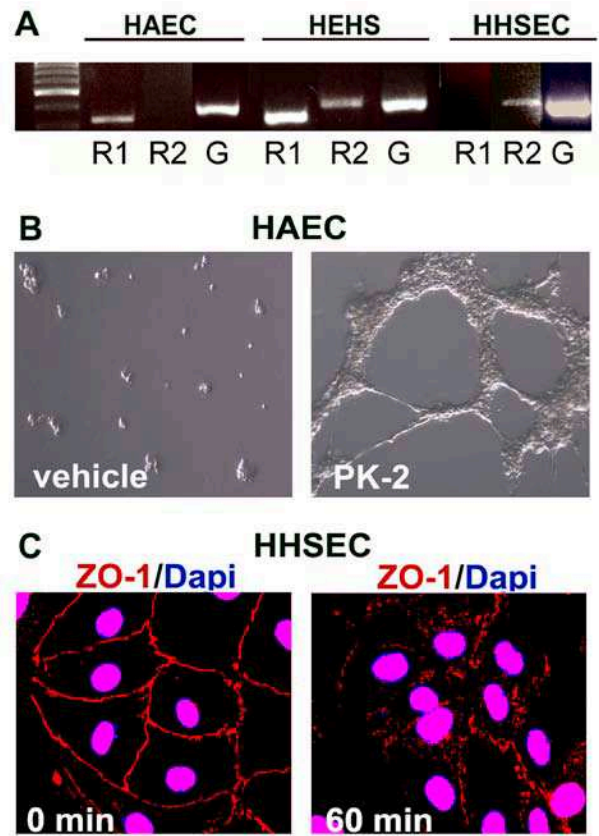


Figure 7.

Supplementary data: Guilini *et al.*, 2009

Methods:

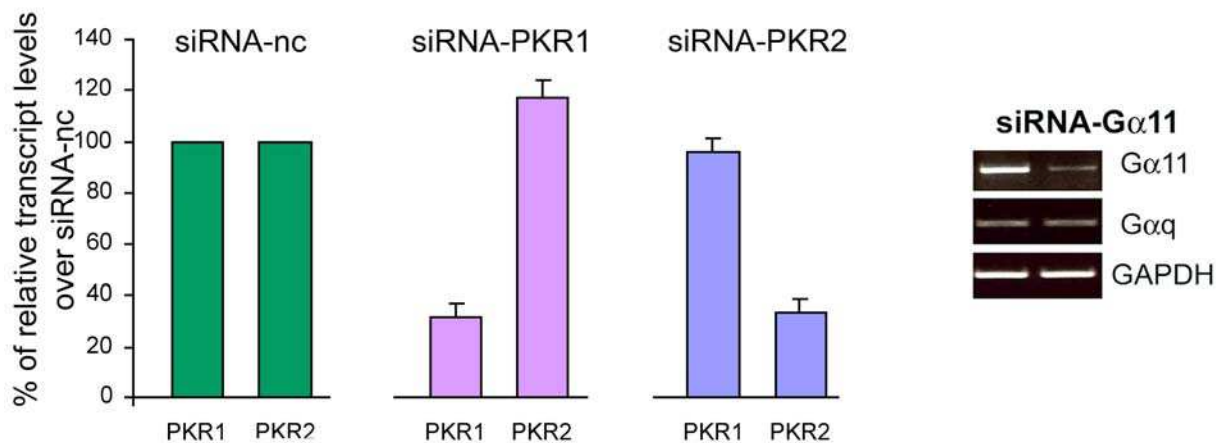
Cell Culture—H5V cells were maintained in DMEM supplemented with 10% heat inactivated Fetal Calf Serum (FCS), glutamine (1mM) under 5% CO₂ at 37°C⁹. Human Hepatic Sinusoidal Endothelial Cells (HHSEC) provided by Innoprot are isolated by ScienCell Research Laboratories from human liver. These primary cells were cultured on fibronectin-coated flask (2 µg/ cm²). HHSEC were maintained in Medium 200 supplemented with Low Serum Growth Supplement (LSGS) (Invitrogen). Human Aortic Endothelial Cells (HAEC) were purchased from Invitrogen. HAEC were maintained in Medium 200 supplemented with Low Serum Growth Supplement (LSGS) (Invitrogen). Both primary cultures were used up to 3 passages.

Assessment of formation of capillary-like structures by endothelial cells—The H5V cells or H5V cells transfected with siRNA for negative control, PKR1, and Gα11 were seeded on twenty-four-well culture plates coated with Matrigel in the presence or absence of prokineticin-2 for 24 hours (BD Biosciences, Bedford, MA) according to the manufacturer's instructions and as previously described^{9,21}. H5V cells overexpressing PKR2 or its control plasmid were trypsin-harvested and seeded onto the coated plates at 10⁵ cells per well in the serum free assay medium and incubated at 37°C for 24 h under 5% CO₂. Tube formation as two-dimensional branched structures was observed using an inverted phase contrast microscope (Leica) and all the number of branching points were quantified in four random fields from each sample. Counts were corrected for basal growth. Each experiment was repeated at least two times. Images were captured at a magnification of X2,5 or X10 with a digital microscope camera system.

Measurement of Activities of Gα12- Because the expression levels of endogenous Gα12 were low in H5V cells, it was unable to detect the endogenous activities of Gα 12 by using GST-TPR pull-down assay. To examine the activities of Gα12, cells co-transfected with Gα12 or constitutively active mutated Gα12QL and PKR2 using Lipofectamine2000 (Invitrogen) according to the manufacture's instructions in H5V cells. After transfection, medium was replaced to DMEM containing 2% FCS and incubated for 16h. The transfected cells were stimulated with 5nM prokineticin-2 for the indicated times, rinsed twice with cold-PBS, and lysed with 500µl of the ice-cold cell lysis buffer (20mM HEPES pH8.0, 2mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.5% Triton X-100, and protease inhibitor cocktail). Cell lysates were then centrifuged for 10min at 12,000g at 4°C, and the supernatant were incubated with 5µg of GST-TPR and glutathione-Sepharose beads for overnight at 4C. After the beads were washed with the ice-cold lysis buffer, the bound proteins were eluted in Laemmli sample buffer and analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with anti-Gα12 antibody. Densitometric analyses were performed by using NIH Image software.

siRNA transfection— H5V cells were transfected by using siPORT Amine transfection reagent (Ambion, Austin, TX, USA) with 100nM siGENOME siRNA for mouse Gα₁₁ (Dharmacon, Lafayette, CO), 100nM for negative control siRNA (Ambion siRNA #AM4611) 100nM for mouse PKR1 (Ambion siRNA #181827; UAUCCAGAUAGUUAACAGCTT) or mouse PKR2 siRNA-PKR2 (Ambion siRNA ID# 152628, CAUCCGUGGUUCAAAGGGTG), according to the manufacturer's instructions (Ambion) . 48h after transfection at least 65 % of PKR1, PKR2 or

G α 11 level were reduced as detected by semi-quantitative RT-PCR normalized by expression of GAPDH. The silencing remained constant for additional 72h. The target sequence of the siGENOME siRNA D-040928-04-0005 mouse G α 11 was following: ACUCACACUUGGUCGAUUA. RT-PCR analyses were performed for PKR1 and PKR2 transcripts. All the transcripts were normalized by GAPDH, a house-keeping gene. The receptor specific silencing has been calculated in siRNA-PKR1 or siRNA-PKR2 expressing H5V cells as relative transcript levels over that of in siRNA-negative control (nc) transfected cells shown in Figure I. left. RT-PCR experiment on siRNA-G α 11 transfected cells revealed that G α 11 expression was reduced by over 65 %, without altering Gq transcript levels (Figure I. right).



Western Blot Analysis—H5V cells were lysed in lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% NP-40, 1 mM Na₃VO₄, and protease inhibitor cocktail (Roche)). Lysates were clarified by centrifugation at 12,000 g for 15 min at 4 °C, and protein content in the supernatant was measured using the BCATM protein assay kit (Pierce, Thermo scientific). An aliquot (30–50 μ g of protein per lane) of total protein was separated by 7 or 12% SDS-PAGE and blotted to the PVDF membranes (0.45 μ m; Milipore). The membrane was blocked with 5% nonfat skimmed milk in PBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl, and 0.01% Tween 20) for 1 h at room temperature, followed by incubation with primary antibodies. After extensive washing with PBS-T, the membrane was reprobed with horseradish peroxidase-linked anti-rabbit or anti-mouse immunoglobulin (1:5,000 diluted) in PBS-T for 1 hour at room temperature. Immunoblots were visualized by enhanced chemiluminescence (Pierce), according to the manufacturer's protocol.

III – 2. Fonction de PKR1 dans les cellules souches dérivées de l'épicarde (EPDC)

La formation de nouveaux capillaires (angiogenèse) autour de la zone ischémique peut limiter rapidement l'apoptose du myocarde. Cependant le débit sanguin assuré par les capillaires reste faible. Une piste envisageable pour traiter cet état pathologique serait d'activer la différenciation des cellules souches cardiaques en cellules vasculaires afin de promouvoir la néovascularisation et rétablir un débit sanguin normal.

La seconde partie de mon projet de recherche avait pour objectif de répondre à la question suivante : quel est le rôle de PKR1 dans les cellules souches cardiaques ?

Dans un premier temps, les cellules EPDC sont isolées à partir d'explants cardiaques de souris. L'expression de PKR1 dans ces cellules est identifiée par PCR (Réaction en chaîne par Polymérase). De plus la détection des protéines PKR1 endogènes par immunomarquage des cellules EPDC confirme la présence de PKR1 dans les cellules EPDC.

Les cellules dérivées de l'épicarde (EPDC) peuvent être considérées comme une nouvelle source de cellules souches adultes et possèdent un rôle important dans la régénération cardiaque (Winter and Gittenberger-de Groot, 2007; Winter et al., 2007). Mes recherches révèlent que PKR1 est le premier RCPG permettant la différenciation *in vitro* des cellules EPDC en cellules endothéliales et cellules musculaires lisses aux dépens des fibroblastes.

Les transitions épithélio-mésenchymateuse, ainsi que la différenciation des EPDC sont notamment régulées par des facteurs sécrétés par les cardiomyocytes (Smart et al., 2009; Wessels and Perez-Pomares, 2004; Winter and Gittenberger-de Groot, 2007). Le premier objectif était de démontrer s'il existe une interaction entre des cardiomyocytes et des cellules EPDC.

III – 2. a. Coculture des cardiomyoblastes H9c2 et des cellules EPDC

Pour ces études les cellules H9c2 cardiomyoblastes, dérivées des cœurs embryonnaires de rat, sont utilisées. Cette lignée cellulaire H9c2, peut être considérée comme étant un modèle des cardiomyocytes notamment en ce qui concerne les aspects de transduction du signal transmembranaire (Hescheler et al., 1991). Des cellules H9c2 ou des cellules H9c2 surexprimant PKR1 sont mises en culture avec les cellules EPDC (voir méthodes supplémentaires annexe-1). Le modèle de coculture des cardiomyoblastes surexprimant PKR1 avec les cellules EPDC a pour objectif de reproduire *in vitro* le modèle de souris transgéniques surexprimant PKR1 dans les cardiomyocytes. Après 48h de coculture, des cellules PECAM+ et des cellules α SMA+ sont détectées par immunomarquage majoritairement dans les conditions où PKR1 est surexprimé dans les cellules H9c2.

Ces résultats suggèrent que les cellules EPDC se soient différenciées en cellules endothéliales (PECAM+) et en cellules musculaires lisses (α SMA+) sous l'action d'un facteur sécrété par les cellules H9c2 surexprimant PKR1.

Pour évaluer l'importance du contact cellulaire entre les cellules H9c2 et EPDC lors de la différenciation, les EPDC sontensemencées dans le milieu de culture conditionné par H9c2 surexprimant PKR1 (voir méthodes supplémentaires annexe-2). Après 24h, la présence des cellules endothéliales (PECAM+) et des cellules musculaires lisses (α SMA+) est révélée par immunomarquage (figure 21. A).

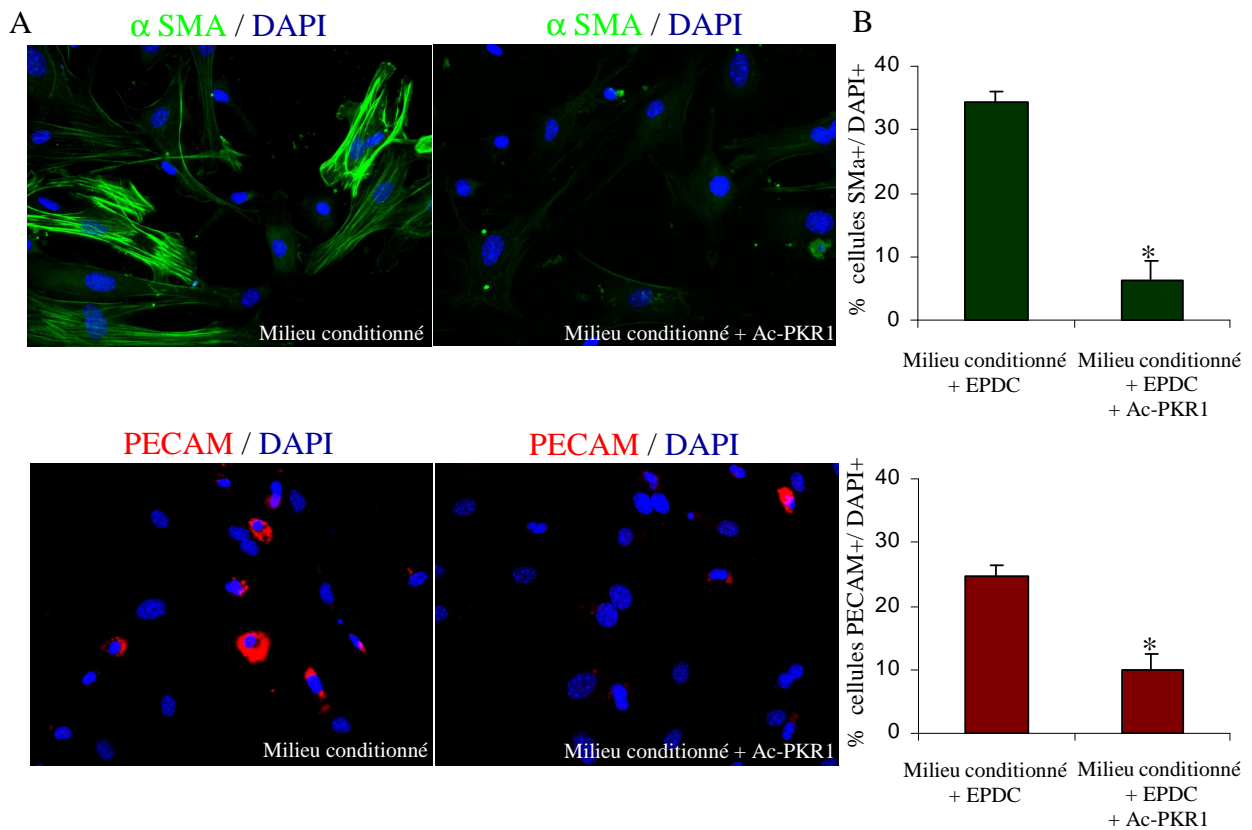


Figure 21. Différenciation des cellules EPDC mises en culture dans un milieu conditionné par les cellules H9c2 surexprimant PKR1.

Les cellules différenciées (PECAM+, marqueur des cellules endothéliales ou SMA+, marqueur des cellules musculaires lisses) sont détectées par immunomarquage. Grossissement x20, Ac-PKR1 : anticorps neutralisant PKR1

Ces observations illustrent la capacité des cellules EPDC à se différencier probablement sous l'action d'un facteur présent dans le milieu conditionné. En outre, le contact entre les cellules H9c2 et les EPDC n'est pas indispensable dans ces conditions expérimentales pour induire la différenciation des cellules EPDC. La neutralisation du récepteur PKR1 exprimé dans les cellules EPDC inhibe leur différenciation en présence du milieu conditionné (figure 21. B). D'après ces résultats, l'hypothèse proposée est que le facteur paracrine et le récepteur PKR1 seraient impliqués lors de la différenciation des cellules EPDC en cellules vasculaires. La prokinéticine-2 pourrait être ce facteur responsable de la restauration de la multipotence des cellules EPDC via PKR1.

III – 2. b. Rôle de PK-2/PKR1 lors de la prolifération et de la différenciation des cellules EPDC

Le traitement des cellules EPDC par la prokinéticine-2 révèle une augmentation significative de leur prolifération. Les EPDC dérivées des explants cardiaques des souris néonatales se différencient en cellules musculaires lisses et en cellules endothéliales après stimulation par la prokinéticine-2. En outre, les cellules EPDC traitées par PK-2 se différencient en cellules endothéliales pouvant former des structures de type capillaire dans un modèle *in vitro* de l'angiogenèse. Ceci indique que ces cellules endothéliales ainsi obtenues sont fonctionnelles. Les cellules EPDC, dérivées des explants cardiaques de souris néonatales « knockout » (PKR1^{-/-}) ayant le gène codant pour PKR1 invalidé, ne se différencient pas en cellules endothéliales ou cellules musculaires lisses après traitement par PK-2. Ces résultats indiquent que PK-2 active PKR1 pour induire la différenciation des cellules EPDC néonatales. Dans ces conditions expérimentales, la différenciation des EPDC en cardiomyocytes ou en fibroblastes n'a pas été observée par la méthode d'immunomarquage. Des cellules EPDC sont ensuite isolées à partir des cœurs des souris adultes. L'objectif étant de vérifier si PK-2 conserve son aptitude à différencier les EPDC en cellules vasculaires au stade adulte. Cette étude montre que les EPDC adultes conservent leur potentiel de différenciation en cellules musculaire lisses et cellules endothéliales sous l'action de PK-2.

D'autre part, des études préliminaires ont été réalisées pour identifier la voie de signalisation impliquée lors de la différenciation des EPDC en cellules vasculaires. Le nombre de cellules endothéliales (PECAM⁺) suivant les conditions expérimentales (décrites dans l'annexe-3) est diminué lorsque la voie de MAPK est inhibée (figure 22).

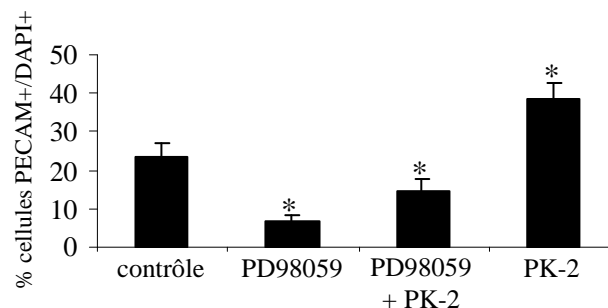


Figure 22. Différenciation des cellules EPDC en cellules endothéliales après inhibition des MAPK (Erk1/Erk2) par PD98059. Les cellules différenciées (PECAM⁺) sont détectées par immunomarquage.

III – 2. c. Etude des effets de la prokinéticine-2 sur des cellules humaines EPDC adultes

D'autre part, des cellules EPDC humaines (hEPDC) provenant du département de cardiologie, « Leiden University Medical Center », Pays-Bas, ont été utilisées pour étudier l'effet de la prokinéticine-2 lors du processus de différenciation en cellules vasculaires. Le traitement par les protéines TGF β ou BMP2 permet la différenciation des cellules adultes hEPDC en cellules musculaires lisses, cependant la génération de cellules endothéliales n'est pas détectée (van Tuyn et al., 2007). La prokinéticine-2 semble être le premier facteur identifié, responsable de la différenciation des cellules hEPDC en cellules endothéliales et en cellules musculaires lisses (voir méthodes supplémentaires annexe-4) (figure 23).

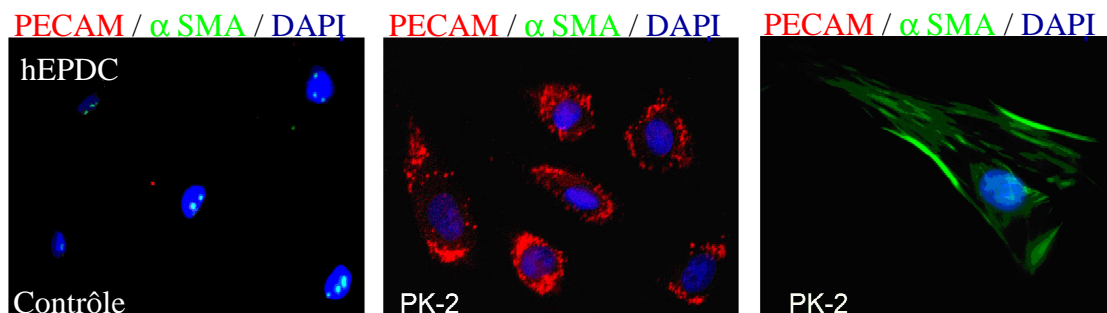
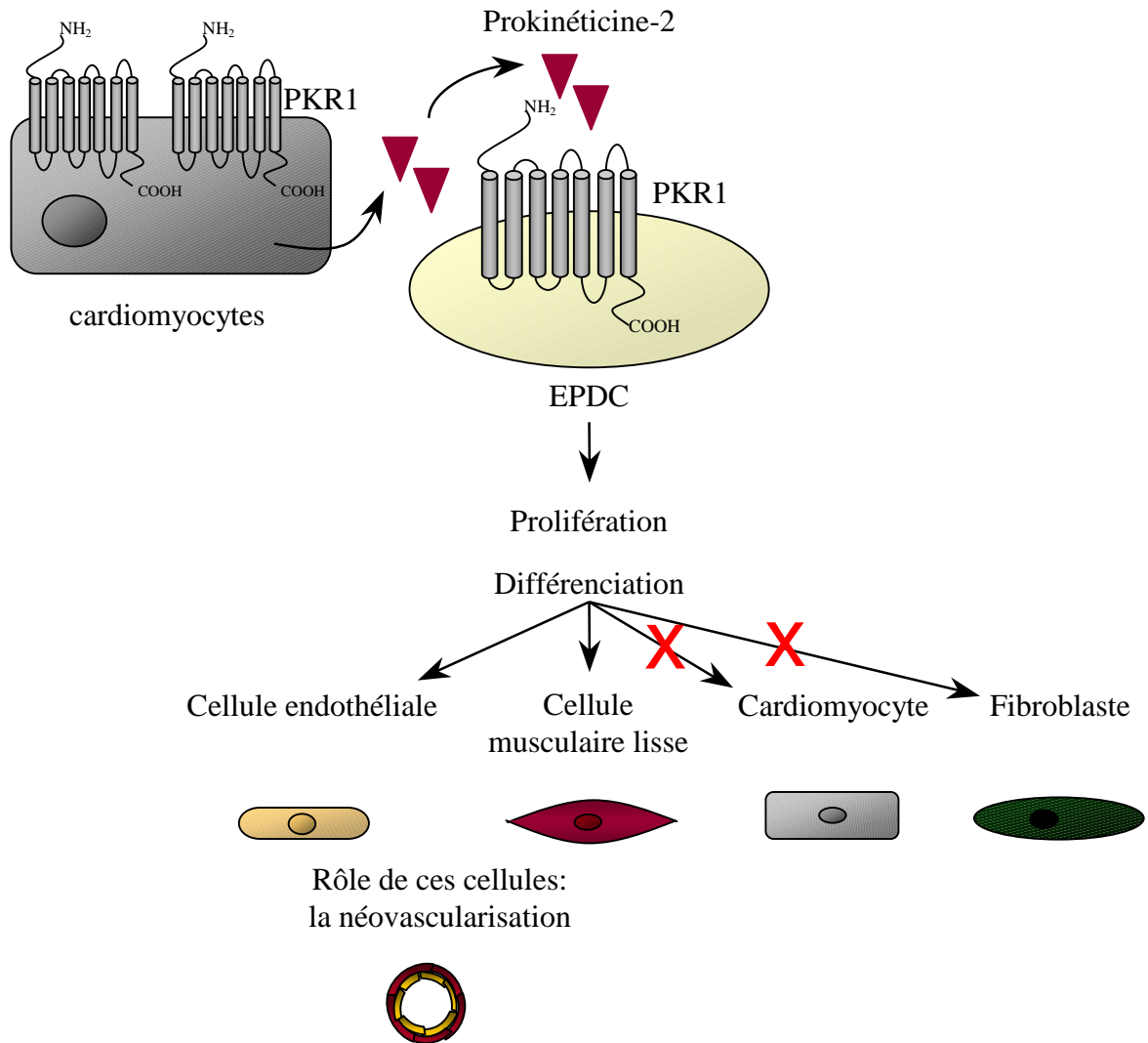


Figure 23. Différenciation des cellules humaine hEPDC en cellules endothéliales (PECAM+) et cellules musculaires lisses (α SMA+) après traitement par PK-2. Grossissement x40.

Selon ces expériences, les prokinéticines pourraient reprogrammer les cellules humaines EPDC adultes et orienter leur différenciation en cellules vasculaires.

III – 2. d. Synthèse sur le rôle de PKR1 dans les cellules EPDC



Article 3

« Prokineticin receptor-1 induces neovascularization and epicardial-derived progenitor cell differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 841-849. (2008) »

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

Prokineticin receptor-1 induces neovascularization and epicardial-derived progenitor cell differentiation

Kyoji URAYAMA, Célia GUILINI, Gulen TURKERI, Selcuk TAKIR, Hitoshi KUROSE, Nadia MESSADDEQ, Andrée DIERICH, Canan G. NEBIGIL

Arteriosclerosis, Thrombosis, and, Vascular Biology, 2008, vol. 28, n° 5, pages 841-849

Pages 73-... :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.162404>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

III – 3. Etudes préliminaires sur les cellules souches cardiaques Sca-1+

L'objectif de ce travail était de déterminer si PK-2/PKR1 peut activer la différenciation de diverses cellules souches cardiaques. C'est pourquoi les recherches ont été poursuivies par des études préliminaires sur les cellules souches Sca-1+.

D'après les études réalisées par John van Tuyn, les cellules hEPDC n'expriment pas le marqueur Sca-1+ (van Tuyn et al., 2007). Le double immunomarquage des cellules EPDC via les anticorps spécifiques des marqueurs Epicardine+ ou Sca-1 confirme cette observation chez les souris (supplément de l'article 3). Donc les cellules EPDC et les cellules Sca-1 + semblent être deux types de cellules souches cardiaques distinctes.

III – 3. a. Isolation des cellules Sca-1+

Dans un premier temps les conditions d'amplification puis d'isolation des cellules Sca-1+ sont mises en place selon le protocole décrit (voir méthodes supplémentaires chapitre VI-5,6,7). Les cellules Sca-1+ sont isolées à partir des explants cardiaques des souris néonatales afin de limiter la dégradation de l'intégrité des marqueurs des cellules souches suite à une digestion enzymatique prolongée (Tang et al., 2007). L'analyse par cytométrie en flux (FACS, « Fluorescence Activated Cell Sorter ») révèle la présence de 6-10% de cellules Sca-1+ parmi les cellules dérivées des explants cardiaques et ceci après 18 jours de cultures. La durée de l'expansion des cellules Sca-1+ est ensuite augmentée. Les cellules sont mises en culture pendant environ 38 jours après le dépôt des explants avec un repiquage des cellules. Dans ces conditions expérimentales l'analyse par FACS détecte 37,7% de cellules Sca-1+ parmi les cellules dérivées des explants. Les cellules cultivées pendant environ 53 jours et repiquées deux fois, sont composées de 43,6% de cellules Sca-1+ selon l'analyse par FACS. La technique par cytométrie en flux n'a pas été retenue pour isoler les cellules Sca-1+ nécessaire pour la suite des expériences, en raison d'un problème de contamination. D'après ces résultats, les cellules Sca-1+ ont été isolées par la méthode des billes immunomagnétiques évitant le problème de contamination. La durée d'expansion des cellules dérivées des explants cardiaques est d'environ 37 jours avec deux repiquages des cellules.

III – 3. b. Expression du récepteur PKR1 dans les cellules Sca-1+

L'expression du récepteur PKR1 a été identifiée dans les cellules Sca-1+ dérivées des cœurs de souris néonatales. La détection des protéines PKR1 endogènes par immunomarquage des cellules Sca-1+ montre la présence de PKR1 (figure 24). L'expression de PKR1 dans ces cellules est aussi confirmée par PCR (Réaction en chaîne par Polymérase).

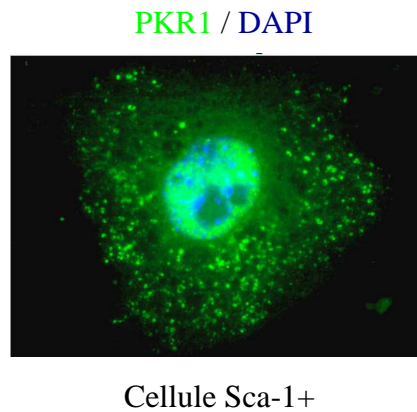


Figure 24. Détection des protéines PKR1 endogènes par immunomarquage des cellules Sca-1+. Grossissement x63

CHAPITRE IV – DISCUSSION

L'obstruction des artères coronaires provoque l'infarctus du myocarde et a pour conséquence immédiate l'apoptose du tissu cardiaque ischémié. Hors à long terme, cela peut entraîner une insuffisance cardiaque. Ainsi la revascularisation rapide du cœur est primordiale pour limiter l'étendue de la zone lésée et réduire le risque de décès du patient. Aussi, la stimulation de la croissance vasculaire des territoires ischémiés laisse espérer des progrès thérapeutiques dans les maladies qui engendrent une insuffisance de vascularisation tel que l'infarctus du myocarde. On parle alors de thérapeutique proangiogénique.

En effet, la formation des vaisseaux résulte de nombreuses molécules aux actions opposées, les unes stimulant la croissance des vaisseaux (facteurs proangiogéniques), les autres la bloquant (facteurs antiangiogéniques). La liste des facteurs nouvellement identifiés par les chercheurs s'accroît régulièrement mais le rôle précis de ces facteurs n'est pas encore clairement et totalement circonscrit. Combien sont-ils et à quoi servent-ils ? Leur étude individuelle dans des modèles expérimentaux *in vitro*, en culture cellulaire ou *in vivo*, chez l'animal et en particulier la souris, fournit des premiers renseignements importants. Cependant la connaissance du rôle de ces nouveaux facteurs dans l'angiogenèse chez l'homme en situation physiologique et pathologique n'en est qu'à ses débuts.

Ainsi, les prokinétines-1 et -2 sont une nouvelle famille de facteurs proangiogéniques. Leur fonction angiogénique a été découverte initialement dans les glandes endocrines par le groupe de Ferrara N. (LeCouter et al., 2001; LeCouter et al., 2003). Les prokinétines et leurs récepteurs PKR1, PKR2 couplés aux protéines G (RCPG) ont été identifiés dans le cœur pour la première fois dans notre laboratoire. En effet, étant donné que les RCPG sont des cibles privilégiées pour environ 40 % des médicaments mis actuellement sur le marché, l'étude des prokinétines dans le système cardiovasculaire semble intéressante.

On peut alors remarquer que, le développement d'un nouveau réseau capillaire grâce aux facteurs angiogéniques est bénéfique dans les premiers temps. Cependant, la maturation des capillaires via des péricytes ou des cellules musculaires lisses est indispensable pour assurer une stabilité à long terme des nouveaux vaisseaux. La maturation de la néovascularisation est

nécessaire pour le rétablissement d'un débit sanguin normal autour de la zone ischémique. Les nouveaux vaisseaux formés dans les tissus ischémiques ne proviennent pas uniquement du bourgeonnement de capillaires préexistants par angiogenèse.

Un autre mécanisme de formation des vaisseaux chez l'adulte a été découvert récemment et fait appel aux cellules souches (Passier et al., 2008; Segers and Lee, 2008). Ces cellules peuvent donner naissance à des cellules spécialisées de la paroi artérielle : cellules endothéliales et cellules musculaires lisses. La question essentielle est de connaître la contribution des cellules souches de la paroi artérielle (cellules endothéliales et cellules musculaires lisses) à l'élaboration de nouveaux vaisseaux fonctionnels. Un des enjeux actuels est alors de trouver les moyens de caractériser, de purifier et d'injecter des cellules à haut pouvoir d'incorporation dans les néovaisseaux. L'autre alternative est d'identifier un facteur capable de mobiliser les cellules souches endogènes résidant dans le cœur même (Barile et al., 2007a; Dimmeler et al., 2005). Ces dernières, en cas de situation critique (ischémie), pourraient se renouveler et se différencier après stimulation par un facteur pour régénérer le tissu cardiovasculaire. Ainsi, le cœur adulte aurait des possibilités, certe limitées mais non négligeables, de se régénérer grâce à son propre contingent de cellules souches.

La discussion s'articule autour de deux thèmes :

IV – 1. L'étude du potentiel angiogénique de la prokinéticine-2 (PK-2) via le récepteur PKR1 dans les cellules endothéliales dérivées du cœur

IV – 2. L'identification du rôle de PK-2 / PKR1 dans les cellules souches cardiaques

IV – 1. Etude du potentiel angiogénique de PK-2 via le récepteur PKR1 dans les cellules endothéliales dérivées du cœur

Des études ont montré que les prokinétines peuvent stimuler la prolifération et l'angiogenèse des cellules endothéliales dérivées des glandes endocrines (Lee et al., 2009; Lin et al., 2002b). Cependant, les prokinétines n'ont pas d'effet sur la prolifération des cellules endothéliales dérivées de la veine ombilicale humaine. Par conséquent, l'hypothèse émise est que suivant l'origine tissulaire des cellules endothéliales, le profil d'expression des prokinétines varie ainsi que leur fonction biologique (Podlovni et al., 2006).

Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que le niveau d'expression des récepteurs des prokinétines et leur voie de signalisation pourraient avoir des effets spécifiques dans les cellules endothéliales cardiaques (H5V). C'est pourquoi, dans la première partie de ce travail, l'objectif était de mettre en évidence *in vitro* le potentiel angiogénique des prokinétines exprimées dans les cellules endothéliales (H5V) dérivées du cœur. La lignée des cellules endothéliales H5V est utilisée pour ces recherches, car d'une part ce type de cellule exprime les prokinétines-1 et -2 et leurs récepteurs, PKR1 prédominant par rapport à PKR2. Et d'autre part, cette lignée cellulaire est susceptible de représenter les cellules endothéliales des coronaires *in vivo*. La lignée H5V reste toutefois un modèle *in vitro* intéressant pour identifier les différentes voies de signalisation des deux récepteurs endogènes des prokinétines.

Pour évaluer le rôle des prokinétines lors de l'angiogenèse *in vitro*, les principales étapes de l'angiogenèse ont été étudiées. Ainsi, la prokinétine-2 entraîne une augmentation significative de la prolifération des cellules endothéliales H5V. De plus, la seconde étape clé de l'angiogenèse, la migration de ces cellules endothéliales est également favorisée par le traitement avec la prokinétine-2.

La question qui se pose alors est la suivante : quel est le récepteur des prokinétines (PKR1/PKR2) impliqué dans ces deux processus ?

Pour répondre à cette interrogation, le récepteur PKR1 est inactivé par un anticorps le neutralisant spécifiquement. On observe dans ces conditions, l'inhibition de la prolifération et de la migration des cellules H5V traitées par PK-2. Ces observations sont en concordance

avec les expérimentations visant à réduire l'expression de PKR1 par la technique des petits ARN d'interférences (siRNA-PKR1) et ceci sans modifier significativement l'expression de PKR2. En effet, dans ce cas l'abolition de la prolifération et de la migration des cellules H5V traitées par PK-2 est également démontrée. D'autre part, contrairement au récepteur PKR1, PKR2 n'est pas nécessaire pour stimuler ces deux étapes de l'angiogenèse. Etant donné que, la réduction de l'expression de PKR2 via des petits ARN d'interférences (siRNA-PKR2) ne modifie pas l'activation de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales H5V traitées par PK-2.

On peut donc conclure que le récepteur activé lors de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales H5V traitées par PK-2 est PKR1.

Enfin les observations suivantes suggèrent que l'activation de PKR1 par la prokinéticine-2 stimule l'angiogenèse *in vitro* sans l'intervention de PKR2. Le modèle expérimental de l'angiogenèse montre que l'activation de PKR1 par la prokinéticine-2 stimule la formation des structures de type capillaire *in vitro*. Ce processus est aboli lorsque PKR1 est neutralisé par un anticorps dirigé contre ce récepteur ou lorsque son expression est réduite en utilisant les siARN-PKR1 spécifiques. D'autre part des cellules endothéliales humaines dérivées de l'aorte (HAEC) exprimant PKR1 mais pas PKR2 forment des structures de type capillaire après traitement par PK-2 dans notre modèle *in vitro*.

La question qui se pose alors est la suivante : quelle est la voie de signalisation activée par PKR1 dans les cellules H5V lors de l'angiogenèse ?

Des études ont mis en évidence que le traitement par PK-1 des cellules endothéliales dérivées de l'utérus stimule la prolifération et l'angiogenèse, principalement par l'activation des protéines kinases MAPK (Lee et al., 2009). En revanche, la prolifération des cellules endothéliales dérivées du cortex surrénalien de la glande surrénale, après traitement par PK-1, est liée à l'activation de la signalisation des kinases MAPK et PI3K (Lin et al., 2002b). Ces études suggèrent donc que suivant l'origine tissulaire des cellules endothéliales, la signalisation des prokinéticines varie.

Puisque les études citées précédemment montrent que les prokinéticines peuvent activer les voies de signalisation MAPK et PI3K, l'activation de ces voies a été examinée dans les cellules endothéliales H5V. Ainsi, mes travaux de recherche montrent que MAPK et PI3K

sont impliquées dans la voie de signalisation de PK-2/PKR1 des cellules endothéliales H5V lors de l'angiogenèse car la formation des structures de type capillaire *in vitro* est abolie par les inhibiteurs de PI3K ou MAPK et ceci malgré l'activation de PKR1 par PK-2. En outre, le traitement des cellules H5V par PK-2 permet l'activation des protéines Akt et Erk1/Erk2 via le récepteur PKR1. L'activation de ces protéines kinases n'est effectivement plus observée après traitement par PK-2, lorsque l'expression de PKR1 est réduite.

L'identification de l'activation des voies de signalisation MAPK et PI3K par les prokinétines est en concordance avec d'autres études réalisées, notamment celles sur les effets mitogènes de différents types cellulaires tels que les cellules glomérulées ou fasciculées dérivées de la glande endocrine (Keramidas et al., 2008), les cellules de la crête neurale entérique (Ngan et al., 2007a) ou les cellules du neuroblastome (Ngan et al., 2007b). Par ailleurs, le récepteur PKR1 est couplé à la protéine $G\alpha_{11}$ dans les cellules endothéliales H5V pour induire l'angiogenèse car la réduction de son expression abolit d'une part la formation des structures de type capillaire *in vitro* et d'autre part inhibe l'activation des protéines Akt et Erk1/Erk2. Ces résultats indiquant l'activation de $G\alpha_{11}$ lors de l'angiogenèse est en concordance avec d'autres études réalisées sur les cellules endothéliales humaines dérivées des veines du cordon ombilical (HUVEC). En effet, les protéines $G\alpha_{q/11}$ sont impliquées dans la prolifération des cellules HUVEC via la phosphorylation du récepteur VEGFR-2 (Zeng et al., 2002). D'autre part, le récepteur de l'oxytocine couplé aux protéines $G\alpha_{q/11}$ stimule la phosphorylation de l'enzyme de synthèse du monoxyde d'azote (eNOS) par la voie de signalisation des protéines kinases PI3K favorisant ainsi la migration des cellules HUVEC (Cattaneo et al., 2008). Ces travaux de recherche indiquent donc que les protéines $G\alpha_{q/11}$ interviennent au cours des deux principaux processus de l'angiogenèse c'est-à-dire la prolifération et la migration des cellules HUVEC.

Dans la lignée de cellules endothéliales H5V, PKR1 est le premier récepteur couplé aux protéines $G\alpha_{11}$ identifié qui active directement l'angiogenèse.

En effet, d'autres études ont montré que des RCPG tels que les récepteurs de la thrombine ou de l'angiotensine II participent indirectement à l'activation de l'angiogenèse en régulant l'expression du facteur VEGF (Richard et al., 2001). Les facteurs VEGF possèdent donc un rôle central lors de la formation des vaisseaux (Tammela et al., 2005). Cette famille de

facteurs de croissance est essentielle en particulier pour stimuler l'angiogenèse dans le myocarde. Ainsi, l'ablation des deux isoformes VEGF₁₆₄ et VEGF₁₈₈ appartenant à la famille VEGF (également appelée VEGF-A) chez la souris provoque une cardiomyopathie ischémique (Carmeliet et al., 1999). Les facteurs VEGF sont donc importants lors du développement du réseau vasculaire. Toutefois la recherche de nouveaux facteurs angiogéniques permettrait la découverte d'une autre possibilité thérapeutique lors d'un infarctus du myocarde.

Ainsi, contrairement aux travaux réalisés dans les cellules endothéliales dérivées du corps jaune par Kisliouk T. et ses collaborateurs selon lesquels les prokinétines activent l'angiogenèse indirectement via VEGF ; l'activation de PKR1 dans les cellules H5V ne régule pas l'expression de VEGF pour activer l'angiogenèse (Kisliouk et al., 2005). Ceci est expliqué par le fait que la neutralisation de VEGF par un anticorps spécifique n'altère pas l'angiogenèse stimulée par PK-2. De plus l'expression de VEGF reste inchangée dans les cellules endothéliales H5V traitées par PK-2.

En résumé, l'étude du potentiel angiogénique de la prokinétine-2 via le récepteur PKR1 suggère que cet autre facteur PK-2/PKR1 possède également un rôle essentiel lors la formation des structures de type capillaire et ceci indépendamment du facteur VEGF.

Les travaux sur les cellules endothéliales H5V dérivées du cœur démontrent pour la première fois qu'un récepteur couplé aux protéines G (PKR1) active directement l'angiogenèse *in vitro*. D'autre part il a été mis en évidence dans le laboratoire, que les récepteurs PKR1 et PKR2 exprimés dans les cellules H5V ont des fonctions biologiques divergentes étant donné que PKR2 régule le processus de fenestration des cellules endothéliales H5V mais n'intervient pas lors de l'angiogenèse.

L'identification d'un RCPG en l'occurrence PKR1 activant directement l'angiogenèse présente un intérêt majeur dans l'élaboration de molécules agonistes ou antagonistes contrôlant directement et localement le développement de nouveaux capillaires cardiaques lors d'un infarctus du myocarde. L'activation ciblée de l'angiogenèse est importante afin de limiter les risques concernant la propagation des tumeurs et des métastases (Carmeliet and Jain, 2000).

En effet, la prolifération des cellules cancéreuses succite l'activation de l'angiogenèse pour assurer le développement de la tumeur. Par conséquent, une des stratégies thérapeutique contre la croissance des tumeurs est l'inhibition de l'angiogenèse (Ferrara and Kerbel, 2005). Dans le cas des pathologies cancéreuses il est donc nécessaire de neutraliser les facteurs proangiogéniques. Ainsi, la neutralisation de PK-2 par un anticorps inhibe la croissance tumorale en supprimant l'angiogenèse chez la souris. Pour conclure, la neutralisation de PK-2 ou l'inhibition des récepteurs de la prokinéticine sont des cibles potentielles pour traiter les cancers.

A l'opposé, l'activation de PKR1 via PK-2 dans le cœur semble être une nouvelle stratégie thérapeutique pour stimuler la formation de nouveaux capillaires autour de la zone ischémique et finalement limiter rapidement l'apoptose du myocarde. En outre, la prokinéticine-2 via PKR1 serait un candidat idéal pour la mise en place d'une nouvelle stratégie thérapeutique si ce même facteur avait le potentiel d'activer la prolifération et la différenciation des cellules souches cardiaques en cellules vasculaires. Cette dernière fonction serait indispensable à long terme pour promouvoir une néovascularisation stable et pour rétablir un débit sanguin normal après un infarctus du myocarde.

C'est pourquoi, la seconde thématique de recherche est orientée vers l'identification du rôle de la prokinéticine-2 via PKR1 dans les cellules souches cardiaques.

IV – 2. Identification du rôle de PK-2 / PKR1 dans les cellules souches cardiaques

IV – 2. a. Fonction de PK-2 / PKR1 dans les cellules dérivées de l'épicaarde (EPDC)

Chez les mammifères, lors du développement cardiaque, l'épicaarde est formé à partir du pro-épicaarde. En outre, des études sur le développement embryonnaire de la souris et du poussin ont montré que les cellules dérivées de l'épicaarde (EPDC) sont issues des transitions épithélio-mésenchymateuses en réponse aux facteurs FGF et TGF β sécrétés par le myocarde. Les facteurs FGF-1, -2 et -7 activent les transitions épithélio-mésenchymateuses tandis que TGF β inhibe ce processus. La transition épithélio-mésenchymateuse permet ainsi la migration des cellules EPDC dans le subépicaarde puis dans le myocarde où les EPDC peuvent se différencier sous l'action de différents facteurs (Smart et al., 2009). Notamment, les facteurs VEGF et FGF sont responsables de la différenciation des EPDC en angioblastes et hémangioblastes. Les angioblastes vont donner naissance aux cellules sanguines tandis que les hémangioblastes vont se différencier en cellules endothéliales ou cellules hématopoïétiques. D'autre part, les facteurs PDGF et TGF β permettent la différenciation des cellules EPDC en fibroblastes et cellules musculaires lisses. Ces cellules participent donc aux processus de vasculogénèse et d'angiogénèse (Wessels and Perez-Pomares, 2004).

Il est généralement accepté que les cellules EPDC puissent générer des cellules musculaires lisses et des fibroblastes. En revanche, la participation des cellules EPDC lors de la formation de l'endothélium des vaisseaux coronaires reste controversée (Smart et al., 2009). Ainsi, pour identifier le devenir des cellules dérivées de l'épicaarde, le pro-épicaarde de poussin est marqué avant sa transplantation dans un embryon de poulet, soit par un traceur fluorescent (CCFSE), soit par transfection avec des rétrovirus codant l'enzyme β -Galactosidase. Les cellules exprimant l'enzyme β -Galactosidase (β -Gal $^{+}$), en présence du substrat X-Gal vont se colorer en bleu grâce aux produits de clivage du substrat X-Gal (Perez-Pomares et al., 2002a). Ces études révèlent alors que quelques cellules dérivées du pro-épicaarde, β -Gal $^{+}$ ou marquées par le traceur CCFSE, peuvent être également positives pour le marqueur QH1 (spécifique des

cellules endothéliales et des cellules hématopoïétiques). Les cellules identifiées par le traceur CCFSE et positives pour QH1 sont intégrées dans des structures vasculaires du subépicarde. Ces résultats suggèrent que les cellules dérivées de l'épicarde se différencient en cellules endothéliales lors du développement embryonnaire du poulet (Perez-Pomares et al., 2002a).

De plus la transplantation du pro-épicarde dérivé des embryons de caille, dans un embryon de poulet permet de mettre en évidence que certaines cellules endothéliales formant les vaisseaux coronaires ont pour origine les cellules du tissu transplanté, c'est à dire le pro-épicarde des embryons de caille (Perez-Pomares et al., 2002a). D'autres études sont en concordance avec le raisonnement selon lequel la formation des artères coronaires commence par la transformation épithélio-mésenchymateuse des cellules du pro-épicarde. Les cellules EPDC ainsi générées migrent ensuite dans le subépicarde et se différencient en cellules musculaires lisses, cellules endothéliales et fibroblastes (Manner, 1999; Mikawa and Gourdie, 1996; Munoz-Chapuli et al., 2002; Perez-Pomares et al., 2002b)

Cependant, d'autres recherches menées sur le développement de la vascularisation cardiaque à partir des modèles chimériques de poulet soutiennent que l'origine des cellules endothéliales des coronaires est indépendante de la différenciation des cellules dérivées de l'épicarde (Mikawa and Fischman, 1992; Poelmann et al., 1993). Cette controverse à propos de la contribution des cellules dérivées de l'épicarde dans l'endothélium des vaisseaux coronaires pourrait être expliquée par la présence ou non de précurseurs de cellules endothéliales dans le pro-épicarde (Lie-Venema et al., 2005; Poelmann et al., 1993; Winter and Gittenberger-de Groot, 2007).

Finalement, il a été admis que certaines cellules endothéliales constituant les vaisseaux coronaires peuvent provenir de la différenciation de cellules dérivées de l'épicarde. Des études récentes montrent toutefois que le taux de différenciation des cellules dérivées de l'épicarde en cellules endothéliales lors du développement embryonnaire des souris est très faible (Zhou et al., 2008). Néanmoins, la provenance des cellules endothéliales des artères coronaires est encore discutée par certain groupe de recherche (Winter and Gittenberger-de Groot, 2007).

Ainsi les cellules EPDC, c'est à dire les cellules dérivées de l'épithélium de l'épicarde après la transition épithélio-mésenchymateuse ont la capacité à s'autorenouveler et à se différencier

en divers types cellulaires. Toutes ces propriétés permettent donc de considérer les cellules EPDC comme étant des cellules souches multipotentes (Wessels and Perez-Pomares, 2004).

D'autre part, il est intéressant de rappeler que la transition épithélio-mésenchymateuse est régulée par des facteurs paracrines FGF et TGF β sécrétés par le myocarde chez le poulet (Morabito et al., 2001). Des études sur des modèles de souris génétiquement modifiées ont permis la découverte des facteurs paracrines tels que le facteur FOG-2 (Tevosian et al., 2000) qui intervient au cours de l'activation de la transition épithélio-mésenchymateuse de l'épicaarde (Hatcher and Basson, 2003; Smart et al., 2009). D'autre part, la migration des cellules EPDC issues de la transition épithélio-mésenchymateuse est stimulée chez la souris par la Thymosine β 4 qui est un facteur sécrété par le myocarde (Smart et al., 2007b).

Des études réalisées sur des embryons de poulet ou de souris suggèrent que certains facteurs sécrétés par le myocarde comme VEGF et FGF-2 sont responsables de la différenciation des EPDC en angioblastes et cellules endothéliales. Cependant, d'autres facteurs comme PDGF, BMP2 et TGF β activeraient la différenciation des EPDC en cellules musculaires lisses et fibroblastes (Kruithof et al., 2006; Munoz-Chapuli et al., 2002; Wessels and Perez-Pomares, 2004). Jusqu'à présent, seule la Thymosine β 4, qui est un facteur sécrété par le myocarde, favorise la migration et la différenciation des cellules EPDC de souris adultes en cellules vasculaires : cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et fibroblastes (Smart et al., 2007a).

Pour conclure, toutes ces observations soulignent l'importance de l'interaction entre le myocarde et l'épicaarde lors du développement cardiaque embryonnaire et en particulier pendant la vascularisation coronarienne. Cette interaction entre le myocarde et l'épicaarde est également présente au stade adulte d'après les études réalisées notamment par Smart N. et ses collaborateurs (Smart et al., 2007a).

C'est pourquoi au laboratoire, nous nous sommes intéressés aux effets biologiques engendrés par la stimulation du récepteur PKR1 exprimé dans le myocarde, sur la vascularisation cardiaque. Ainsi, le modèle de souris transgénique étudié au laboratoire qui surexprime PKR1 spécifiquement dans les cardiomyocytes, montre une augmentation de la néovascularisation. Cette observation suggère la présence d'une interaction paracrine entre les cardiomyocytes

surexprimant PKR1 et les cellules participant à la néovascularisation. Or cette hypothèse est en concordance avec les études décrites précédemment et on peut supposer que les cellules EPDC soient impliquées dans le processus de néovascularisation.

Pour comprendre le mécanisme impliqué dans l'augmentation de la néovascularisation chez les souris surexprimant PKR1 dans les cardiomyocytes, des études *in vitro* sont réalisées. Ainsi le modèle de coculture des cardiomyoblastes (H9c2) surexprimant PKR1 en présence des cellules EPDC néonatales indique qu'un facteur paracrine stimule la différenciation des EPDC en cellules endothéliales et cellules musculaires lisses.

De plus, le contact cellulaire entre les cardiomyocytes et les cellules EPDC ne semble pas intervenir lors de la différenciation. En effet, les cellules EPDC traitées, avec un milieu conditionné par des cardiomyoblastes surexprimant PKR1, se différencient en cellules vasculaires. D'autre part l'activation de cette différenciation est supprimée lorsque PKR1 exprimé dans les cellules EPDC est neutralisé par un anticorps. Le facteur paracrine responsable de la restauration de la multipotence des cellules EPDC via PKR1 est la prokinéticine-2 car les cellules EPDC traitées directement par PK-2 prolifèrent et se différencient en cellules endothéliales et cellules musculaires lisses. En outre, l'implication de la signalisation du récepteur PKR1 lors de la différenciation des EPDC est confirmée par l'étude des cellules EPDC-PKR1^{-/-}, dérivées des explants cardiaques de souris néonatales « knockout » (PKR1^{-/-}) ayant le gène codant pour PKR1 totalement invalidé. Dans ces conditions, on observe une perte des effets de PK-2 sur la formation des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses, à partir des cellules EPDC-PKR1^{-/-}. Par ailleurs, les cellules endothéliales, obtenues après stimulation du récepteur PKR1 dans les cellules EPDC, sont considérées comme étant fonctionnelles puisque l'on peut observer la formation des structures de type capillaire dans un modèle *in vitro* de l'angiogenèse. Néanmoins, suivant nos conditions expérimentales, la différenciation des EPDC en fibroblastes n'est pas observée après traitement par PK-2 contrairement aux études réalisées sur la différenciation des EPDC via la Thymosine β 4 (Smart et al., 2007a). Généralement, la restructuration de la zone ischémique après un infarctus du myocarde compense la perte des cardiomyocytes par le recrutement des fibroblastes. Une activation excessive de la fibrose via la différenciation des EPDC en fibroblastes n'est donc pas souhaitable pour maintenir les performances contractiles du myocarde.

Pour la première fois les recherches sur les fonctions de la prokinéticin-2 via PKR1 montrent leur potentiel à activer la restauration de la multipotence embryonnaire des cellules EPDC adultes.

Au stade adulte, les cellules EPDC restent à l'état quiescent. C'est pourquoi on peut observer une perte de la migration et de la différenciation des cellules EPDC adultes migrant des explants cardiaques sans traitement. Jusqu'à présent, le seul facteur identifié ayant le potentiel de restaurer la différenciation des cellules EPDC adultes en cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et fibroblastes est la Thymosine β 4 (Smart et al., 2009; Smart and Riley, 2008).

Désormais la prokinéticine-2 via PKR1 est un nouveau facteur identifié capable de générer des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses à partir des cellules EPDC de souris adultes.

D'autre part, les prokinéticines peuvent reprogrammer les cellules EPDC humaines, adultes et semblent orienter leur différenciation en cellules vasculaires (cellules musculaires lisses et cellules endothéliales). Toutefois la génération des cellules endothéliales à partir des EPDC humaines est en contradiction avec les études réalisées par John Van Tuyn et ses collaborateurs (van Tuyn et al., 2007). Cette équipe de recherche montre que les cellules EPDC, pré-incubées dans un milieu (EGM2 « endothelial growth medium-2 », Cambrex) contenant des facteurs de croissance (VEGF, FGF-2, EGF « epidermal growth factor », IGF « insulin-like growth factor »), peuvent former des structures de type capillaire dans un modèle *in vitro* de l'angiogenèse. Cependant les cellules formant ces structures ne sont pas considérées comme des cellules endothéliales car dans ces conditions l'expression du facteur vWF (von Willebrand factor, marqueur endothélial) n'est pas augmenté (van Tuyn et al., 2007). On rappelle que les facteurs VEGF et FGF-2 sont responsables de la différenciation des EPDC en angioblastes et cellules endothéliales chez le poulet et la souris au stade embryonnaire. En outre, les facteurs EGF stimulent la différenciation des cellules dérivées de l'épicaire chez le rat adulte en cellules musculaires lisses (Wada et al., 2003). Par conséquent, l'hypothèse émise est que la combinaison de plusieurs facteurs de croissance pourrait inhiber la différenciation des cellules EPDC humaines en cellules endothéliales. L'équilibre entre les différents facteurs possédant des fonctions biologiques diverses pourrait orienter la différenciation des EPDC vers un autre type cellulaire telles que les cellules musculaires lisses.

Jusqu'à présent, les connaissances sur la transition épithélio-mésenchymateuse de l'épicarde puis la différenciation des cellules EPDC sont principalement fondées sur des études réalisées à partir des embryons de poulet ou de souris. En raison de l'absence de modèle cellulaire humain les connaissances sur les cellules EPDC humaines sont limitées.

Or récemment, John Van Tuyn et ses collaborateurs ont isolé, puis établi les conditions de culture et enfin caractérisé les cellules EPDC primaires dérivées de l'épicarde humain. Dans un premier temps, ce groupe a découvert que les cellules isolées de l'épicarde humain entrent spontanément en transition épithélio-mésenchymateuse durant la culture *in vitro* contrairement aux cellules primaires de l'épicarde de rat adulte qui seulement après stimulation par FGF-2 ou EGF peuvent subir la transition épithélio-mésenchymateuse *in vitro* (Wada et al., 2003). C'est deux études montrent que ces cellules, dérivées de l'épicarde adulte, ont conservé certaines caractéristiques embryonnaires. Cependant, suivant l'espèce à partir de laquelle les cellules sont isolées, la réactivation des processus embryonnaires *in vitro* telle que la transition épithélio-mésenchymateuse peut être spontanée ou nécessiter la présence d'un facteur de croissance. De plus seulement 5% des cellules EPDC de rat traitées génèrent des cellules musculaires lisses tandis que 100% des cellules EPDC humaines se différencient en cellules musculaires lisses (van Tuyn et al., 2007).

Ces divergences sur la restauration du potentiel embryonnaire *in vitro* peuvent être expliquées par le fait que les EPDC sont issus de différentes espèces et d'autre part que ces cellules EPDC sont activées par divers facteurs de croissance. En effet, les facteurs EGF et PDGF sont responsables de la différenciation des EPDC de rat en cellules musculaires lisses tandis que les EPDC humaines sont différenciées en cellules musculaires lisses par BMP-2 et TGF- β 1 (van Tuyn et al., 2007).

On peut ainsi reprendre ces arguments pour expliquer que la prokinétine-2 pourrait être un nouveau facteur stimulant la différenciation des cellules EPDC, dérivées des espèces humaines ou murines, en cellules endothéliales. Les cellules endothéliales ainsi formées *in vitro* sont identifiées par détection immunologique des marqueurs PECAM ou Flk-1. D'autre part, les cellules EPDC de souris néonatales traitées par PK-2 forment des structures de type capillaire dans un modèle d'angiogenèse.

Ces découvertes présentent un intérêt car pour la première fois, l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G, PKR1, est identifiée comme étant responsable de la prolifération et de la différenciation des cellules EPDC en cellules endothéliales et cellules musculaires lisses. Or la stimulation des cellules dérivées de l'épicaire adulte est une perspective thérapeutique non négligeable pour activer la néovascularisation nécessaire au maintien de la survie des cardiomyocytes en particulier après une ischémie cardiaque.

La prokinéticine-2 et son récepteur PKR1 présentent deux champs d'action éventuels pour traiter l'ischémie cardiaque : la stimulation de l'angiogenèse et la différenciation des cellules souches EPDC adultes en cellules vasculaires. Le taux de cellules souches cardiaques endogènes reste faible chez l'homme adulte. Cependant, si la prokinéticine-2 possède la capacité de mobiliser et d'activer la différenciation de diverses cellules souches cardiaques alors le spectre d'action des prokinéticines sera élargi pour améliorer son efficacité.

La question sous-jacente est la suivante : la prokinéticine-2 peut-elle être un facteur universel de la différenciation des cellules souches cardiaques endogènes ? Afin de trouver quelques éléments de réponse, des premières études ont été réalisées sur des cellules Sca-1+.

IV – 2. b. Les prokinéticines et les cellules souches cardiaques Sca-1+

Il est intéressant de noter que les cellules EPDC n'expriment pas le marqueur Sca-1 (van Tuyn et al., 2007). On peut donc considérer que les cellules souches Sca-1+ et les EPDC sont deux populations distinctes.

Pourquoi s'intéresser aux cellules souches Sca-1+ ?

Les cellules souches Sca-1+ sont présentes dans le cœur des souris adultes et peuvent se différencier en cellules endothéliales après traitement par le facteur VEGF (Wang et al., 2006). Les cellules Sca-1+ ont été également identifiées chez l'homme et constituent une cible potentielle lors de la régénération cardiovasculaire (van Vliet et al., 2008). D'autre part, les cellules Sca-1+, isolées des cœurs des souris adultes, se différencient *in vitro* en cardiomyocytes matures sous l'action de l'oxytocine et de son récepteur couplé aux protéines

Gq (Matsuura et al., 2004). Plus récemment, Wang X. et ses collaborateurs ont montré que les cellules Sca-1+/CD31- favorisent la régénération des cardiomyocytes chez la souris adulte (Wang et al., 2006). Ainsi, ces cellules Sca-1+ pourraient constituer une autre possibilité de traitement des cardiopathies ischémiques.

Les cellules Sca-1+ dérivées des cœurs néonataux présentent une expansion *in vitro* trois fois plus élevée par rapport à l'expansion des cellules Sca-1+ adultes (Rosenblatt-Velin et al., 2005). C'est la raison pour laquelle les premières expérimentations sont réalisées à partir des cellules Sca-1+ dérivées des explants cardiaques de souris néonatales. Les études préliminaires révèlent que le faible pourcentage de la population Sca-1+ peut être amélioré en augmentant le nombre de repiquage et le temps d'expansion des cellules dérivées des explants cardiaques. La population cellulaire Sca-1+ ainsi isolée exprime le récepteur PKR1. Il serait donc intéressant de vérifier la pureté de la population Sca-1+ afin de poursuivre les recherches sur la fonction du récepteur PKR1 dans les cellules Sca-1+.

CHAPITRE V – CONCLUSION ET PERSPECTIVES

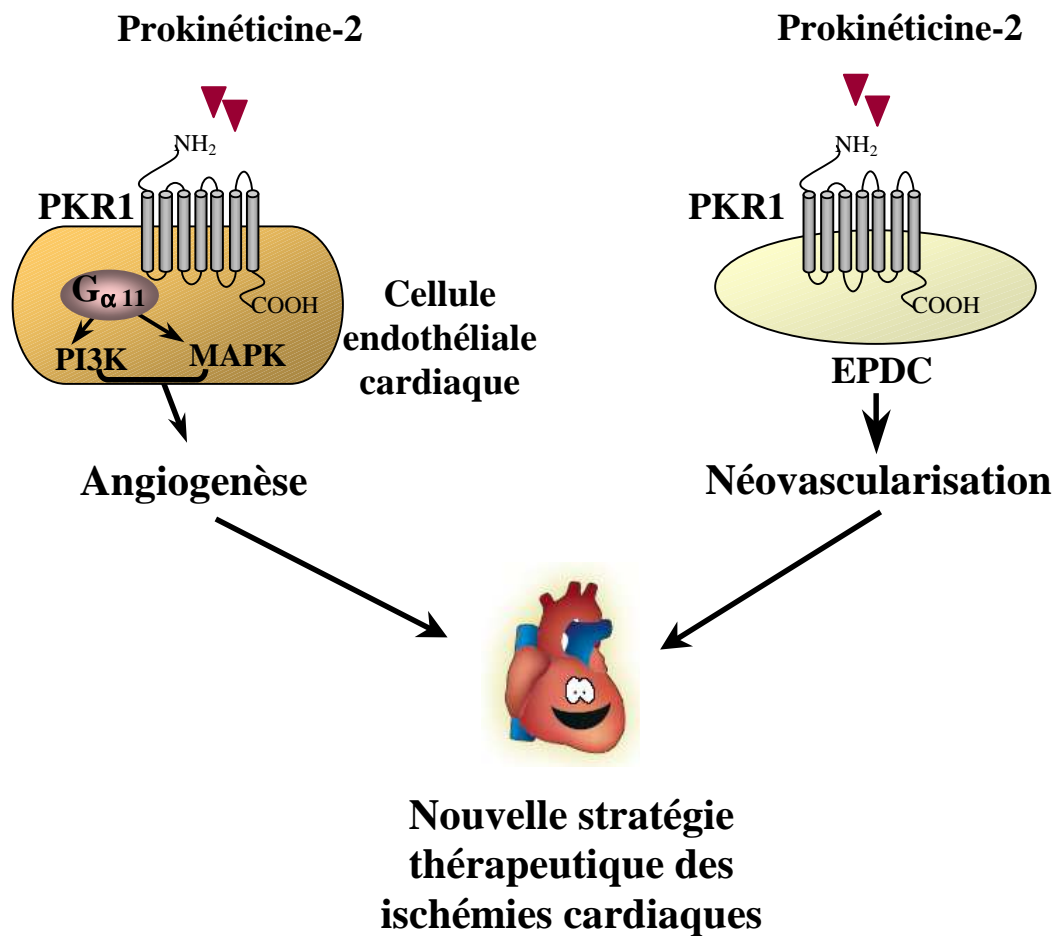
En résumé, ces travaux de recherche ont permis d'identifier une nouvelle voie de signalisation lors du processus de l'angiogenèse cardiaque. Le récepteur PKR1 exprimé dans les cellules endothéliales du cœur est une nouvelle cible permettant la formation de nouveaux capillaires en activant directement les protéines $G\alpha_{11}$ puis PI3K et MAPK.

D'autre part, pour la première fois ces études montrent qu'un récepteur couplé aux protéines G, PKR1 active la prolifération et la différenciation des cellules EPDC en cellules endothéliales et cellules musculaires lisses au détriment des fibroblastes.

Actuellement aucune voie de signalisation à ma connaissance n'a été identifiée lors de la différenciation des EPDC. Or la compréhension des voies de signalisation lors de la restauration de la multipotence des cellules souches EPDC est nécessaire pour discerner le maximum de paramètres et évaluer l'innocuité de ce processus, notamment dans la perspective d'études précliniques puis cliniques. C'est pourquoi des premières expérimentations ont été réalisées pour découvrir quelle voie de signalisation est stimulée par PKR1 lors de la différenciation des EPDC de souris. Les premiers résultats *in vitro* suggèrent que les protéines kinases MAPK interviennent pour stimuler la différenciation des EPDC en cellules endothéliales. En effet, la détection des cellules PECAM+ après stimulation des EPDC par la prokinétin-2 est réduite d'environ 23% en présence de l'inhibiteur pharmacologique de MAPK (PD98059). Cette donnée expérimentale doit être confirmée par des recherches complémentaires notamment en utilisant le modèle *in vitro* de l'angiogenèse en présence de divers inhibiteurs.

L'ensemble de ces travaux *in vitro* révèlent la double compétence de PK-2/PKR1 dans les cellules endothéliales cardiaques et les cellules souches dérivées de l'épicarde (EPDC). Ces deux processus, l'angiogenèse et la reprogrammation des cellules souches en cellules vasculaires, ont un intérêt majeur en particulier lors de la néovascularisation après un infarctus du myocarde.

Conclusion générale



Par conséquent, une perspective intéressante serait d'étudier la fonction du récepteur PKR1 exprimé dans la population de cellules Sca-1+. Les cellules souches cardiaques étant présentes en faible quantité dans le cœur adulte, l'activation de plusieurs populations de cellules souches cardiaques par le même facteur est une approche attractive pour régénérer efficacement la vascularisation.

Pour cela, la pureté des cellules Sca-1+ pourraient être caractérisées en vérifiant l'expression des différents marqueurs tels que : c-Kit (autre marqueur des cellules souches cardiaques), CD45, CD34 (marqueur des cellules souches hématopoïétiques), PECAM ou CD31 (marqueur des cellules endothéliales), GATA-4 (marqueur des cardiomyocytes immatures) et Isl-1 (marqueur embryonnaire des cellules souches cardiaques) (Barile et al., 2007b; Tang et al., 2007). D'autre part, les études sur la mobilisation, la prolifération et la différenciation des cellules Sca-1+ en cellules vasculaires après stimulation par la prokinéticine-2 pourraient être envisagées. Ces travaux de recherche auraient pour objectif de déterminer si la prokinéticine-2 peut activer la différenciation de diverses cellules souches et par quel mécanisme.

Ainsi la prokinéticine-2 et PKR1 peuvent être des cibles thérapeutiques dans le cadre de la néovascularisation cardiaque. La découverte d'un agoniste spécifique du récepteur couplé aux protéines G, PKR1 ou le traitement par des cellules souches surexprimant PK-2 pourraient être envisagés.

Actuellement les thérapies cellulaires réalisées dans les modèles animaux après un infarctus du myocarde montrent un effet bénéfique des fonctions cardiaques. Or la principale hypothèse expliquant l'amélioration des fonctions cardiaques est la sécrétion des facteurs paracrines par les cellules injectées. La sécrétion de ces facteurs est supposée stimuler l'angiogenèse, inhiber l'apoptose et l'inflammation, stimuler la mobilisation des cellules souches endogènes (Joggerst and Hatzopoulos, 2009; Losordo and Dimmeler, 2004). D'après ce raisonnement, il serait intéressant d'étudier les effets de la surexpression de PKR1 ou PK-2 dans les cellules EPDC pour identifier les facteurs sécrétés et en particuliers la prokinéticine-2. Ce modèle de cellules souches génétiquement modifiées pourrait être plus résistante au stress engendré par l'ischémie et favoriser d'autant plus le recrutement et la différenciation d'autres cellules souches endogènes.

Cette nouvelle stratégie thérapeutique faisant appel aux cellules souches est un nouvel espoir pour les personnes souffrant des cardiopathies ischémiques. Cependant, comme toutes les nouvelles avancées scientifiques, de nombreuses questions doivent être étudiées. Les interrogations suscitant des études approfondies peuvent être les suivantes :

A quel stade de la pathologie cette nouvelle stratégie peut être mise en place ? Quelle type cellulaire est le plus adapté pour le traitement des cardiopathies ischémiques dans les centres hospitaliers ? Quel est le mode de délivrance le plus adapté et le moins invasif ? Quelle est le mécanisme d'action issu de la transplantation cellulaire ?

ANNEXE – MATÉRIELS ET MÉTHODES SUPPLÉMENTAIRES

1 Coculture des cardiomyoblastes H9c2 et des EPDC

Les cellules EPDC dérivées des cœurs de souris néonatales sont isolées selon le protocole décrit dans les suppléments de l'article 3 « Prokineticin receptor-1 induces neovascularization and epicardial-derived progenitor cell differentiation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 841-849. (2008) ». Les cellules H9c2 proviennent de la banque cellulaire ATCC (American Type Culture Collection, manassas, VA, USA). Les cellules H9c2 sont dans un premier temps incubées avec un adénovirus contrôle négatif (Adv-cont) ou avec un adénovirus portant l'ADN codant pour PKR1 (Adv-PKR1) suivant les conditions décrites précédemment dans les suppléments de l'article 3. Ces cellules H9c2 infectées (multiplicité d'infection : 10 MOI) sontensemencées (10^4 cellules/puit) dans des chambres de culture. Les cellules EPDC sont ajoutées ($0,5 \cdot 10^4$ cellules/puit) 12h plus tard dans leur milieu de culture composé de DMEM, GlutaMaxTM, 4,5g/L glucose, pénicilline, streptomycine et 10% de sérum FCS. Après 48h d'incubation, les cellules sont fixées par 3,7% de formaldéhyde. Les cellules sont ensuite analysées par immunomarquage en utilisant les anticorps primaires : PECAM-1 (dilution 1/50), α SMA (dilution 1/500), MF-20 (dilution 1/200), épocardine (dilution 1/250) (voir le supplément de l'article 3). L'acquisition des images est réalisée à l'aide d'un microscope droit à fluorescence, type Leica et couplé à une caméra numérique.

2 Traitement des cellules EPDC dérivées des cœurs de souris néonatales par le milieu conditionné

Les cellules H9c2 sont mises en culture sur plaque 12 puits à raison de $9 \cdot 10^4$ cellules par puit dans le milieu DMEM contenant 1g/L de glucose, de la gentamicine et 10% de sérum FCS. Après 24h, les cellules H9c2 sont incubées pendant 2h en présence de l'adénovirus portant l'ADNc de PKR1 ou l'adénovirus contrôle négatif (10 MOI) dans 600 μ L de milieu sans sérum. Après 48h, le surnageant est prélevé puis 476 μ L de ce milieu conditionné sont ajoutés

à 10^4 cellules EPDC par puit, préalablement incubées (10 min) ou non avec l'anticorps neutralisant PKR1 (dilution 1/200). Les cellules EPDC traitées par le milieu conditionné sont déposées dans une chambre de culture recouverte par 0,1% de gélatine (Sigma-Aldrich) et dans un volume final de 500 μ L. Les cellules sont fixées 24h après avec 3,7% de formaldéhyde et analysées par immunomarquage selon le protocole décrit dans les suppléments de l'article 3. L'acquisition des images est réalisée à l'aide d'un microscope droit à fluorescence, type Leica et couplé à une caméra numérique.

3 Traitement des cellules EPDC dérivées des explants cardiaques des souris néonatales par un inhibiteur pharmacologique

Les cœurs sont extraits des souris C57Bl/6 néonatales et coupés en petits explants (approximativement 1mm^3). Les explants sont rincés plusieurs fois dans une solution de PBS pour éliminer le sang. Les explants sont déposés dans des chambres de culture (8 puits) recouvertes par 0,1% de gélatine dans un milieu contenant le DMEM, GlutaMaxTM, 4,5g/L de glucose, pénicilline, streptomycine et 15% de sérum FCS. Les explants sont préincubés avec l'inhibiteur pharmacologique de MAPK (Erk1/Erk2), (PD98059, $10\mu\text{M}$) pendant 10 min à 37°C . La prokinéticine-2 est ensuite ajoutée à une concentration finale de 5nM. La culture est maintenue pendant 3 jours à 37°C , 5% CO_2 avec un minimum de perturbations mécaniques pour assurer l'adhérence des explants. Après 3 jours, les explants et les cellules dérivées de ces explants sont incubés 10 min avec l'inhibiteur PD98059 ($10\mu\text{M}$) puis traités par PK-2 (5nM) dans le milieu DMEM, GlutaMaxTM, 4,5g/L de glucose, pénicilline, streptomycine, sans sérum. Après 24h les cellules sont fixées par 3,7% de formaldéhyde. Les cellules sont ensuite analysées par immunofluorescence en utilisant l'anticorps primaire PECAM-1 (dilution 1/50) selon le protocole décrit dans les suppléments de l'article 3. L'acquisition des images est réalisée à l'aide d'un microscope droit à fluorescence, type Leica et couplé à une caméra numérique.

4 Traitement des cellules hEPDC isolées des cœurs humains

Les cellules humaines hEPDC adultes ont été données par le Dr. Douwe E. AT SMA (Leiden University Medical Center), Pays-Bas. D'après ses instructions, les cellules hEPDC ont 3 passages et elles peuvent être repiquées jusqu'à 10 fois. Ces cellules ont été isolées selon la procédure décrite précédemment (van Tuyn et al., 2007). Les cellules hEPDC sontensemencées à une densité de 10^4 cellules par puit, dans une chambre de culture recouverte par 0,1% de gélatine. Ces cellules sont mises en culture dans un milieu composé de DMEM et M199 en proportion 1/1, contenant 4,5 g/L de glucose, pénicilline (P), streptomycine (S), 10% de sérum FCS et 2ng/mL de FGF-2 (Sigma-Aldrich). Les cellules sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂. Après 24h, le milieu de culture est remplacé par DMEM + P, S sans sérum et sans facteur de croissance durant la nuit. Les cellules sont ensuite rincées et le milieu DMEM + P, S sans sérum est ajouté en présence ou en l'absence de PK-2 (5nM). Le milieu est renouvelé tous les deux jours avec ou sans traitement. Après 9 jours, les cellules sont fixées avec 3,7% de formaldéhyde. Les cellules sont analysées ensuite par immunofluorescence. L'acquisition des images est réalisée à l'aide d'un microscope droit à fluorescence, type Leica et couplé à une caméra numérique.

5 Culture des cellules dérivées des explants cardiaques des souris néonatales

Les cœurs sont extraits des souris C57Bl/6 néonatales et coupés en petits explants (approximativement 1mm³). Les explants sont rincés plusieurs fois dans une solution de PBS pour éliminer le sang. Puis, ils sont mis en culture dans des boîtes de pétrie recouvertes par 0,1% de gélatine en présence du milieu contenant le DMEM, GlutaMaxTM, 4,5g/L de glucose, pénicilline, streptomycine et 15% de sérum FCS. La culture est maintenue pendant 4 jours à 37°C, 5% CO₂ avec un minimum de perturbations mécaniques pour assurer l'adhérence des explants. Après 4 jours d'incubation, les explants sont retirés et les cellules sont cultivées dans un milieu DMEM, GlutaMaxTM, 4,5g/L de glucose, pénicilline, streptomycine et 10% de sérum FCS. Les cellules sont incubées à 37°C, 5% CO₂ et le milieu est renouvelé tous les deux jours. Différents temps d'expansion des cellules est testé pour améliorer le pourcentage de cellules Sca-1+ analysé par cytométrie en flux (FACS).

6 Analyse de la population cellulaire Sca-1+ parmi les cellules dérivées des explants cardiaques

Différentes durées d'expansion des cellules dérivées des explants cardiaques sont testées. Les cellules sont dans un premier temps mises en culture pendant 18 jours. La seconde condition expérimentale consiste à incuber les cellules dérivées des explants pendant environ 38 jours avec un repiquage des cellules. La troisième condition est l'incubation des cellules pendant environ 53 jours avec deux repiquages des cellules. Le pourcentage de cellule Sca-1+ présent dans ces trois conditions expérimentales est analysé de manière indépendante par cytométrie en flux. Les cellules issues de ces trois expériences sont mises en suspension dans une solution de PBS contenant 3% de sérum FCS pendant 5min. Les cellules sont ensuite incubées 1h à 4°C avec l'anticorps dirigé contre Sca-1 et couplé au fluorophore PE-CY7 (0,5µg d'anticorps pour 10⁶ cellules) (eBioscience). Les cellules sont centrifugées afin de les ressuspendre dans la solution de PBS stérile. Juste avant l'analyse par FACS, 50nM de To-PRO®-3 iodide (Invitrogen) est ajouté dans les échantillons cellulaires. To-PRO®-3 iodide permet la discrimination des cellules mortes perméables à ce composé. L'analyse est réalisée avec le FACS Calibur (BD Bioscience).

7 Isolation des cellules Sca-1+ par la méthode des billes immunomagnétiques

L'expansion des cellules dérivées des explants cardiaques néonataux est d'environ 37 jours avec deux repiquages. L'isolation des cellules Sca-1+ est réalisée par la méthode des billes immunomagnétiques (Matsuura et al., 2004). Les cellules sont isolées selon les recommandations du fournisseur du kit Dynabeads® FlowComp™ Flexi (Invitrogen). Les cellules sont rincées avec le PBS et mises en suspension dans le milieu IMDM, 10% de sérum FCS, pénicilline, streptomycine. Le nombre de cellule par échantillon est déterminé en utilisant des lames de numération (KOVA® Glasstic® Slide 10). Les cellules sont centrifugées et le culot cellulaire est ressuspendu dans 500µL de tampon d'isolation (PBS + 0,1% BSA + 2mM EDTA). Les cellules sont incubées 20 min avec l'anticorps couplé à la biotine et dirigé contre Sca-1 (1µg/ 10⁶ cellules) (BD Pharmingen™). Après rinçage des cellules avec le tampon d'isolation, les billes « FlowComp Dynabeads » sont ajoutés dans les

cellules en suspension. Ces billes magnétiques, possédant à leur surface les protéines streptavidines ou avidines, se lient à la biotine de l'anticorps Sca-1. Après 30 min d'incubation, les cellules Sca-1+ liées aux billes sont isolées dans un champ magnétique. Les cellules qui ne sont pas attirées par le champ magnétique sont incubées une seconde fois avec 85µL de billes magnétiques. L'objectif de cette étape est l'optimisation du nombre de cellules Sca-1+ isolées. Les cellules Sca-1+ liées aux billes sont rincées avec le tampon d'isolation puis mises en suspension dans un tampon permettant la dissociation des billes et des cellules. Après 20min les cellules Sca-1+ qui ne sont plus attirées par le champ magnétique sont prélevées et rincées avec le tampon d'isolation. L'étape de dissociation des billes et des cellules est répétée. Les cellules Sca-1+, isolées par cette technique, sontensemencées dans des chambres de cultures recouvertes par 0,1% de gélatine. Ces cellules sont cultivées dans le milieu IMDM, 10% de sérum FCS, pénicilline, streptomycine.

8. Etudes moléculaires

8.a. Extraction de l'ARN

Les ARN totaux sont extraits selon le protocole du produit TRI REAGENT® RNA/ DNA/ Protein isolation reagent (Molecular research center). La qualité des ARN totaux extraits est évaluée par migration sur un gel d'agarose 2% contenant du bromure d'éthidium (20 min, voltage 100V). Les échantillons d'ARN sont dilués 200 fois en présence d'eau 0,1 % DEPC et d'une solution de charge. La quantité d'ARN est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm. Le rapport $DO_{260\text{ nm}}/DO_{280\text{ nm}}$, qui doit se situer entre 1,7 et 1,9 nous renseigne sur la pureté de l'échantillon pouvant être contaminé par des protéines. La concentration de l'ARN est calculée de la manière suivante : $[ARN] (\mu\text{g/mL}) = 40 (\mu\text{g/mL}) \times \text{facteur de dilution} \times DO_{260}$.

8.b. Rétrotranscription des ARN

La rétrotranscription est réalisée selon les indications du fournisseur Invitrogen. 1 ou 3 µg d'ARN totaux sont mélangés à 1 µL d'oligo(dT)₁₂₋₁₈ (0,5 µg/µl), 1 µL de dNTP (10 mM), eau 0,1 % DEPC en quantité suffisante pour un volume final de 13 µL. Cette solution est placée 5 min à 65°C (dénaturation des ARN pour obtenir un ARN linéaire et faciliter la rétrotranscription), puis 5 min dans la glace (dénaturation irréversible). 4 µL de tampon 5x (Tris-HCl 250 mM pH 8,3, MgCl₂ 15 mM, KCl 375 mM), 2 µL de dithiothréitol 0,1 M (DTT : milieu réducteur pour la transcriptase) sont ajoutés. Après 2 min à 42°C, 1 µL de transcriptase inverse (200 U/µL) (Superscript II RT; Invitrogen) est ajouté pour une rétrotranscription à 42°C pendant 50 min. La solution Superscript II RT (Invitrogen) contient une RNase H dégradant les ARN hybridés à l'ADNc. La réaction est arrêtée en chauffant 15 min à 70°C.

8.c. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) semi-quantitative

Les PCR semi quantitatives ont été réalisées dans un volume total de 25µL selon les indications du fournisseur Invitrogen. Le milieu réactionnel contient 2,5µL de tampon PCR (10x) contenant MgCl₂ (15 mM), 2,5 µL dNTP (2,5 mM), et 0,25 µL de l'enzyme « Taq DNA Polymerase », 5U/µL (Biochem), 1µL d'amorce sens (0,1µg/µL), 1µL d'amorce antisens (0,1µg/µL), 2µL d'ADNc, 15,75µL d'eau stérile.

Les oligonucléotides utilisés sont les suivant :

souris PKR1 :

Sens : 5' TCT GGG TGA GAA TAC CAC AG 3'

Antisens : 5' GAG ACG GTA CGC AAG TAG TT 3'

La taille attendue du fragment d'ADNc amplifié est de 420 pb.

souris GAPDH :

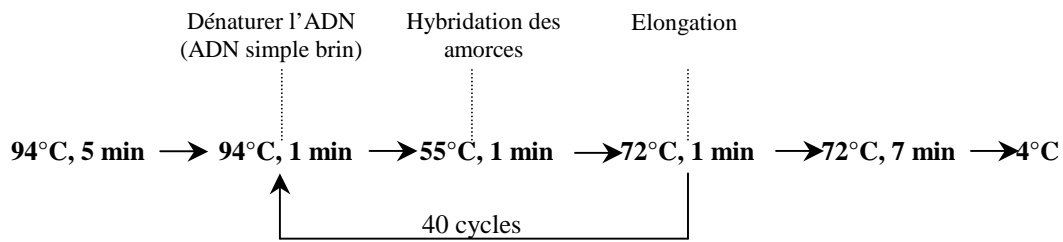
Sens : 5'TGA GGC CGG TGC TGA GTA TGT CG 3'

Antisens : 5' CCA CAG TCT TCT GGG TGG CAG TG 3'

La taille attendue du fragment d'ADNc amplifié est de 302 pb.

Les conditions expérimentales de l'amplification des ADNc sont les suivants :

Pour PKR1



Afin de standardiser et de normaliser les niveaux relatifs d'ADN obtenus, il est réalisé en parallèle la quantification d'un ADN endogène ubiquitaire, celui du glyceraldéhyde-3-phosphate (GAPDH). Pour identifier les produits de la RT-PCR, on réalise une migration sur gel d'agarose (2,5%) contenant du bromure d'éthidium. Le niveau d'expression est calculé en mesurant le rapport des intensités lumineuses des bandes correspondant à l'ADN étudié. Les mesures d'intensité sont réalisées grâce au logiciel Scion Image.

9. Analyses statistiques

Les valeurs numériques sont des moyennes \pm l'erreur standard. La comparaison des données entre deux groupes de données a été réalisée par un test de Student. Lorsque la valeur de p est inférieure à 0,05 ($p < 0,05$) alors on considère le résultat significatif.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(Pour l'introduction bibliographique, la discussion et la conclusion)

Adams, J. W., and Brown, J. H. (2001). G-proteins in growth and apoptosis: lessons from the heart. *Oncogene* 20, 1626-1634.

Adams, J. W., Sakata, Y., Davis, M. G., Sah, V. P., Wang, Y., Liggett, S. B., Chien, K. R., Brown, J. H., and Dorn, G. W., 2nd (1998). Enhanced Galphaq signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10140-10145.

Ahn, A., Frishman, W. H., Gutwein, A., Passeri, J., and Nelson, M. (2008a). Therapeutic angiogenesis: a new treatment approach for ischemic heart disease--part I. *Cardiol Rev* 16, 163-171.

Ahn, A., Frishman, W. H., Gutwein, A., Passeri, J., and Nelson, M. (2008b). Therapeutic angiogenesis: a new treatment approach for ischemic heart disease--Part II. *Cardiol Rev* 16, 219-229.

Aird, W. C. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* 100, 174-190.

Anversa, P., and Nadal-Ginard, B. (2002). Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature* 415, 240-243.

Asahara, T., Takahashi, T., Masuda, H., Kalka, C., Chen, D., Iwaguro, H., Inai, Y., Silver, M., and Isner, J. M. (1999). VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J* 18, 3964-3972.

Balligand, J. L. (1999). Regulation of cardiac beta-adrenergic response by nitric oxide. *Cardiovasc Res* 43, 607-620.

Barile, L., Chimenti, I., Gaetani, R., Forte, E., Miraldi, F., Frati, G., Messina, E., and Giacomello, A. (2007a). Cardiac stem cells: isolation, expansion and experimental use for myocardial regeneration. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 4 *Suppl 1*, S9-S14.

Barile, L., Messina, E., Giacomello, A., and Marban, E. (2007b). Endogenous cardiac stem cells. *Prog Cardiovasc Dis* 50, 31-48.

Battersby, S., Critchley, H. O., Morgan, K., Millar, R. P., and Jabbour, H. N. (2004). Expression and regulation of the prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bv8) and their receptors in the human endometrium across the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2463-2469.

- Becker, A. J., Mc, C. E., and Till, J. E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197, 452-454.
- Beltrami, A. P., Urbanek, K., Kajstura, J., Yan, S. M., Finato, N., Bussani, R., Nadal-Ginard, B., Silvestri, F., Leri, A., Beltrami, C. A., and Anversa, P. (2001). Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 344, 1750-1757.
- Bergmann, O., Bhardwaj, R. D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabe-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B. A., Druid, H., *et al.* (2009). Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324, 98-102.
- Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 40, 845-859.
- Bockaert, J., and Pin, J. P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* 18, 1723-1729.
- Bodi, I., Mikala, G., Koch, S. E., Akhter, S. A., and Schwartz, A. (2005). The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest* 115, 3306-3317.
- Bohm, M., Gierschik, P., Jakobs, K. H., Pieske, B., Schnabel, P., Ungerer, M., and Erdmann, E. (1990). Increase of Gi alpha in human hearts with dilated but not ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 82, 1249-1265.
- Bowman, J. C., Steinberg, S. F., Jiang, T., Geenen, D. L., Fishman, G. I., and Buttrick, P. M. (1997). Expression of protein kinase C beta in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates. *J Clin Invest* 100, 2189-2195.
- Braz, J. C., Gregory, K., Pathak, A., Zhao, W., Sahin, B., Klevitsky, R., Kimball, T. F., Lorenz, J. N., Nairn, A. C., Liggett, S. B., *et al.* (2004). PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med* 10, 248-254.
- Brutsaert, D. L. (2003). Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiol Rev* 83, 59-115.
- Budd, D. C., McDonald, J., Emsley, N., Cain, K., and Tobin, A. B. (2003). The C-terminal tail of the M3-muscarinic receptor possesses anti-apoptotic properties. *J Biol Chem* 278, 19565-19573.
- Bullock, C. M., Li, J. D., and Zhou, Q. Y. (2004). Structural determinants required for the bioactivities of prokineticins and identification of prokineticin receptor antagonists. *Mol Pharmacol* 65, 582-588.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6, 389-395.
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9, 653-660.
- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-936.
- Carmeliet, P., and Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.

- Carmeliet, P., Ng, Y. S., Nuyens, D., Theilmeier, G., Brusselmans, K., Cornelissen, I., Ehler, E., Kakkar, V. V., Stalmans, I., Mattot, V., *et al.* (1999). Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med* 5, 495-502.
- Cattaneo, M. G., Chini, B., and Vicentini, L. M. (2008). Oxytocin stimulates migration and invasion in human endothelial cells. *Br J Pharmacol* 153, 728-736.
- Chen, J., Kuei, C., Sutton, S., Wilson, S., Yu, J., Kamme, F., Mazur, C., Lovenberg, T., and Liu, C. (2005). Identification and pharmacological characterization of prokineticin 2 beta as a selective ligand for prokineticin receptor 1. *Mol Pharmacol* 67, 2070-2076.
- Chen, T. H., Chang, T. C., Kang, J. O., Choudhary, B., Makita, T., Tran, C. M., Burch, J. B., Eid, H., and Sucov, H. M. (2002). Epicardial induction of fetal cardiomyocyte proliferation via a retinoic acid-inducible trophic factor. *Dev Biol* 250, 198-207.
- Cheng, M. Y., Bullock, C. M., Li, C., Lee, A. G., Bermak, J. C., Belluzzi, J., Weaver, D. R., Leslie, F. M., and Zhou, Q. Y. (2002). Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 417, 405-410.
- Chien, K. R. (1999). Stress pathways and heart failure. *Cell* 98, 555-558.
- Chien, K. R., Domian, I. J., and Parker, K. K. (2008). Cardiogenesis and the complex biology of regenerative cardiovascular medicine. *Science* 322, 1494-1497.
- D'Angelo, D. D., Sakata, Y., Lorenz, J. N., Boivin, G. P., Walsh, R. A., Liggett, S. B., and Dorn, G. W., 2nd (1997). Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8121-8126.
- DeGeorge, B. R., Jr., Gao, E., Boucher, M., Vinge, L. E., Martini, J. S., Raake, P. W., Chuprun, J. K., Harris, D. M., Kim, G. W., Soltys, S., *et al.* (2008). Targeted inhibition of cardiomyocyte Gi signaling enhances susceptibility to apoptotic cell death in response to ischemic stress. *Circulation* 117, 1378-1387.
- Dimmeler, S., Zeiher, A. M., and Schneider, M. D. (2005). Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest* 115, 572-583.
- Donato, M., and Gelpi, R. J. (2003). Adenosine and cardioprotection during reperfusion--an overview. *Mol Cell Biochem* 251, 153-159.
- Dorn, G. W., 2nd, and Force, T. (2005). Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 115, 527-537.
- Dorsch, M., Qiu, Y., Soler, D., Frank, N., Duong, T., Goodearl, A., O'Neil, S., Lora, J., and Fraser, C. C. (2005). PK1/EG-VEGF induces monocyte differentiation and activation. *J Leukoc Biol* 78, 426-434.
- Endemann, D. H., and Schiffrin, E. L. (2004). Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 15, 1983-1992.
- Ferrara, N., and Kerbel, R. S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438, 967-974.

- Flower, D. R. (1999). Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim Biophys Acta* 1422, 207-234.
- Fong, G. H. (2008). Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia. *Angiogenesis* 11, 121-140.
- Ford, C. E., Skiba, N. P., Bae, H., Daaka, Y., Reuveny, E., Shekter, L. R., Rosal, R., Weng, G., Yang, C. S., Iyengar, R., *et al.* (1998). Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors. *Science* 280, 1271-1274.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G., and Schioth, H. B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralagon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63, 1256-1272.
- Fredriksson, R., and Schioth, H. B. (2005). The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol* 67, 1414-1425.
- Garlanda, C., Parravicini, C., Sironi, M., De Rossi, M., Wainstok de Calmanovici, R., Carozzi, F., Bussolino, F., Colotta, F., Mantovani, A., and Vecchi, A. (1994). Progressive growth in immunodeficient mice and host cell recruitment by mouse endothelial cells transformed by polyoma middle-sized T antigen: implications for the pathogenesis of opportunistic vascular tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7291-7295.
- Harada, K., Friedman, M., Lopez, J. J., Wang, S. Y., Li, J., Prasad, P. V., Pearlman, J. D., Edelman, E. R., Sellke, F. W., and Simons, M. (1996). Vascular endothelial growth factor administration in chronic myocardial ischemia. *Am J Physiol* 270, H1791-1802.
- Harada, K., Sugaya, T., Murakami, K., Yazaki, Y., and Komuro, I. (1999). Angiotensin II type 1A receptor knockout mice display less left ventricular remodeling and improved survival after myocardial infarction. *Circulation* 100, 2093-2099.
- Hatcher, C. J., and Basson, C. T. (2003). Modeling development of the epicardium and coronary vasculature: in vitro veritas? *Circ Res* 92, 477-479.
- Hescheler, J., Meyer, R., Plant, S., Krautwurst, D., Rosenthal, W., and Schultz, G. (1991). Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circ Res* 69, 1476-1486.
- Higashi, Y., Noma, K., Yoshizumi, M., and Kihara, Y. (2009). Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 73, 411-418.
- Horrigan, M. C., Malycky, J. L., Ellis, S. G., Topol, E. J., and Nicolini, F. A. (1999). Reduction in myocardial infarct size by basic fibroblast growth factor following coronary occlusion in a canine model. *Int J Cardiol* 68 Suppl 1, S85-91.
- Howes, A. L., Arthur, J. F., Zhang, T., Miyamoto, S., Adams, J. W., Dorn, G. W., 2nd, Woodcock, E. A., and Brown, J. H. (2003). Akt-mediated cardiomyocyte survival pathways are compromised by G alpha q-induced phosphoinositide 4,5-bisphosphate depletion. *J Biol Chem* 278, 40343-40351.

- Howes, A. L., Miyamoto, S., Adams, J. W., Woodcock, E. A., and Brown, J. H. (2006). Galphaq expression activates EGFR and induces Akt mediated cardiomyocyte survival: dissociation from Galphaq mediated hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* *40*, 597-604.
- Hu, W. P., Zhang, C., Li, J. D., Luo, Z. D., Amadesi, S., Bunnett, N., and Zhou, Q. Y. (2006). Impaired pain sensation in mice lacking prokineticin 2. *Mol Pain* *2*, 35.
- Hubbard, K. B., and Hepler, J. R. (2006). Cell signalling diversity of the Gqalpha family of heterotrimeric G proteins. *Cell Signal* *18*, 135-150.
- Inagaki, K., Churchill, E., and Mochly-Rosen, D. (2006). Epsilon protein kinase C as a potential therapeutic target for the ischemic heart. *Cardiovasc Res* *70*, 222-230.
- Iwase, M., Bishop, S. P., Uechi, M., Vatner, D. E., Shannon, R. P., Kudej, R. K., Wight, D. C., Wagner, T. E., Ishikawa, Y., Homcy, C. J., and Vatner, S. F. (1996). Adverse effects of chronic endogenous sympathetic drive induced by cardiac GS alpha overexpression. *Circ Res* *78*, 517-524.
- Joggerst, S. J., and Hatzopoulos, A. K. (2009). Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers. *Expert Rev Mol Med* *11*, e20.
- Jujo, K., Ii, M., and Losordo, D. W. (2008). Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* *45*, 530-544.
- Kajstura, J., Rota, M., Whang, B., Cascapera, S., Hosoda, T., Bearzi, C., Nurzynska, D., Kasahara, H., Zias, E., Bonafe, M., *et al.* (2005). Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res* *96*, 127-137.
- Kaser, A., Winklmayr, M., Lepperdinger, G., and Kreil, G. (2003). The AVIT protein family. Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions. *EMBO Rep* *4*, 469-473.
- Keramidas, M., Faudot, C., Cibiel, A., Feige, J. J., and Thomas, M. (2008). Mitogenic functions of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bombina variegata 8 on steroidogenic adrenocortical cells. *J Endocrinol* *196*, 473-482.
- Kisliouk, T., Podlovni, H., Spanel-Borowski, K., Ovadia, O., Zhou, Q. Y., and Meidan, R. (2005). Prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and BV8) in the bovine ovary: expression and role as mitogens and survival factors for corpus luteum-derived endothelial cells. *Endocrinology* *146*, 3950-3958.
- Kong, L., Andrassy, M., Chang, J. S., Huang, C., Asai, T., Szabolcs, M. J., Homma, S., Liu, R., Zou, Y. S., Leitges, M., *et al.* (2008). PKCbeta modulates ischemia-reperfusion injury in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *294*, H1862-1870.
- Krenning, G., van Luyn, M. J., and Harmsen, M. C. (2009). Endothelial progenitor cell-based neovascularization: implications for therapy. *Trends Mol Med* *15*, 180-189.
- Kruithof, B. P., van Wijk, B., Somi, S., Kruithof-de Julio, M., Perez Pomares, J. M., Weesie, F., Wessels, A., Moorman, A. F., and van den Hoff, M. J. (2006). BMP and FGF regulate the differentiation of multipotential pericardial mesoderm into the myocardial or epicardial lineage. *Dev Biol* *295*, 507-522.

- LeCouter, J., Kowalski, J., Foster, J., Hass, P., Zhang, Z., Dillard-Telm, L., Frantz, G., Rangell, L., DeGuzman, L., Keller, G. A., *et al.* (2001). Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* *412*, 877-884.
- LeCouter, J., Lin, R., Tejada, M., Frantz, G., Peale, F., Hillan, K. J., and Ferrara, N. (2003). The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: Localization of Bv8 receptors to endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 2685-2690.
- LeCouter, J., Zlot, C., Tejada, M., Peale, F., and Ferrara, N. (2004). Bv8 and endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 16813-16818.
- Lee, Y. L., Chan, Y. L., Chow, W. N., Ng, E. H., Lee, K. F., Yeung, W. S., and Ho, P. C. (2009). Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulates proliferation and tube formation in human uterine microvascular endothelial cell through the mitogen-activated protein kinase but not through the Akt pathway. *Fertil Steril* *91*, 2163-2171.
- Lerman, A., and Zeiher, A. M. (2005). Endothelial function: cardiac events. *Circulation* *111*, 363-368.
- Li, M., Bullock, C. M., Knauer, D. J., Ehlert, F. J., and Zhou, Q. Y. (2001). Identification of two prokineticin cDNAs: recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. *Mol Pharmacol* *59*, 692-698.
- Libby, P., Ridker, P. M., and Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* *105*, 1135-1143.
- Lie-Venema, H., Eralp, I., Maas, S., Gittenberger-De Groot, A. C., Poelmann, R. E., and DeRuiter, M. C. (2005). Myocardial heterogeneity in permissiveness for epicardium-derived cells and endothelial precursor cells along the developing heart tube at the onset of coronary vascularization. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* *282*, 120-129.
- Lie-Venema, H., van den Akker, N. M., Bax, N. A., Winter, E. M., Maas, S., Kekarainen, T., Hoeben, R. C., deRuiter, M. C., Poelmann, R. E., and Gittenberger-de Groot, A. C. (2007). Origin, fate, and function of epicardium-derived cells (EPDCs) in normal and abnormal cardiac development. *ScientificWorldJournal* *7*, 1777-1798.
- Lin, D. C., Bullock, C. M., Ehlert, F. J., Chen, J. L., Tian, H., and Zhou, Q. Y. (2002a). Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* *277*, 19276-19280.
- Lin, R., LeCouter, J., Kowalski, J., and Ferrara, N. (2002b). Characterization of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor signaling in adrenal cortex capillary endothelial cells. *J Biol Chem* *277*, 8724-8729.
- Logothetis, D. E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, E. J., and Clapham, D. E. (1987). The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* *325*, 321-326.
- Lopez, J. J., Edelman, E. R., Stamler, A., Hibberd, M. G., Prasad, P., Thomas, K. A., DiSalvo, J., Caputo, R. P., Carrozza, J. P., Douglas, P. S., *et al.* (1998a). Angiogenic potential of

perivascularly delivered aFGF in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *Am J Physiol* 274, H930-936.

Lopez, J. J., Laham, R. J., Stamler, A., Pearlman, J. D., Bunting, S., Kaplan, A., Carrozza, J. P., Sellke, F. W., and Simons, M. (1998b). VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs. *Cardiovasc Res* 40, 272-281.

Losordo, D. W., and Dimmeler, S. (2004). Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation* 109, 2692-2697.

Maldonado-Perez, D., Evans, J., Denison, F., Millar, R. P., and Jabbour, H. N. (2007). Potential roles of the prokineticins in reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 18, 66-72.

Manner, J. (1999). Does the subepicardial mesenchyme contribute myocardioblasts to the myocardium of the chick embryo heart? A quail-chick chimera study tracing the fate of the epicardial primordium. *Anat Rec* 255, 212-226.

Marinissen, M. J., and Gutkind, J. S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 22, 368-376.

Masuda, Y., Takatsu, Y., Terao, Y., Kumano, S., Ishibashi, Y., Suenaga, M., Abe, M., Fukusumi, S., Watanabe, T., Shintani, Y., *et al.* (2002). Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 396-402.

Matsumoto, S., Yamazaki, C., Masumoto, K. H., Nagano, M., Naito, M., Soga, T., Hiyama, H., Matsumoto, M., Takasaki, J., Kamohara, M., *et al.* (2006). Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4140-4145.

Matsuura, K., Nagai, T., Nishigaki, N., Oyama, T., Nishi, J., Wada, H., Sano, M., Toko, H., Akazawa, H., Sato, T., *et al.* (2004). Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem* 279, 11384-11391.

McCloskey, D. T., Turcato, S., Wang, G. Y., Turnbull, L., Zhu, B. Q., Bambino, T., Nguyen, A. P., Lovett, D. H., Nissenson, R. A., Karliner, J. S., and Baker, A. J. (2008). Expression of a Gi-coupled receptor in the heart causes impaired Ca²⁺ handling, myofilament injury, and dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H205-212.

McCulloch, E. A., and Till, J. E. (1960). The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat Res* 13, 115-125.

Melchiorri, D., Bruno, V., Besong, G., Ngomba, R. T., Cuomo, L., De Blasi, A., Copani, A., Moschella, C., Storto, M., Nicoletti, F., *et al.* (2001). The mammalian homologue of the novel peptide Bv8 is expressed in the central nervous system and supports neuronal survival by activating the MAP kinase/PI-3-kinase pathways. *Eur J Neurosci* 13, 1694-1702.

Mikawa, T., and Fischman, D. A. (1992). Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9504-9508.

- Mikawa, T., and Gourdie, R. G. (1996). Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Dev Biol* 174, 221-232.
- Mollay, C., Wechselberger, C., Mignogna, G., Negri, L., Melchiorri, P., Barra, D., and Kreil, G. (1999). Bv8, a small protein from frog skin and its homologue from snake venom induce hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol* 374, 189-196.
- Mombouli, J. V., and Vanhoutte, P. M. (1999). Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* 31, 61-74.
- Morabito, C. J., Dettman, R. W., Kattan, J., Collier, J. M., and Bristow, J. (2001). Positive and negative regulation of epicardial-mesenchymal transformation during avian heart development. *Dev Biol* 234, 204-215.
- Mudd, J. O., and Kass, D. A. (2008). Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* 451, 919-928.
- Munoz-Chapuli, R., Gonzalez-Iriarte, M., Carmona, R., Atencia, G., Macias, D., and Perez-Pomares, J. M. (2002). Cellular precursors of the coronary arteries. *Tex Heart Inst J* 29, 243-249.
- Nebigil, C. G., Choi, D. S., Dierich, A., Hickel, P., Le Meur, M., Messaddeq, N., Launay, J. M., and Maroteaux, L. (2000). Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9508-9513.
- Neer, E. J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80, 249-257.
- Negri, L., Lattanzi, R., Giannini, E., Colucci, M., Margheriti, F., Melchiorri, P., Vellani, V., Tian, H., De Felice, M., and Porreca, F. (2006). Impaired nociception and inflammatory pain sensation in mice lacking the prokineticin receptor PKR1: focus on interaction between PKR1 and the capsaicin receptor TRPV1 in pain behavior. *J Neurosci* 26, 6716-6727.
- Negri, L., Lattanzi, R., Giannini, E., Metere, A., Colucci, M., Barra, D., Kreil, G., and Melchiorri, P. (2002). Nociceptive sensitization by the secretory protein Bv8. *Br J Pharmacol* 137, 1147-1154.
- Newton, G. E., Parker, A. B., Landzberg, J. S., Colucci, W. S., and Parker, J. D. (1996). Muscarinic receptor modulation of basal and beta-adrenergic stimulated function of the failing human left ventricle. *J Clin Invest* 98, 2756-2763.
- Ng, K. L., Li, J. D., Cheng, M. Y., Leslie, F. M., Lee, A. G., and Zhou, Q. Y. (2005). Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science* 308, 1923-1927.
- Ngan, E. S., Lee, K. Y., Sit, F. Y., Poon, H. C., Chan, J. K., Sham, M. H., Lui, V. C., and Tam, P. K. (2007a). Prokineticin-1 modulates proliferation and differentiation of enteric neural crest cells. *Biochim Biophys Acta* 1773, 536-545.

- Ngan, E. S., Lee, K. Y., Yeung, W. S., Ngan, H. Y., Ng, E. H., and Ho, P. C. (2006). Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor is expressed in human peri-implantation endometrium, but not in endometrial carcinoma. *Endocrinology* *147*, 88-95.
- Ngan, E. S., Shum, C. K., Poon, H. C., Sham, M. H., Garcia-Barcelo, M. M., Lui, V. C., and Tam, P. K. (2008). Prokineticin-1 (Prok-1) works coordinately with glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) to mediate proliferation and differentiation of enteric neural crest cells. *Biochim Biophys Acta* *1783*, 467-478.
- Ngan, E. S., Sit, F. Y., Lee, K., Miao, X., Yuan, Z., Wang, W., Nicholls, J. M., Wong, K. K., Garcia-Barcelo, M., Lui, V. C., and Tam, P. K. (2007b). Implications of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 signaling in human neuroblastoma progression. *Clin Cancer Res* *13*, 868-875.
- Ngan, E. S., and Tam, P. K. (2008). Prokineticin-signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol* *40*, 1679-1684.
- Offermanns, S., Mancino, V., Revel, J. P., and Simon, M. I. (1997). Vascular system defects and impaired cell chemokinesis as a result of Galpha13 deficiency. *Science* *275*, 533-536.
- Offermanns, S., Zhao, L. P., Gohla, A., Sarosi, I., Simon, M. I., and Wilkie, T. M. (1998). Embryonic cardiomyocyte hypoplasia and craniofacial defects in G alpha q/G alpha 11-mutant mice. *Embo J* *17*, 4304-4312.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., *et al.* (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* *410*, 701-705.
- Ott, H. C., Matthiesen, T. S., Brechtken, J., Grindle, S., Goh, S. K., Nelson, W., and Taylor, D. A. (2007). The adult human heart as a source for stem cells: repair strategies with embryonic-like progenitor cells. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* *4 Suppl 1*, S27-39.
- Paradis, P., Dali-Youcef, N., Paradis, F. W., Thibault, G., and Nemer, M. (2000). Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 931-936.
- Passier, R., van Laake, L. W., and Mummery, C. L. (2008). Stem-cell-based therapy and lessons from the heart. *Nature* *453*, 322-329.
- Perez-Pomares, J. M., Carmona, R., Gonzalez-Iriarte, M., Atencia, G., Wessels, A., and Munoz-Chapuli, R. (2002a). Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos. *Int J Dev Biol* *46*, 1005-1013.
- Perez-Pomares, J. M., Phelps, A., Sedmerova, M., Carmona, R., Gonzalez-Iriarte, M., Munoz-Chapuli, R., and Wessels, A. (2002b). Experimental studies on the spatiotemporal expression of WT1 and RALDH2 in the embryonic avian heart: a model for the regulation of myocardial and valvuloseptal development by epicardially derived cells (EPDCs). *Dev Biol* *247*, 307-326.
- Pitteloud, N., Zhang, C., Pignatelli, D., Li, J. D., Raivio, T., Cole, L. W., Plummer, L., Jacobson-Dickman, E. E., Mellon, P. L., Zhou, Q. Y., and Crowley, W. F., Jr. (2007). Loss-

of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17447-17452.

Podlovni, H., Ovadia, O., Kisliouk, T., Klipper, E., Zhou, Q. Y., Friedman, A., Alfaidy, N., and Meidan, R. (2006). Differential expression of prokineticin receptors by endothelial cells derived from different vascular beds: a physiological basis for distinct endothelial function. *Cell Physiol Biochem* 18, 315-326.

Poelmann, R. E., Gittenberger-de Groot, A. C., Mentink, M. M., Bokenkamp, R., and Hogers, B. (1993). Development of the cardiac coronary vascular endothelium, studied with antiendothelial antibodies, in chicken-quail chimeras. *Circ Res* 73, 559-568.

Ponicke, K., Vogelsang, M., Heinroth, M., Becker, K., Zolk, O., Bohm, M., Zerkowski, H. R., and Brodde, O. E. (1998). Endothelin receptors in the failing and nonfailing human heart. *Circulation* 97, 744-751.

Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 9, 677-684.

Rajanayagam, M. A., Shou, M., Thirumurti, V., Lazarous, D. F., Quyyumi, A. A., Goncalves, L., Stiber, J., Epstein, S. E., and Unger, E. F. (2000). Intracoronary basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral perfusion in dogs. *J Am Coll Cardiol* 35, 519-526.

Richard, D. E., Vouret-Craviari, V., and Pouyssegur, J. (2001). Angiogenesis and G-protein-coupled receptors: signals that bridge the gap. *Oncogene* 20, 1556-1562.

Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G., and Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459, 356-363.

Rosenblatt-Velin, N., Lepore, M. G., Cartoni, C., Beermann, F., and Pedrazzini, T. (2005). FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes. *J Clin Invest* 115, 1724-1733.

Rota, M., Kajstura, J., Hosoda, T., Bearzi, C., Vitale, S., Esposito, G., Iaffaldano, G., Padin-Iruegas, M. E., Gonzalez, A., Rizzi, R., *et al.* (2007). Bone marrow cells adopt the cardiomyogenic fate in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17783-17788.

Ruppel, K. M., Willison, D., Kataoka, H., Wang, A., Zheng, Y. W., Cornelissen, I., Yin, L., Xu, S. M., and Coughlin, S. R. (2005). Essential role for Galpha13 in endothelial cells during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8281-8286.

Salazar, N. C., Chen, J., and Rockman, H. A. (2007). Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochim Biophys Acta* 1768, 1006-1018.

Schweitz, H., Pacaud, P., Diochot, S., Moinier, D., and Lazdunski, M. (1999). MIT(1), a black mamba toxin with a new and highly potent activity on intestinal contraction. *FEBS Lett* 461, 183-188.

Segers, V. F., and Lee, R. T. (2008). Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature* 451, 937-942.

- Sieveking, D. P., and Ng, M. K. (2009). Cell therapies for therapeutic angiogenesis: back to the bench. *Vasc Med* 14, 153-166.
- Smart, N., Dube, K. N., and Riley, P. R. (2009). Coronary vessel development and insight towards neovascular therapy. *Int J Exp Pathol* 90, 262-283.
- Smart, N., and Riley, P. R. (2008). The stem cell movement. *Circ Res* 102, 1155-1168.
- Smart, N., Risebro, C. A., Melville, A. A., Moses, K., Schwartz, R. J., Chien, K. R., and Riley, P. R. (2007a). Thymosin beta4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. *Nature* 445, 177-182.
- Smart, N., Risebro, C. A., Melville, A. A., Moses, K., Schwartz, R. J., Chien, K. R., and Riley, P. R. (2007b). Thymosin beta-4 is essential for coronary vessel development and promotes neovascularization via adult epicardium. *Ann N Y Acad Sci* 1112, 171-188.
- Smit, M. J., Vischer, H. F., Bakker, R. A., Jongejan, A., Timmerman, H., Pardo, L., and Leurs, R. (2007). Pharmacogenomic and structural analysis of constitutive G protein-coupled receptor activity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, 53-87.
- Soga, T., Matsumoto, S., Oda, T., Saito, T., Hiyama, H., Takasaki, J., Kamohara, M., Ohishi, T., Matsushime, H., and Furuichi, K. (2002). Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochim Biophys Acta* 1579, 173-179.
- Tammela, T., Enholm, B., Alitalo, K., and Paavonen, K. (2005). The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 65, 550-563.
- Tang, C. M., and Insel, P. A. (2004). GPCR expression in the heart; "new" receptors in myocytes and fibroblasts. *Trends Cardiovasc Med* 14, 94-99.
- Tang, Y. L., Shen, L., Qian, K., and Phillips, M. I. (2007). A novel two-step procedure to expand cardiac Sca-1+ cells clonally. *Biochem Biophys Res Commun* 359, 877-883.
- Tevosian, S. G., Deconinck, A. E., Tanaka, M., Schinke, M., Litovsky, S. H., Izumo, S., Fujiwara, Y., and Orkin, S. H. (2000). FOG-2, a cofactor for GATA transcription factors, is essential for heart morphogenesis and development of coronary vessels from epicardium. *Cell* 101, 729-739.
- Urbanek, K., Cesselli, D., Rota, M., Nascimbene, A., De Angelis, A., Hosoda, T., Bearzi, C., Boni, A., Bolli, R., Kajstura, J., *et al.* (2006). Stem cell niches in the adult mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9226-9231.
- van Tuyn, J., Atsma, D. E., Winter, E. M., van der Velde-van Dijke, I., Pijnappels, D. A., Bax, N. A., Knaan-Shanzer, S., Gittenberger-de Groot, A. C., Poelmann, R. E., van der Laarse, A., *et al.* (2007). Epicardial cells of human adults can undergo an epithelial-to-mesenchymal transition and obtain characteristics of smooth muscle cells in vitro. *Stem Cells* 25, 271-278.
- van Vliet, P., Roccio, M., Smits, A. M., van Oorschot, A. A., Metz, C. H., van Veen, T. A., Sluijter, J. P., Doevendans, P. A., and Goumans, M. J. (2008). Progenitor cells isolated from the human heart: a potential cell source for regenerative therapy. *Neth Heart J* 16, 163-169.

- Wada, A. M., Smith, T. K., Osler, M. E., Reese, D. E., and Bader, D. M. (2003). Epicardial/Mesothelial cell line retains vasculogenic potential of embryonic epicardium. *Circ Res* 92, 525-531.
- Wakasaki, H., Koya, D., Schoen, F. J., Jirousek, M. R., Ways, D. K., Hoit, B. D., Walsh, R. A., and King, G. L. (1997). Targeted overexpression of protein kinase C beta2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9320-9325.
- Wang, K., and Wong, Y. H. (2009). G protein signaling controls the differentiation of multiple cell lineages. *Biofactors* 35, 232-238.
- Wang, X., Hu, Q., Nakamura, Y., Lee, J., Zhang, G., From, A. H., and Zhang, J. (2006). The role of the sca-1+/CD31- cardiac progenitor cell population in postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells* 24, 1779-1788.
- Welt, F. G., and Losordo, D. W. (2006). Cell therapy for acute myocardial infarction: curb your enthusiasm? *Circulation* 113, 1272-1274.
- Wessels, A., and Perez-Pomares, J. M. (2004). The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 276, 43-57.
- Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 85, 1159-1204.
- Wettschureck, N., Rutten, H., Zywietz, A., Gehring, D., Wilkie, T. M., Chen, J., Chien, K. R., and Offermanns, S. (2001). Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Galphaq/Galpha11 in cardiomyocytes. *Nat Med* 7, 1236-1240.
- Winter, E. M., and Gittenberger-de Groot, A. C. (2007). Epicardium-derived cells in cardiogenesis and cardiac regeneration. *Cell Mol Life Sci* 64, 692-703.
- Winter, E. M., Grauss, R. W., Hogers, B., van Tuyn, J., van der Geest, R., Lie-Venema, H., Steijn, R. V., Maas, S., DeRuiter, M. C., deVries, A. A., *et al.* (2007). Preservation of left ventricular function and attenuation of remodeling after transplantation of human epicardium-derived cells into the infarcted mouse heart. *Circulation* 116, 917-927.
- Wirth, A., Benyo, Z., Lukasova, M., Leutgeb, B., Wettschureck, N., Gorbey, S., Orsy, P., Horvath, B., Maser-Gluth, C., Greiner, E., *et al.* (2008). G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nat Med* 14, 64-68.
- Woodcock, E. A., and Matkovich, S. J. (2005). Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1746-1751.
- Worzfeld, T., Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2008). G(12)/G(13)-mediated signalling in mammalian physiology and disease. *Trends Pharmacol Sci* 29, 582-589.
- Xu, H. X., Li, G. S., Jiang, H., Wang, J., Lu, J. J., Jiang, W., Qian, H. Y., Jiang, X. J., Li, X. Y., Li, J. J., and Liu, W. H. (2004). Implantation of BM cells transfected with phVEGF165 enhances functional improvement of the infarcted heart. *Cytotherapy* 6, 204-211.

Zeng, H., Zhao, D., and Mukhopadhyay, D. (2002). KDR stimulates endothelial cell migration through heterotrimeric G protein Gq/11-mediated activation of a small GTPase RhoA. *J Biol Chem* 277, 46791-46798.

Zhou, B., Ma, Q., Rajagopal, S., Wu, S. M., Domian, I., Rivera-Feliciano, J., Jiang, D., von Gise, A., Ikeda, S., Chien, K. R., and Pu, W. T. (2008). Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* 454, 109-113.

Zhu, W. Z., Hauch, K. D., Xu, C., and Laflamme, M. A. (2009). Human embryonic stem cells and cardiac repair. *Transplant Rev (Orlando)* 23, 53-68.