



Université de Montréal

**Le peptide natriurétique auriculaire induit la  
différenciation cardiaque dans les cellules souches  
embryonnaires carcinomateuses de souris P19**

Par

Christophe Fadainia

Département des Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de Maîtrise

en Sciences Biomédicales

Option Générale

Juillet 2012

© Christophe Fadainia, 2012



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Le peptide natriurétique auriculaire induit la différenciation cardiaque dans les cellules  
souches embryonnaires carcinomateuses de souris P19.

Présenté par :  
Christophe Fadainia

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Johanne Tremblay, présidente-rapporteur  
Dr Marek Jankowski, directeur de recherche  
Dr Jolanta Gutkowska, co-directrice de recherche  
Dr Yan Burelle, membre du jury

## DÉDICACES

Je souhaiterais dédier ce travail à tous les membres de ma famille qui ont su être présent pour moi lorsque j'avais besoin d'eux. Je souhaiterais plus particulièrement remercier mes parents Florence et Armand Fadainia, mon frère Rouzbeh Fadainia ainsi que mes oncle et tante Gilbert Mahoux et Andrée Aligros, pour leur soutien perpétuel et leur contribution à la réalisation de cette œuvre.

Je souhaiterais faire une dédicace toute particulière à mon petit neveu Armine Fadainia, à qui je souhaite tout le meilleur du monde.

## REMERCIEMENTS

Je souhaiterais tout d'abord remercier les professeurs Jolanta Gutkowska et Marek Jankowski de m'avoir accueilli chaleureusement dans leur laboratoire de recherche. Du fond de mon cœur, je vous témoigne mes sincères remerciements pour m'avoir guidé tout au long de ma formation de maîtrise et pour avoir mis à ma disposition les moyens requis pour l'aboutissement de ce travail. Excellente pédagogie, vulgarisation de nos travaux de recherche, apprentissage de l'élaboration d'hypothèses, développement de l'esprit critique et autonomie, telles sont les notions que vous m'avez inculqué tout au long de ma maîtrise.

Je souhaiterais aussi remercier tous les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mon mémoire en dépit de leurs charges de travail et de leurs occupations personnelles. Un grand merci à vous tous.

Je souhaiterais tout particulièrement remercier les Dr Wang Donghao, Ahmed Menaouar et Bogdan Danalache pour leur soutien théorique et pratique en biologie moléculaire, en culture cellulaire et en microscopie. J'aimerais vous témoigner mes plus sincères remerciements pour votre aide dans l'apprentissage des méthodologies et des bonnes conduites à suivre en laboratoire, ainsi que pour votre support dans la résolution des problèmes techniques liés à mes expériences.

J'aimerais aussi remercier tous mes amis et particulièrement ceux de mon laboratoire: Araceli Gonzalez-Reyes, Éric Plante, Dominique Genest, Yessoufou Aliou et Rogério Bilheiro pour leur soutien moral et leur aide.

## RÉSUMÉ :

**Introduction :** Traditionnellement associée à la reproduction féminine, l'ocytocine (OT), une hormone peptidique synthétisée par les noyaux paraventriculaire et supraoptique de l'hypothalamus et sécrétée par l'hypophyse postérieure (neurohypophyse), a été récemment revue et a été démontrée avoir plusieurs nouveaux rôles dans le système cardio-vasculaire. En effet, notre laboratoire a montré que l'OT peut induire la différenciation des cellules souches embryonnaires (CSE) en cardiomyocytes (CM) fonctionnels. À l'aide du modèle cellulaire embryonnaire carcinomateux de souris P19, il a été démontré que ce processus survenait suite à la libération de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) dépendante du monoxyde d'azote. De même, il est connu que le peptide natriurétique auriculaire (ANP), un peptide produit, stocké et sécrété par les myocytes cardiaques, peut aussi induire la production du GMPc. De nombreuses études ont démontré que le cœur ayant subi un infarctus pouvait être régénéré à partir d'une population isolée de cellules souches et progénitrices transplantées. Une de ces populations de cellules, fréquemment isolées à partir d'organes provenant d'animaux aux stades de développement embryonnaire et adulte, appelée « Side Population » (SP), sont identifiées par cytométrie en flux (FACS) comme une population de cellules non marquées par le colorant fluorescent Hoechst 33342 (Ho). Les cellules SP expriment des protéines de transport spécifiques, de la famille ATP-binding cassette, qui ont pour rôle de transporter activement le colorant fluorescent Ho de leur cytoplasme. La sous-population de cellules SP isolée du cœur affiche un potentiel de différenciation cardiaque amélioré en réponse à un traitement avec l'OT. Récemment, l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des CSE a été mise en évidence, et cela a été corrélé avec la présence de sous-populations cellulaires ressemblant beaucoup aux cellules SP issues du cœur. Puisque l'ANP peut induire la production du GMPc et qu'il a été démontré que la différenciation cardiaque était médiée par la production du GMPc, alors nous émettons l'hypothèse selon laquelle l'ANP pourrait induire la différenciation cardiaque. Étant donné que les CSE sont composés d'un mélange de différents types cellulaires alors nous émettons aussi l'hypothèse selon laquelle l'utilisation d'une sous-population de CSE plus homogène renforcerait le potentiel de différenciation de l'ANP.

**Méthodes :** Les SP ont été isolées des cellules P19 par FACS en utilisant la méthode d'exclusion du colorant fluorescent Ho. Puis, leur phénotype a été caractérisé par immunofluorescence (IF) pour les marqueurs de l'état indifférencié, d'auto-renouvellement et de pluripotence octamer-binding transcription factor 4 (OCT4) et stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA1). Ensuite, la dose pharmacologique optimale d'ANP a été déterminée via des tests de cytotoxicité sur des cellules P19 (MTT assay). Pour induire la différenciation en cardiomyocytes, des cellules à l'état de sphéroïdes ont été formées à l'aide de la technique du « Hanging-Drop » sous la stimulation de l'ANP pendant 5 jours. Puis, des cryosections ont été faites dans les sphéroïdes afin de mettre en évidence la présence de marqueurs de cellules cardiaques progénitrices tels que GATA4, Nkx2.5 et un marqueur mitochondrial spécifique Tom22. Ensuite, les cellules SP P19 ont été stimulées dans les sphéroïdes cellulaires par le traitement avec de l'ANP ( $10^{-7}$  M) ou de l'OT ( $10^{-7}$  M), de l'antagoniste spécifique du guanylate cyclase particulé (GCp) A71915 ( $10^{-6}$  M), ainsi que la combinaison des inducteurs OT+ANP, OT+A71915, ANP+A71915. Après la mise en culture, la différenciation en cardiomyocytes a été identifiée par l'apparition de colonies de cellules battantes caractéristiques des cellules cardiaques, par la détermination du phénotype cellulaire par IF, et enfin par l'extraction d'ARN et de protéines qui ont été utilisés pour le dosage du GMPc par RIA, l'expression des ARNm par RT-PCR et l'expression des protéines par immunobuvardage de type western.

**Résultats :** Les sphéroïdes obtenus à l'aide de la technique du « Hanging-Drop » ont montré une hausse modeste de l'expression des ARNm suivants : OTR, ANP et GATA4 comparativement aux cellules cultivées en monocouches. Les sphéroïdes induits par l'ANP ont présenté une augmentation significative des facteurs de transcription cardiaque GATA4 et Nkx2.5 ainsi qu'un plus grand nombre de mitochondries caractérisé par une plus grande présence de Tom22. De plus, L'ANP a induit l'apparition de colonies de cellules battantes du jour 7 (stade précoce) au jour 14 (stade mature) de façon presque similaire à l'OT. Cependant, la combinaison de l'ANP avec l'OT n'a pas induit de colonies de cellules battantes suggérant un effet opposé à celui de l'OT. Par IF, nous avons quantifié (nombre de cellules positives) et caractérisé, du jour 6 au jour 14 de différenciation, le phénotype cardiaque de nos cellules en utilisant les marqueurs suivants : Troponine T Cardiaque, ANP,

Connexines 40 et 43, l'isoforme ventriculaire de la chaîne légère de myosine (MLC-2v), OTR. Les SP différenciées sous la stimulation de l'ANP ont montré une augmentation significative du GMPc intracellulaire comparé aux cellules non différenciées. À notre grande surprise, l'antagoniste A71915 a induit une plus grande apparition de colonies de cellules battantes comparativement à l'OT et l'ANP à un jour précoce de différenciation cardiaque et l'ajout de l'OT ou de l'ANP a potentialisé ses effets, augmentant encore plus la proportion de colonies de cellules battantes. De plus, la taille des colonies de cellules battantes était encore plus importante que sous la simple stimulation de l'OT ou de l'ANP. Les analyses radioimmunologiques dans les cellules SP P19 stimulés avec l'ANP, A71915 et la combinaison des deux pendant 15min, 30min et 60min a montré que l'ANP stimule significativement la production du GMPc, cependant A71915 n'abolit pas les effets de l'ANP et celui-ci au contraire stimule la production du GMPc via des effets agonistes partiels.

**Conclusion :** Nos résultats démontrent d'une part que l'ANP induit la différenciation des cellules SP P19 en CM fonctionnels. D'autre part, il semblerait que la voie de signalisation NPRA-B/GCp/GMPc soit impliquée dans le mécanisme de différenciation cardiaque puisque l'abolition du GMPc médiée par le GCp potentialise la différenciation cardiaque et il semblerait que cette voie de signalisation soit additive de la voie de signalisation induite par l'OT, NO/GCs/GMPc, puisque l'ajout de l'OT à l'antagoniste A71915 stimule plus fortement la différenciation cardiaque que l'OT ou l'A71915 seuls. Cela suggère que l'effet thérapeutique des peptides natriurétiques observé dans la défaillance cardiaque ainsi que les propriétés vasodilatatrices de certains antagonistes des récepteurs peptidiques natriurétiques inclut la stimulation de la différenciation des cellules souches en cardiomyocytes. Cela laisse donc à penser que les peptides natriurétiques ou les antagonistes des récepteurs peptidiques natriurétiques pourraient être une alternative très intéressante dans la thérapie cellulaire visant à induire la régénération cardiovasculaire.

**Mots-clés :** Ocytocine, ANP, cellules souches, différenciation, cardiomyocytes, P19, cardiomyogenèse, induction, Side Population, Hoechst 33342, GMPc.

## **ABSTRACT :**

**Introduction:** Traditionally associated with female reproduction, oxytocin (OT), a peptidic hormone synthesized in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus and secreted by the posterior pituitary (neurohypophysis), was revisited recently and was revealed to have several new roles in the cardiovascular system. Indeed, our laboratory has shown that OT can induce the differentiation of embryonic stem cells (ESC) into functional cardiomyocytes (CM). On the model of embryonal carcinoma cell line P19, it has been shown that this process occurs following the release of cyclic guanosine monophosphate (cGMP)-dependent nitric oxide. Similarly, it is known that atrial natriuretic peptide (ANP), a peptide produced, stored and secreted by cardiac myocytes, can also induce the release of cGMP. However, the cellular mechanisms involved in cardiac differentiation are still poorly understood. Numerous studies have shown that the injured heart can be regenerated from an isolated population of transplanted stem and progenitor cells. One of these cell populations, frequently isolated from embryonic and adult animal organs, called "Side Population" (SP), is characterized by active efflux of the fluorescent dye Hoechst 33342 (Ho). SP cells express specific ATP-binding cassette transporter proteins which actively transport Ho out of their cytoplasm. The SP cell subpopulation isolated from the heart display enhanced differentiation potential into cardiac phenotype in response to OT treatment. Recently, the phenotypic and functional heterogeneity of embryonic stem cells has been demonstrated, and this was correlated with the presence of cell subpopulations much like the SP cells from the heart and these cells can be identified by flow cytometry (FACS) as a population of unmarked cells by the Ho and which exhibit sensitivity to the inhibitor of the family of ATP-binding cassette ABC, verapamil. Thus, the SP from ESC could be a good candidate to induce cell differentiation more effectively to the cardiac phenotype. Since ANP can induce the release of cGMP and it has been shown that cardiac differentiation was mediated by the release of cGMP through the nitric oxide (NO), then we therefore formulate the hypothesis that ANP could also induce cardiac differentiation. Since ESC are composed of a mixture of different cell types so as we emit the hypothesis that the use of a subpopulation of more homogeneous ESC strengthen the differentiation potential of ANP.

**Methods:** SP were isolated from P19 cells by FACS using the method of exclusion of fluorescent dye Hoechst and their phenotype was characterized by immunofluorescence (IF) for markers of the undifferentiated state, self-renewal and pluripotency OCT4 and SSEA1. Then, the optimal pharmacological dose of ANP was determined via cytotoxicity tests in P19 cells (MTT assay). For cardiac differentiation, cells in the form of spheroids were formed using the technique of "Hanging Drop" under the stimulation of ANP for 5 days. Then cuts were made in the spheroids via cryosection to highlight the presence of cardiac progenitor cell markers such as GATA4, Nkx2.5 and a specific mitochondrial marker Tom22. Next, the P19-SP cells were stimulated in cell spheroids by the treatment with ANP ( $10^{-7}$  M) or OT ( $10^{-7}$  M), the specific antagonist of particulate guanylate cyclase A71915 ( $10^{-6}$  M), and the combination of the inducers OT + ANP, OT + A71915, A71915 + ANP. After cell plating, the differentiation into cardiomyocytes has been identified by the appearance of beating cell colonies characteristics of contractile cardiac cells, by determining the cellular phenotype by IF, and finally by the extraction of RNA and proteins that were used for the determination of cGMP by RIA, the mRNA expression by RT-PCR and protein expression by western blotting.

**Results:** The spheroids induced by ANP showed a significant increase in the presence of cardiac transcription factors GATA4 and Nkx2.5 as well as a greater number of mitochondria characterized by a greater presence of Tom22 compared with no induced cells suggesting a cardiomyogenic effect of ANP. In addition, ANP induced the appearance of beating cell colonies from day 7 (early stage) to day 14 (mature stage) similarly to OT. However, the combination of ANP with OT did not induce beating cell colonies suggesting a negative additive effect on cardiomyogenesis. The spheroids, obtained using the technique of "Hanging Drop", have shown a modest increase in mRNA expression as follows: OTR, ANP and GATA4 compared to cells grown in monolayers. By IF, we quantified (number of positive cells) and characterized, from day 6 to day 14 of differentiation, the cardiac phenotype of our cells using the following markers: Cardiac Troponin T, ANP, Connexines 40 and 43, Myosin Light Chain-2V, OTR. The SP differentiated under the stimulation of ANP showed a significant increase in intracellular cGMP compared with undifferentiated cells. Surprisingly, the antagonist A71915 induced a greater appearance of beating cell



colonies compared to OT and ANP in early day of cardiac differentiation and the addition of OT or ANP potentiated its effects, further increasing the proportion of beating cells colonies. In addition, the size of beating cell colonies was even greater than under the simple stimulation of OT or ANP. Radioimmunoassay analysis in SP P19 cells stimulated with ANP, A71915 and the combination of both during 15min, 30min and 60min showed that ANP significantly stimulates the release of cGMP, however, A71915 does not abolish the effects of ANP and it rather stimulates the release of cGMP through partial agonist effects.

**Conclusion:** Our results demonstrate firstly that ANP induces the differentiation of P19-SP cells into functional CM. Moreover, it appears that the signaling pathway NPRA-B/pGC/cGMP seems to be involved in the mechanism of cardiac differentiation since the abolition of cGMP mediated by the pGC potentiates cardiac differentiation and it appears that this signaling pathway is additive to the signaling pathway induced by OT, NO/sGC/cGMP, since the addition of OT to the antagonist A71915 stimulates cardiac differentiation more strongly than OT or A71915 alone. This suggests that the therapeutic effect of natriuretic peptides observed in heart failure and vasodilatory properties of certain natriuretic peptide receptor antagonists included the stimulation of stem cell differentiation into cardiomyocytes. This would therefore suggest that the natriuretic peptides or natriuretic peptide receptor antagonists could be an attractive alternative to cell therapy to induce heart regeneration.

**Keywords :** Oxytocin, ANP, stem cell differentiation, cardiomyocytes, P19, cardiomyogenesis, induction, Side population, Hoechst 33342, cGMP.

# Table des matières

<b>DÉDICACES</b> .....	<b>I</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>II</b>
<b>RÉSUMÉ</b> : .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> : .....	<b>VI</b>
<b>LISTE DES SCHÉMAS ET ILLUSTRATIONS</b> : .....	<b>XII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> : .....	<b>XIII</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> : .....	<b>XIV</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> : .....	<b>XVI</b>
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
I.1 LE RÔLE DU CERVEAU DANS L'HOMÉOSTASIE DU CŒUR : .....	2
I.2 L'IMPLICATION DE L'OCYTOCINE DANS LE PROCESSUS DE DIFFÉRENCIATION CARDIAQUE : .....	8
I.3 LE MODÈLE DE DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE P19 : .....	9
I.4 LES « SIDE POPULATION » (SP) DE CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES : .....	12
I.5 INTRODUCTION AU PEPTIDE NATRIURÉTIQUE DE TYPE A : .....	13
I.5.1 DÉCOUVERTE DE L'ANP .....	13
I.5.2 STRUCTURE DE L'ANP : .....	14
I.5.3 BIOSYNTHÈSE ET SÉCRÉTION DE L'ANP : .....	15
I.5.4 RÉGULATION DE L'EXPRESSION DU GÈNE DE L'ANP : .....	16
I.5.5 ACTION PHYSIOLOGIQUE ET MÉCANISMES D'ACTION DE L'ANP : .....	18
I.5.6 L'EXPRESSION DE L'ANP AU COURS DU DÉVELOPPEMENT CARDIAQUE : .....	19
I.6 LA FAMILLE DES RÉCEPTEURS PEPTIDIQUES NATRIURÉTIQUES (NPRs) : .....	20
I.7 ANTAGONISTES DES RÉCEPTEURS PEPTIDIQUES NATRIURÉTIQUES : .....	22
I.7.1 ANTAGONISTE DU GUANYLATE CYCLASE PARTICULÉ, A71915 : .....	22
I.8 IMPLICATION DU GMP <sub>c</sub> DANS LE DEVELOPPEMENT DU CŒUR : .....	23
I.8.1 L'IMPLICATION DU NO/GMP <sub>c</sub> DANS LE DÉVELOPPEMENT DU CŒUR : .....	23
I.8.2 IMPLICATION DU NO/GCs/GMP <sub>c</sub> DANS LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES SOUCHES : .....	25
I.8.3 IMPLICATION DE LA GCP/GMP <sub>c</sub> DANS LA FONCTION CARDIAQUE : .....	28
I.9 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS: .....	29
<b>CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	<b>33</b>
II.1 CULTURE ET INDUCTION DE LA DIFFÉRENCIATION CARDIAQUE DES CELLULES P19. ....	33
II.2 IMMUNOFLUORESCENCE .....	37
II.3 ISOLATION DES « SIDE POPULATION » DE CELLULES P19 PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX (FACS) EN UTILISANT LE COLORANT NUCLÉAIRE HOECHST 33342 : .....	38
II.4 MÉTHODOLOGIE DE LA RÉACTION EN CHAÎNE PAR POLYMÉRISE EN TEMPS-RÉEL (RT-PCR) : .....	39
II.4.1 EXTRACTION DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE (ARN) TOTAL : .....	39
II.4.2 PURIFICATION DES ARN AVEC LE TRAITEMENT DNase : .....	40
II.4.3 TRANSCRIPTION INVERSE DE L'ARN <sub>m</sub> EN ADNC: .....	41
II.4.3 EXTRACTION DES RÉSULTATS A PARTIR DE L'ADNC: .....	41

II.4.4 PARAMÈTRES D'AMPLIFICATION DE LA MACHINE DE PCR EN TEMPS RÉEL: .....	42
II.4.5 SÉLECTION DU GÈNE CONSTITUTIF GAPDH POUR LA MESURE SEMI-QUANTITATIVE DE L'EXPRESSION DES ARNm: .....	42
II.4.6 CALCUL DE L'EXPRESSION DES ARNm PAR LA MACHINE DE PCR EN TEMPS RÉEL: .....	43
II.5 MÉTHODE D'IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN :.....	43
II.5.1 PRÉPARATION DU TAMPON DE LYSE CELLULAIRE RADIOIMMUNOPRECIPITATION ASSAY (RIPA) : ....	43
II.5.2 EXTRACTION DES PROTÉINES:.....	43
II.5.3 MESURE DE LA CONCENTRATION EN PROTÉINES:.....	44
II.5.4 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS:.....	44
II.5.5 PRÉPARATION DES GELS: .....	45
II.5.6 PROCÉDURE D'ÉLECTROPHORÈSE:.....	45
II.5.7 PROCÉDURE DE TRANSFERT DE TYPE «SEMI-DRY»:.....	46
II.5.8 POINT DE CONTRÔLE AVEC LE PONCEAUX ROUGE, LAVAGE, ET BLOCAGE:.....	46
II.5.9 QUANTIFICATION DES BANDES:.....	47
II.6 PRODUCTION DE GMPc ET RADIOIMMUNOASSAY (RIA):.....	47
II.7 VIABILITÉ CELLULAIRE :.....	48
II.8 ANALYSES STATISTIQUES :.....	49
<b>CHAPITRE III : RÉSULTATS .....</b>	<b>54</b>
III.1 SÉLECTION PAR FACS DES « SIDE POPULATION » (SP) DE CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES CARCINOMATEUSES DE SOURIS P19.....	54
III.2 CARACTÉRISTIQUES PHÉNOTYPIQUES DES SP DE CELLULES P19 .....	56
III.3 DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION OPTIMALE DES INDUCTEURS.....	57
III.4 STRUCTURE DES CORPS EMBRYOÏDES OU SPHÉROÏDES : .....	60
III.5 EFFET CARDIOMYOGÉNIQUE DE L'ANP.....	61
III.6 EFFET DE L'ANP, DE L'OT ET DE L'ANTAGONISTE A71915 SUR LA TAILLE DES SPHÉROÏDES.....	63
III.7 L'ANP STIMULE L'APPARITION DE COLONIES DE CELLULES BATTANTES .....	64
III.8 DÉTERMINATION DU PHÉNOTYPE DES CELLULES DIFFÉRENCIÉES SOUS LA STIMULATION DE L'ANP, DE L'OT ET DE LEUR COMBINAISON DU JOUR 6 AU JOUR 14.....	66
III.9 LES ARNm D'OTR, DE L'ANP ET DE GATA4 SONT EXPRIMÉS DE FAÇON MODESTE DANS LES CELLULES SP P19 .....	72
III.10 IMPLICATION DU GUANYLATE CYCLASE PARTICULÉ DANS LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES SP P19 EN CARDIOMYOCYTES FONCTIONNELS.....	74
III.11 L'ANTAGONISTE DU GUANYLATE CYCLASE PARTICULÉ STIMULE L'EXPRESSION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION CARDIAQUE GATA4 ET NKX2.5 DANS LES CELLULES SP P19. ....	76
III.12 CONFIRMATION DU PHÉNOTYPE DES CELLULES SP P19 DIFFÉRENCIÉES SOUS LA STIMULATION DE L'ANTAGONISTE DU GUANYLATE CYCLASE PARTICULÉ A71915 .....	77
III.13 MISE EN ÉVIDENCE DES RÉCEPTEURS PEPTIDIQUES NATRIURÉTIQUES COUPLÉS AUX GUANYLYL CYCLASES (NPR-A ET NPR-B) AINSI QUE L'EFFET DE L'ANTAGONISTE A71915 SUR LA PRODUCTION DU GMPC .....	81
<b>CHAPITRE IV : DISCUSSION.....</b>	<b>85</b>
IV.1 LES CELLULES SP COMME UNE DES CIBLES NATURELLES DANS LA CARDIOMYOGÈNESE .....	86
IV.2 STIMULATION DE LA CARDIOMYOGÈNESE DANS LES CELLULES SP P19.....	87
IV.3 LES MARQUEURS DE LA CARDIOMYOGÈNESE SONT DÉTECTÉS DANS LES CELLULES SP P19 STIMULÉES PAR LE PEPTIDE NATRIURÉTIQUE AURICULAIRE .....	88

IV.3.1 LES MARQUEURS DE CELLULES SOUCHES.....	88
IV.3.2 LES MARQUEURS DE LA CARDIOMYOGÈNESE .....	89
IV.4 COMBINAISON DE L'ANP ET DE L'OT DANS L'INDUCTION DE LA CARDIOMYOGÈNESE .....	92
IV.5 IMPLICATION DE L'ANP DANS LA CARDIOMYOGÈNESE DES CELLULES SP P19 .....	93
IV.6 RÉSUMÉ DES MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LA DIFFÉRENCIATION CARDIAQUE : .....	95
<b>CHAPITRE V : CONCLUSION.....</b>	<b>98</b>
<b>CHAPITRE VI : PERSPECTIVES .....</b>	<b>98</b>
<b>ANNEXES : .....</b>	<b>100</b>
<b>BIBLIOGRAPHIES : .....</b>	<b>100</b>

## **LISTE DES SCHÉMAS ET ILLUSTRATIONS :**

Schéma 1 - Découverte du système de l'ocytocine (OT) dans le cœur.....	7
Schéma 2 - Comparaison des stades de développement embryonnaire in vivo chez la souris à ceux imités in vitro lors de la différenciation des cellules souches embryonnaires carcinomateuses de souris P19 via la méthodologie de la goutte pendante (hanging-drop) ..	11
Schéma 3 - Formation du peptide bioactif de l'ANP.....	17
Schéma 4 - Séquence du Pro-ANP.....	17
Schéma 5 - Transformation du Pro-ANP en NT-pro-ANP et ANP bioactive. ....	18
Schéma 6 - Structure des récepteurs peptidiques natriurétiques et spécificité de liaison des peptides natriurétiques à leurs récepteurs.....	21
Schéma 7 - Méthode de la goutte pendante.....	34
Schéma 8 - Processus de formation des sphéroïdes .....	35
Schéma 9 - Purification des cellules SP P19 avec les microbilles magnétiques.....	36
Schéma 10 - Différences morphologiques des cellules SP P19 comparativement aux cellules P19 classique provenant de la compagnie ATCC.....	87
Schéma 11 - Voies de signalisation potentiellement empruntées par le récepteur de l'OT (OTR) et par les récepteurs peptidiques natriurétiques NPR-A et NPR-B au cours du processus de différenciation cardiaque. ....	97

## LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 1 - Réactifs employés dans la culture cellulaire. ....	49
Tableau 2 - Séquences des amorces pour le PCR en temps réel. ....	50
Tableau 3 - Réactifs employés dans la réaction de PCR en temps réel. ....	50
Tableau 4 - Réactifs employés dans l'immunofluorescence. ....	51
Tableau 5 - Réactifs employés dans l'immunobuvardage de type Western. ....	52
Tableau 6 - Conditions dans lesquelles les anticorps primaires ont été utilisés (Immunobuvardage). ....	53
Tableau 7 - Conditions dans lesquelles les anticorps secondaires ont été utilisés (Immunobuvardage). ....	53
Tableau 8 - Temps d'exposition et poids moléculaire des protéines d'intérêts (Immunobuvardage). ....	53

## LISTE DES FIGURES :

Figure 1 - Isolation des SP à partir des cellules P19. ....	55
Figure 2A - Les SP de cellules P19 expriment le marqueur phénotypique de l'état indifférencié SSEA1 .....	56
Figure 3 (2B) - Les SP de cellules P19 expriment le marqueur phénotypique de l'état indifférencié et d'auto-renouvellement OCT3/4. ....	57
Figure 4 (3A) - Effet de l'OT sur la viabilité des cellules SP P19 en monocouche.....	58
Figure 5 (3B) - Effet de l'ANP sur la viabilité des cellules SP P19 en monocouche. ....	59
Figure 6 (3C) - Effet de l'antagoniste A71915 sur la viabilité des cellules SP P19 en monocouche. ....	60
Figure 7 (4A) - Structure des corps embryoïdes observée par immunofluorescence. ....	61
Figure 8 (4B) - Structure des corps embryoïdes observée par microscopie photonique.....	61
Figure 9 (5) - Immunofluorescence de marqueurs de différenciation cellulaire dans les cellules SP P19 non-induites (A1-C1) et dans les cellules SP P19 stimulées pour se différencier avec l'ANP (A2-C2).....	62
Figure 10 (6) - Effet des inducteurs sur la taille des sphéroïdes. ....	64
Figure 11 (7) - Comparaison de l'effet cardiomyogénique de l'OT et de l'ANP.....	65
Figure 12 (8) - Confirmation du phénotype cardiaque des sphéroïdes induits avec l'ANP...72	
Figure 13 (9) - Effet de l'agrégation des cellules SP P19 sur l'expression des ARNm. ....	73
Figure 14 (10) - Comparaison de l'efficacité de la différenciation sous la stimulation de l'OT, l'ANP, A71915, A71915 + ANP et A71915 + OT.....	75
Figure 15 (11) - Expression relative de GATA4 et Nkx2.5 dans les cellules différenciées sous la stimulation de l'antagoniste du guanylate cyclase particulé, A71915. ....	77
Figure 16 (12) - Immunofluorescence de marqueurs de différenciation cardiaque dans les cellules P19 non-induites et dans les cellules P19 induites avec l'Antagoniste A71915. ....	78
Figure 17 (13) - Immunofluorescence de marqueur du muscle lisse dans les cellules P19 non-induites et dans les cellules P19 induites avec l'Antagoniste A71915.....	79

Figure 18 (14) - Immunofluorescence du marqueur de l'état indifférencié SSEA1 dans les cellules P19 non-induites et dans les cellules P19 induites avec l'Antagoniste A71915. ....80

Figure 19 (15) - Détermination de la présence des récepteurs peptidiques natriurétiques couplés aux guanylyl cyclases dans les cellules SP P19 et évaluation de la production du GMPc intracellulaire et extracellulaire dans les cellules SP P19.....83



## LISTE DES ABRÉVIATIONS :

Afin de rendre ce travail compréhensible, nous avons employé certaines abréviations provenant de l'anglais. Ces anglicismes utilisés dans ce mémoire ont été utilisés pour la simple raison qu'ils sont très sollicités dans la littérature scientifique et que le fait de les changer en français, en déformerait le sens et la lecture. Je voudrais à cette occasion m'excuser de la gêne occasionnée.

<u>Signification</u>	<u>Sigle ou abréviation</u>
1H-(1,2,4)oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one :	ODQ
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide :	MTT
4', 6-diamidino-2-phénylindole :	DAPI
Acide Chlorhydrique :	HCl
Acide désoxyribonucléique :	ADN ou DNA
Acide désoxyribonucléique complémentaire :	ADNc
Acide éthylène diamine tétra-acétique :	EDTA
Acide rétinoïque :	RA
Acide ribonucléique :	ARN ou RNA
Acide trichloro-acétique :	TCA
Albumine de sérum bovin ou bovin serum albumin :	BSA
American Type Culture Collection :	ATCC

Antagoniste de l'OT :	OTA
Antéro-ventrale du troisième ventricule :	3VAV
Antigènes embryonnaires de stade spécifique :	SSEA
Arginine-Vasopressine :	AVP
ARN interférents :	siRNA
Barorécepteurs aortiques :	AoBr
Barorécepteurs auriculaire :	ATBr
Barorécepteurs rénaux :	KBR
Calmodulin :	CaM
Cardiomyocyte :	CM
Cellule souche adulte :	CSA
Cellule souche cardiaque :	CSC
Cellule souche embryonnaire carcinomateuse :	CEC
Cellule souche embryonnaire ou embryonic stem cell :	CSE ou ESC
Cellules de la masse interne :	ICM
Chlorure de magnésium :	MgCl <sub>2</sub>
Chlorure de sodium :	NaCl
Connexine :	Cx
Corps embryoïdes ou embryoïd body :	CE ou EB
Cycle seuil ou Cycle Threshold :	CT

Cytométrie en flux :	FACS
Degré Celsius :	°C
Delta :	$\Delta$
Déoxynucléoside triphosphate :	dNTP
Désoxyribonucléase :	DNase
Diméthylsulfoxyde :	DMSO
Dithiothreitol :	DTT
Endothéline :	ET
Expansion du volume sanguin :	BVE
Expressed Sequence Tag :	EST
Extracellular signal-regulated kinases :	ERK
Facteur amplificateur spécifique des Myocytes-2C :	MEF2C
Facteur natriurétique auriculaire :	ANF
Fluorure de phenylméthanesulfonyle :	PMSF
Gramme :	g
Guanosine monophosphate cyclique ou cyclic guanosine monophosphate :	GMPc ou cGMP
Guanosine triphosphate :	GTP
Guanylate cyclase particulé :	GCp
Guanylate cyclase particulé ou particulate guanylate cyclase:	GCp ou pGC
Guanylate cyclase soluble ou soluble guanylate cyclase :	GCs ou sGC
Guanylate cyclase :	GC

Heure :	h
Hoechst 33342 :	Ho
Hormone thyroïdienne triiodothyronine :	T3
Hypophyse antérieure :	AP
Hypophyse postérieure :	PP
Immunofluorescence :	IF
Inositol 1,4,5-trisphosphate :	IP3
Intra-veineux :	i.v
Iodure de propidium :	PI
Ion superoxyde :	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Isobutylméthylxanthine :	IBMX
Isoforme cardiaque ventriculaire de la chaîne légère de myosine :	MLC-2v
Isoforme endothélial du NOS ou endothelial nitric oxide synthase :	eNOS
Knock-out :	KO
L-NG-Nitroarginine Methyl Ester :	L-NAME
Locus ceruleus :	LC
Microlitre :	μL
Millilitre :	mL
Minimum essentiel medium :	MEM
Minute :	min
Mitogen Activated Protein Kinase :	MAPK

Molaire :	M
Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase enzyme:	M-MLV
Monoxyde d'azote ou nitric oxide :	NO
Myocytic Induction/Differentiation ORIGINator :	MIDORI
N-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamide :	1400W
Neurone sérotoninergique :	5-HT
Neurones ANPergiques :	ANPn
Neurones cholinergiques :	ACHn
Neurones norepinéphrinerigiques :	NEn
Neurones ocytocinergiques :	ONn
Neutral-Endopeptidase :	NEP
Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate :	NADPH
NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine :	TEMED
Noyau du raphé dorsal :	DRN
Noyau du tractus solitaire :	NTS
Octamer-binding transcription factor 4 :	Oct-4
Ocytocine ou oxytocin:	OT
Optimum cutting temperature :	OCT
Oxyde nitrique synthase :	NOS
Oxygène :	O <sub>2</sub>
PBS-Tween 20 :	PBST

Peptide natriurétique auriculaire ou atrial natriuretic peptide:	ANP
Peptide natriurétique de type B :	BNP
Peptide natriurétique de type C :	CNP
Peptide natriurétique :	PN
Persulfate d'ammonium :	APS
Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate :	PIP2
Phosphatidyl-Inositol-3-kinase : PI3K	PI-3-kinase    ou
Phospholipase C :	PLC
Picogramme :	pg
Pourcent :	%
Protein kinase C :	PKC
Protéines morphogénétiques osseuses ou Bone morphogenetic protein :	BMP
RadioImmunoPrecipitation Assay :	RIPA
Réaction en chaîne par polymérase en temps-réel :	RT-PCR
Récepteur de l'OT :	OTR
Récepteur peptidique natriurétique :	NPR
Ribonucléase :	RNase
Seconde :	sec
Serine/threonine protein kinase :	Akt
Sérum d'origine fœtal :	FBS

Side Population :	SP
S-nitroso-N-acetyl penicillamine :	SNAP
Sodium dodécyl sulfate :	SDS
Sodium fluoride :	NaF
Système nerveux central :	SNC
Tampon phosphate salin ou phosphate buffered saline :	PBS
Translocase de la membrane externe :	TOM
Trichostatine A :	TSA
Tris-buffered saline :	TBS
Tris-buffered saline-tween 20 :	TBST
Trishydroxyméthylaminométhane :	TRIS
Troisième ventricule :	3V
Vérapamil :	VP

## CHAPITRE I : INTRODUCTION

Dans le but de découvrir de nouveaux traitements contre l'insuffisance cardiaque, la recherche biomédicale a essayé pendant des années de préserver la viabilité des cardiomyocytes restants et d'en améliorer la fonction. Depuis peu, la notion de thérapie cellulaire est apparue comme une nouvelle possibilité de traitement des maladies cardiaques, ce qui a permis d'ouvrir un nouvel axe de recherche encore non exploré. Le concept de la thérapie cellulaire implique la génération de cardiomyocytes (CM) *in vitro* et par la suite leur injection dans le muscle cardiaque, le myocarde, dans le but d'en améliorer la fonction. Ces CM pourraient ainsi être obtenus à partir de cellules souches embryonnaires (CSE) ou adultes (CSA). De nombreuses études nous ont permis d'enrichir nos connaissances sur les processus de différenciation cardiaque à l'aide de modèles animaux *in vivo*. De nos jours, différents modèles bien établis de cardiomyogenèse *in vitro* peuvent compléter les connaissances que nous avons des mécanismes fondamentaux de différenciation cardiaque. Parmi ces modèles de cardiomyogenèse *in vitro*, on retrouve les cellules souches embryonnaires carcinomateuses (CECs) de souris, les CSEs de souris et, depuis peu, les CSEs humaines. Par ailleurs, des études évoquent l'existence de cellules souches cardiaques (CSC) dans le cœur adulte suggérant leur potentiel dans la régénération des cellules cardiaques. Également, des études ayant mis en évidence le potentiel de CSAs présentes dans la moelle osseuse ou le muscle squelettique capable de se différencier en cellules de phénotypes inattendus posent la question de la possible utilisation de ces cellules pour la thérapie cellulaire cardiaque. De plus en plus d'évidences tendent de démontrer le rôle important que joue l'hormone issue de la neurohypophyse, l'ocytocine (OT), dans le développement du cœur et la différenciation des cellules souches en CM fonctionnels [1]. La découverte du système de l'OT dans le cœur a été associée à la fonction vitale de cette hormone, à savoir la stimulation du peptide natriurétique auriculaire (ANP) libéré dans la circulation sanguine. De nombreuses expériences physiologiques ont démontré un lien entre l'OT et l'ANP dans la régulation des fonctions cardiaques [1].



## **I.1 LE RÔLE DU CERVEAU DANS L'HOMÉOSTASIE DU CŒUR :**

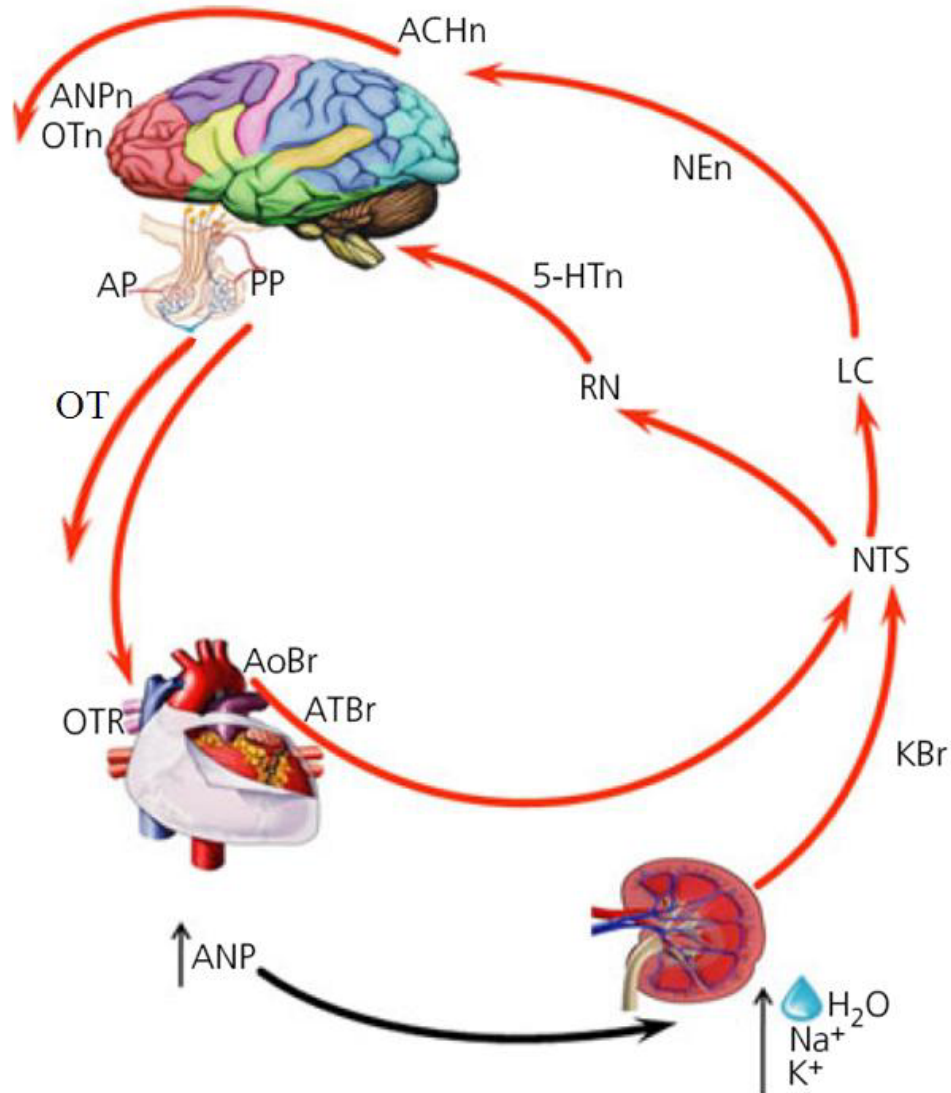
Auparavant, plusieurs groupes ont étudié le rôle du système nerveux central (SNC) dans le contrôle de l'homéostasie des fluides corporels. Au début des années 1950, Anderson et McCann [2] ont signalé que la micro-injection de solution saline hypertonique dans l'hypothalamus d'une chèvre induisait la polydipsie, un symptôme caractérisé par une soif excessive. De plus, un effet similaire a été observé suite à la stimulation électrique de la même zone cérébrale. Par la suite, Andersson et al. [3] a déterminé que la micro-injection de solution saline dans le troisième ventricule (3V) du cerveau ainsi que dans la partie antéro-ventrale du troisième ventricule (3VAV) induisait une natriurèse marquée. De façon intéressante, les premières études sur les mécanismes impliqués dans le contrôle de la prise d'eau, du sel et des aliments, ont été entreprises dans le cerveau. Ainsi, toutes ces études ont fourni des preuves attestant que la zone 3V fait partie du circuit neuronal impliqué dans la régulation de la captation de l'eau et du sodium par les reins ainsi que de leur excrétion. Il a été démontré que le système hypothalamo-neurohypophysaire régulait le maintien de l'homéostasie des fluides corporels en sécrétant l'arginine-vasopressine (AVP) et l'OT, en réponse à des stimuli osmotiques et non osmotiques. Les principaux stimuli responsables de la sécrétion d'AVP par les noyaux supraoptiques et paraventriculaires de l'hypothalamus sont : un faible volume sanguin et une hypernatrémie. En raison d'une augmentation croissante de l'osmolarité extracellulaire, les osmorécepteurs hypothalamiques induisent la libération de l'AVP, comme c'est le cas lors de la déshydratation. Cependant, lorsqu'il y a la détection d'un sous-remplissage artériel, ce sont les barorécepteurs, situés dans l'oreillette gauche, le sinus carotidien et la crosse aortique, qui stimulent les neurones dans les noyaux supraoptiques et paraventriculaires afin de produire l'AVP. Contrairement aux osmorécepteurs, les barorécepteurs doivent être inactivés pour stimuler la libération de l'AVP, et cette inhibition survient après une chute de la pression artérielle. En revanche, après une expansion du volume sanguin (BVE), qui active les barorécepteurs, plusieurs mécanismes neuronaux, comportementaux et hormonaux travaillent de concert d'une part pour inhiber l'ingestion de l'eau et du sel et d'autre part pour augmenter la natriurèse et le débit urinaire. Les mécanismes impliqués dans la régulation et le contrôle de l'homéostasie

des fluides corporels n'ont cependant pas été bien compris, jusqu'à la découverte des peptides natriurétiques (PNs) qui ont fourni un mécanisme de défense efficace contre la surcharge de volume à la fois chez les mammifères, et y compris chez les humains [4]. Au cours des années 1960, beaucoup d'attention a été accordé à l'existence éventuelle d'hormones natriurétiques. L'idée a émergé à partir des expériences de DeWardener et Clarkson [5], révélant que la natriurèse lors d'une BVE survient sans augmentation du taux de filtration glomérulaire ou des changements dans la sécrétion d'aldostérone. Cela a été confirmé plus tard par Davis et Freeman [6]. Cort et al. [7] rapportèrent la purification d'un facteur natriurétique d'origine hypothalamique et affirmèrent qu'il s'agissait d'un analogue de l'OT. Par la suite, l'existence d'un facteur natriurétique résidant dans l'hypothalamus a été confirmée et l'hypothèse selon laquelle ce facteur natriurétique pourrait être lié à l'OT a été formulée. Plus tard, Morris et al. [8] évaluèrent les effets de lésions au niveau de l'éminence médiane, une région hypothalamique qui matérialise la charnière neurohémale entre l'hypothalamus et l'hypophyse, sur la natriurèse en réponse à l'expansion du volume et à la stimulation pharmacologique de la zone 3V. En effet, les lésions induites au niveau de l'éminence médiane bloquent la natriurèse et la kaliurèse en réponse à l'expansion volumique et à d'autres stimulations de la zone 3V. De plus, la destruction complète de l'éminence médiane interrompt le tractus supraoptique-hypophysaire et, par conséquent, élimine la sécrétion des deux hormones neurohypophysaires, AVP et OT. Ces expériences suggérèrent que les lésions interrompirent la libération d'hormones natriurétiques impliquées dans l'induction centralisée de la natriurèse. Pourtant, aucune explication ne fut donnée quant à la façon dont les fonctions rénales sont régulées. C'est en 1981 que la découverte de l'ANP, par De Bold et al. [4], apporta un élément de réponse à tous ces phénomènes non explicables. La découverte des hormones natriurétiques a été précédée par les expériences pionnières de Gauer et Henry [9] montrant que la dilatation auriculaire produit une diurèse. Depuis l'Antiquité, il était connu que l'immersion partielle du corps dans l'eau, sans y mettre la tête, déclenchait la diurèse. Ce phénomène impliquant l'immersion dans l'eau s'expliqua par la possible augmentation du retour veineux vers le cœur et par la dilatation des oreillettes, augmentant la libération d'ANP et induisant de ce fait la diurèse. Les PNs sont des hormones ubiquitaires exprimées dans de nombreux tissus, y compris le cerveau. Il est

intéressant de noter que la zone du cerveau impliquée dans la natriurèse est également riche en neurones sécrétant l'ANP [10]. Par conséquent, il a été émise l'hypothèse suivante : durant la stimulation mécanique et pharmacologique de la zone 3VAV, la libération de l'ANP est responsable de la diurèse et de la natriurèse. En effet, il a été démontré que la stimulation de la région 3VAV par le carbachol, un médicament cholinergique, induisait l'effet diurétique attendu, ainsi qu'une augmentation 25 fois plus grande de la concentration d'ANP plasmatique, qui était toujours significative après 40 min. La stimulation de la région 3VAV par le carbachol augmenta la teneur en ANP dans plusieurs structures neuronales, comme l'hypothalamus médian basal, la neurohypophyse et l'hypophyse antérieure, sans aucun effet sur le contenu de l'ANP dans les poumons ou le cœur. A l'inverse, l'ANP plasmatique diminua de façon spectaculaire à la fois à 24h et à 120h après avoir induit des lésions dans la zone 3VAV. Les changements du niveau d'ANP plasmatique étaient accompagnés par un contenu en ANP réduit dans plusieurs structures cérébrales : hypothalamus médian basal, l'éminence médiane, la neurohypophyse, l'hypophyse antérieure, le plexus choroïde et le bulbe olfactif [11]. Toutes ces structures dans le SNC, liés à l'eau et à l'équilibre électrolytique, ont exprimé l'ANP et ses récepteurs. Toutefois, les niveaux d'ANP retrouvés dans de tels tissus étaient beaucoup trop faibles pour induire une sécrétion si importante dans le plasma. Par conséquent, l'hypothèse a été émise selon laquelle le contrôle neural, régulant la sécrétion des électrolytes, pourrait être médié par des hormones natriurétiques hypothalamiques, d'origine neurohypophysaire, responsables de la libération de l'ANP du cœur ainsi que de la diurèse subséquente. Dans le but d'étayer cette hypothèse, le modèle de rat BVE a été utilisé puisqu'il était déjà connu que l'expansion du volume est le stimulus le plus puissant pour induire la libération de l'ANP. Les études sur la stimulation et la destruction de la zone 3VAV, le site du péricaryon des neurones de l'ANP, et de l'éminence médiane, ont indiqué que la participation du SNC est essentielle à la libération de l'ANP en réponse à une BVE [12]. Au cours de BVE, il a été observé une activation des circuits neuronaux impliquant les barorécepteurs cardiaque-aortique et rénaux, les synapses muscariniques et  $\alpha$ -adrénergiques, les neurones ANPnergiques et le système sérotoninergique ascendant, conduisant à la libération de l'ANP. Ainsi, le rôle des barorécepteurs a été évalué dans leur capacité à induire la libération de l'ANP en réponse à

une BVE. En outre, il a été démontré que l'ANP plasmatique était diminué de manière significative 1 semaine après la déafférentation des barorécepteurs carotidiens-aortiques, et la réponse à une BVE a été fortement réduite par rapport à des contrôles opérés de manière fictive. Des résultats similaires ont été obtenus chez des rats ayant subi une déafférentation rénale : la libération d'ANP en réponse à une BVE a été supprimée. Il a été montré qu'une vagotomie bilatérale n'interférait pas avec la libération de l'ANP en réponse à une BVE. Ainsi, toutes ces observations ont suggéré que les impulsions émises par les barorécepteurs carotidiens-aortiques et rénaux sont des voies importantes qui médient la libération de l'ANP [13]. Suite à cela, il a été démontré que le blocage des synapses cholinergiques muscariniques avec de l'atropine sulfate, et des récepteurs  $\alpha$ -1 adrénergiques avec la phentolamine, avant une BVE, suppriment de façon prononcée la libération d'ANP, indiquant que les synapses muscariniques et  $\alpha$ -adrénergiques sont essentielles à la libération de l'ANP [14]. Sachant que la région 3VAV reçoit une importante source d'afférence provenant des axones sérotoninergiques ascendants, une BVE a été réalisée chez des rats dont le noyau du raphé dorsal, site du péricaryon des neurones sérotoninergiques (5-HT), a été détruit par des lésions électrolytiques ou appauvri en 5-HT avec l'injection ventriculaire latérale de la p-chlorophénylalanine, afin de déterminer le rôle éventuel du système sérotoninergique [15]. Suite à ce blocage, il a été observé qu'en l'absence du système sérotoninergique, une anti-natriurèse se produisait sans qu'il y ait la libération de l'ANP, suggérant que la voie allant des neurones sérotoninergiques à la région 3VAV participait au contrôle de la libération d'ANP induite par BVE ainsi que de la natriurèse qui suivait. Parmi tous les raisonnements pouvant expliquer le phénomène observé, une voie possible a été proposée comme étant stimulatrice des neurones sérotoninergiques au sein du système neuronal ANPnergique, qui, par conséquent, pourrait activer les neurones OTnergiques dans les noyaux supra-optiques projetant leurs axones vers le lobe neural (l'hypophyse postérieure). Une hypophysectomie et une lobectomie postérieure ont complètement inhibé la libération de l'ANP en réponse à une BVE, indiquant qu'un facteur originaire de l'hypophyse postérieure est responsable de la libération de l'ANP [12]. Des études ultérieures ont démontré que l'injection de l'OT de façon intrapéritonéale ou en intraveineux (i.v) chez des rats n'a pas augmenté seulement l'excrétion de sodium, mais a aussi

de façon concomitante augmenté les concentrations plasmatiques d'ANP [16, 17]. Ainsi, il est devenu clair que, l'activation du circuit neuronal, en réponse à une BVE, a suscité la sécrétion de l'OT, qui par le biais de la circulation sanguine a atteint les oreillettes du cœur, se liant ensuite aux récepteurs de l'OT (OTR) situés au niveau des oreillettes et qui a finalement induit la libération de l'ANP du cœur. En effet, ce postulat fut confirmé plus tard par la preuve de l'existence de l'OT et de son récepteur OTR dans le cœur et dans les gros vaisseaux [18-20]. La fonctionnalité d'OTR dans le cœur a été démontrée par la capacité de l'OT à induire la libération de l'ANP à partir de cœurs de rat perfusés [19]. En effet, l'ajout de l'OT, à une concentration de  $10^{-6}$  M, à un tampon de perfusion, a abouti à la libération accrue d'ANP. De plus, il a été observé que la fréquence cardiaque était diminuée de manière significative pendant la perfusion, et cette baisse était renversée par un antagoniste de l'OT (OTA). De façon surprenante, il avait été observé que l'ajout d'OTA à un tampon de perfusion inhibait la libération de l'ANP stimulée par l'OT, rendant les niveaux d'ANP encore plus faible que dans les animaux contrôle et indiquant que l'OT était synthétisé dans le cœur [18, 21]. C'est suite à toutes ces études que l'implication de l'OT dans la fonction cardiaque émergea.



**Schéma 1 - Découverte du système de l'ocytocine (OT) dans le cœur.**

Des expériences effectuées dans des modèles d'expansion volumique (BVE), chez les animaux, ont indiqué le rôle de l'OT dans la libération du peptide natriurétique auriculaire (ANP). AoBr, barorécepteurs aortiques; ATBr, les barorécepteurs auriculaire; KBR, barorécepteurs rénaux; NEn, neurones norepinéphrinerigiques; DRN, noyau du raphé dorsal; 5-HTN, neurones sérotoninerigiques; LC, locus ceruleus; NTS, noyau du tractus solitaire; ACHn, neurones cholinergiques; ANPn, neurones ANPergiques; ONn, neurones ocytocinergiques; AP, hypophyse antérieure; PP, hypophyse postérieure; OTR, récepteurs de l'ocytocine. Image tiré de Gutkowska et al, 2012 [1].

## **I.2 L'IMPLICATION DE L'OCYTOCINE DANS LE PROCESSUS DE DIFFÉRENCIATION CARDIAQUE :**

C'est en 1956 que la structure et la synthèse de l'OT furent élucidées par Du Vigneaud et ses collègues [22]. En effet, cette hormone traditionnellement impliquée dans la contraction utérine et l'éjection du lait [23] est principalement produite dans les noyaux paraventriculaires et les noyaux supra-optiques de l'hypothalamus, et elle est libérée dans la circulation sanguine à partir des terminaisons nerveuses du lobe postérieur de l'hypothalamus, où il est stocké. Des études plus récentes ont montré que l'OT est une hormone pléiotropique capable d'induire un large éventail d'activités physiologiques. De plus, la même proportion de neurones ocytocinergiques a été retrouvée au niveau de l'hypothalamus chez le mâle et la femelle, et le même stimulus induit la libération de l'OT chez les deux sexes, ce qui suggère une autre fonction physiologique que son rôle dans le système reproductif féminin. C'est en 2002 que Paquin et al [24] émirent l'hypothèse d'un rôle de l'OT dans la différenciation des CM, puisqu'ils observèrent que le système OT était activé dans le cœur du fœtus et du nouveau-né à un stade d'intense hyperplasie cardiaque. En effet, les premières expériences qui amenèrent à cette hypothèse étaient que l'OT induisait la différenciation de la lignée de CEC de souris P19 en CM fonctionnels [24]. Ensuite, plusieurs études ont tenté de comprendre les mécanismes de la différenciation cardiaque induite par l'OT. L'intérêt pour l'implication de l'OT dans le système cardiaque a émergé des expériences cherchant à comprendre le rôle du cerveau dans le contrôle de l'homéostasie cardio-rénal [25-27]. Ces expériences ont conduit à de nombreuses observations qui sont les suivantes : l'OT et OTR sont synthétisés dans le cœur humain et le cœur de rat [18-20]; l'OT exerce la cardio-protection soit directement, soit par l'intermédiaire de la stimulation de médiateurs tels que les PNs [18, 25] et le NO [28]. Depuis l'étude de Paquin et al en 2002 [24] montrant que l'OT induit la différenciation des CECs P19 en muscle cardiaque fonctionnel, plusieurs rapports ont confirmé que l'OT stimule la cardiomyogenèse dans différentes lignées de CSE [29-34]. En fait, l'OT peut être considéré comme un morphogène myogénique établie [35]. Il a aussi été observé que la cardiomyogenèse induite par l'OT génère également des myocytes squelettiques [28]. Il est intéressant de constater que la

plupart des facteurs de transcription identifiés à ce jour dans le cœur sont également présents dans d'autres cellules musculaires, et que la transplantation de myoblastes dans un cœur blessé améliore la fonction cardiaque systolique régionale[36]. En supposant qu'il existe à la fois des ressemblances dans les mécanismes de différenciation du muscle squelettique et cardiaques ainsi que dans l'expression d'OT et d'OTR dans ces cellules [19, 37], il a été spéculé que l'OT jouerait un rôle dans la régénération du muscle cardiaque.

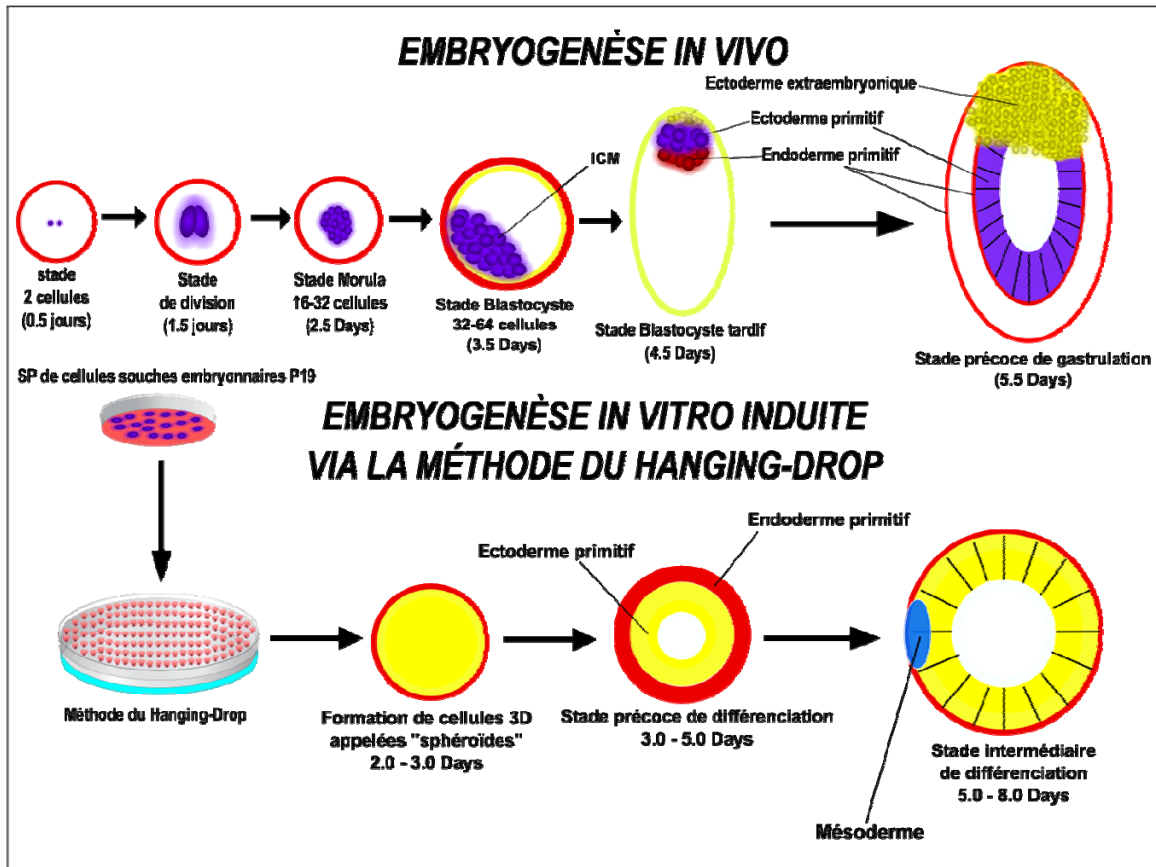
### **I.3 LE MODÈLE DE DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE P19 :**

Étant donné que les cellules cardiaques fœtales, néonatales et adultes ne conviennent pas à l'étude des mécanismes se rapportant à la différenciation cardiaque, en raison de leur état déjà différencié, il en a été conclu que les CSE sont le meilleur outil de travail. Les premières études *in vitro* menant à la compréhension des mécanismes impliqués dans le phénomène de la différenciation cardiaque ont été réalisées à l'aide des CECs de souris. Ces cellules sont issues de la masse interne (ICM) du blastocyste qui correspond au 5<sup>ème</sup> jour du stade de développement embryonnaire et qui représente structurellement 16 à 40 cellules. Ces cellules sont pluripotentes puisqu'elles peuvent donner tous les feuillets embryonnaires primitifs tels que l'endoderme, mésoderme et ectoderme, ainsi que les tissus qui en dérivent. *In vitro*, la différenciation des CECs est induite en laissant ces cellules s'agréger en suspension et former des structures 3D appelées corps embryoïdes (CE) [38]. La majorité des études entreprises sur les CECs furent effectuées à l'aide de la lignée cellulaire P19. Tout comme les autres CECs, la lignée cellulaire P19 a été dérivée d'un tératocarcinome formé suite à la transplantation d'un embryon de souris âgé de 7,5 jours dans un testicule de souris adulte [39]. En effet, ces cellules sont dérivées d'un tératocarcinome induit chez la souris CH3/He et peuvent se différencier en cellules provenant des 3 couches germinales [40]. De plus, en présence de sérum ces cellules sont capables de croître continuellement (à l'infini) et de conserver leur caractère indifférencié. Ces cellules peuvent être cultivées sous forme de monocouches adhérentes au support de culture ou sous forme d'agrégats en suspension. Néanmoins, la différenciation efficace de cette lignée cellulaire dépend de la



formation au préalable d'agrégats cellulaires ou sphéroïdes non-adhérents [40]. De la même façon que les CSEs, elles peuvent donner naissance à plusieurs types de cellules appartenant aux trois feuilletts embryonnaires primitifs [38]. Cette lignée cellulaire constitue donc un outil intéressant pour les études sur le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire. Ainsi, la lignée cellulaire P19 a été à l'origine de la découverte de nombreux mécanismes impliqués dans la différenciation cardiaque. Des tests de différenciation en agrégats ou à forte densité dans un milieu de culture complet ont montré que ces cellules ne se différencient pas efficacement dans ces conditions [41]. Toutefois, en présence de différents inducteurs et selon la concentration, les cellules P19 agrégées peuvent se différencier en différents types cellulaires. Le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'acide rétinoïque (RA) ont été reconnus comme deux inducteurs de la différenciation cellulaire [42]. Bien que plusieurs études ont démontré que la différenciation cardiaque pouvait être induite dans les cellules P19 par l'agrégation cellulaire combinée avec l'ajout, dans le milieu de culture, de concentrations faibles de DMSO [24, 43-47] ou d'AR [42, 48, 49], notre groupe a démontré que l'OT pouvait aussi induire la différenciation cardiaque dans les cellules P19 [24]. De ce fait, en utilisant l'OT pour induire l'agrégation dans les cellules P19, on peut observer qu'une partie des cellules se différencient en CM et commencent à se contracter spontanément. Cependant, l'efficacité de la différenciation cardiaque *in vitro* des cellules P19 n'est pas encore optimale en réponse à divers agents, avec des rendements variant entre 5% et 20% de CM [24, 28, 29, 50]. De plus, dans le modèle cellulaire P19, l'ordre de l'efficacité des inducteurs pouvant induire la cardiomyogenèse est le suivant : OT ( $10^{-7}$  et  $10^{-8}$  M)  $\geq$  DMSO (0,5 et 1%)  $>$  AR ( $10^{-8}$  et  $10^{-7}$  M), lorsque ces agents étaient ajoutés au milieu de culture pendant toute la durée de l'agrégation cellulaire [24, 28, 30]. C'est pourquoi, une autre lignée capable de se différencier, avec une efficacité d'environ 90%, vers le phénotype cardiaque fut sous-clonée à partir des cellules P19 et nommée P19CL6 [51]. D'autre part, des études électrophysiologiques, utilisant la méthode du patch-clamp, ont démontré que les cellules cardiaques obtenues à partir des cellules P19 formaient des sous-populations de CM ressemblant aux cellules cardiaques embryonnaires [52]. Skerjanc et al [53] a rapporté que la surexpression de Nkx2.5 pouvait induire la cardiomyogenèse dans des cellules P19 en agrégation. Il est tout de même intéressant de

noter que l'exposition des cellules P19 à une concentration plus élevée d'AR ( $10^{-6}$  M) ne génère pas des cellules musculaires mais des cellules neuronales.



**Schéma 2 - Comparaison des stades de développement embryonnaire in vivo chez la souris à ceux imités in vitro lors de la différenciation des cellules souches embryonnaires carcinomateuses de souris P19 via la méthodologie de la goutte pendante (hanging-drop).**

L'engagement de la lignée cellulaire P19 vers les différentes couches germinatives et les processus de différenciation retrouvés au sein même de l'environnement du CE mimique le développement des embryons de souris. La différenciation des CE tridimensionnels peut donner lieu à des structures qui ne consistent pas seulement en cellules musculaires, mais aussi en cellules neuronales et épithéliales. Image adapté de Takatsugu Yamada et Yoshiyuki Nakajima, 2006 [54].

## **I.4 LES « SIDE POPULATION » (SP) DE CELLULES SOUCHES**

### **EMBRYONNAIRES :**

Des études récentes ont suggéré que les cardiomyocytes pouvaient être régénérés à partir d'une population, isolée de cellules souches et progénitrices transplantées, appelée « Side Population » (SP). Historiquement, les SP ont d'abord été identifiées comme des cellules souches hématopoïétiques de souris ayant la capacité unique de permettre l'efflux du colorant fluorescent Hoechst 33342 (Ho) [55, 56]. Suite à cela, il a été démontré que ces cellules SP existent dans une variété d'organes, comme la moelle osseuse, le muscle squelettique, le foie, le cerveau, les poumons, la peau, et le cœur [57, 58]. Zhou et al [59] a rapporté que le transporteur ATP-binding cassette, ABCG2, est un déterminant moléculaire de ce phénotype SP dans les cellules souches hématopoïétiques. Jackson et al. [60] ont rapporté que les cellules SP de la moelle osseuse peuvent se différencier en cellules endothéliales et en CM dans des cœurs ischémiques. Les cellules SP du muscle squelettique ont une activité hématopoïétique *in vitro*, et sont capables de se différencier en myocytes squelettiques lorsqu'elles sont mises en co-culture avec des myoblastes dérivés des cellules satellites [57]. Ces résultats suggèrent que les cellules SP présentent des caractéristiques de cellules souches somatiques, et que les cellules SP du cœur peuvent être un candidat prometteur en tant que cellules souches ou progénitrices. Il a été montré que les cellules SP issues de cœurs de rats nouveau-nés ont la capacité de se différencier en CM lorsqu'elles sont co-cultivées avec des CM [61-63]. Cependant, les mécanismes qui induisent la différenciation des cellules SP du cœur en CM n'ont pas encore été identifiés. Par ailleurs, Oyama et al [64] ont signalé que les cellules SP issues de cœurs de rats postnataux pouvaient se différencier en CM *in vitro* et *in vivo*. De plus, Oyama et al [64] démontrèrent que l'OT et la trichostatine A (TSA) pouvaient tous les deux induire la différenciation des cellules SP postnatales en CM fonctionnels. Des études plus récentes ont mis en évidence l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des CSE, et cette propriété a été corrélée avec la présence de sous-populations de CSE ressemblant à des lignées de cellules pluripotentes issues de l'embryon [65, 66]. Afin d'isoler des populations de CSE ayant les mêmes propriétés, il fut nécessaire d'identifier et de caractériser ces sous-populations de CSE.

Ainsi, la capacité d'une des sous-populations de CSE, qui se caractérise par un efflux actif du colorant fluorescent Ho [55], a été exploitée en tant que marqueur pour identifier et purifier les cellules souches à partir d'une variété de tissus [56, 67-69]. Cette sous-population cellulaire ressemble beaucoup aux cellules SP issues du cœur. Les cellules SP provenant des CSE peuvent ainsi être identifiées par cytométrie en flux (FACS) comme une population de cellules non marquées par le Ho et qui affichent une sensibilité à l'inhibiteur de la famille des transporteurs ATP-binding cassette ABC, le vérapamil (VP) [55, 56]. Il a été démontré que les fractions de cellules SP provenant de différents tissus qui sont enrichies en cellules primitives, se différencient en des types de cellules caractéristiques du tissu dont ils sont dérivés [55, 56, 67, 68, 70, 71]. Toutes ces études suggèrent que les SP de CSE seraient de bon candidat pour induire la différenciation cellulaire vers un phénotype unique.

## **I.5 INTRODUCTION AU PEPTIDE NATRIURÉTIQUE DE TYPE A :**

### ***I.5.1 DÉCOUVERTE DE L'ANP :***

C'est vers les années 1980 que la fonction endocrine du cœur ainsi que la fonction physiologique des peptides natriurétiques furent élucidées par le travail d'Adolfo de Bold et ses collègues [4]. En 1981, de Bold et ses collègues décrivent le cœur comme un organe endocrine, puisque l'injection d'un extrait de tissu provenant des oreillettes du cœur induisit une diurèse et une natriurèse intense ainsi qu'une baisse de la pression artérielle, chez des rats anesthésiés [4]. Par la suite l'ANP fut isolé [4, 72] et la relation entre la granulité auriculaire et le facteur natriurétique fut confirmée [73]. Suite à cette publication, la structure de cette hormone polypeptidique possédant à la fois une activité natriurétique et des propriétés vasodilatatrices a été confirmée par Flynn et al. en 1983 [74]. Enfin, plusieurs noms ont été donnés à cette molécule : ANP, peptide natriurétique de l'oreillette, facteur natriurétique auriculaire (ANF), cardiodilatine, cardionatine, atriopeptine. Parmi ces noms, l'ANP est le terme le plus utilisé aujourd'hui. L'ANP fait parti de la famille des PNs qui sont des hormones agissant sur le système cardiovasculaire et endocrinien par l'intermédiaire de leurs actions diurétiques, natriurétiques, vasorelaxantes, inhibitrices de l'aldostérone, de

la rénine et de l'AVP [75]. Les PNs sont des inhibiteurs endogènes de l'hypertrophie cardiaque. Il en existe trois types principaux: le Peptide Natriurétique de type A (ANP), le Peptide Natriurétique de type B (BNP) et le Peptide Natriurétique de type C (CNP). Dans le cœur, l'expression de l'ANP est dominante dans les CM provenant des oreillettes, alors que le BNP est exprimée également dans les oreillettes et les ventricules mais la mesure de l'expression du CNP dans le cœur n'est pas encore bien élucidée et ce peptide est exprimé de façon prédominante dans l'endothélium vasculaire. Après leur synthèse sous forme de pro-hormone, les PNs sont clivés puis sécrétés pour libérer les dérivés peptidiques biologiquement actifs et exercer leurs effets en se liant aux récepteurs peptidiques natriurétiques (NPRs), également connus sous le nom de récepteurs à guanylyl cyclase, qui sont au nombre de trois (NPR-A, NPR-B et NPR-C).

### ***1.5.2 STRUCTURE DE L'ANP :***

Structurellement, l'ANP est présent comme un gène à copie unique et est organisé en trois exons séparés par deux introns [76]. Le gène de l'ANP présente une importante homologie de sa séquence nucléotidique entre les différentes espèces [77]. Dans les CM, l'ANP est synthétisé comme un pré-pro-peptide inactif. Suite au clivage du peptide signal, le pré-pro-ANP est converti en pro-ANP, un précurseur de 126 acides aminés, qui est la forme de stockage prédominante de l'ANP dans certaines granules auriculaires [78]. Chez les mammifères, le pro-ANP est clivé en deux fragments : un fragment amino-terminale et un fragment biologiquement actif de 28 acides aminés, l'ANP[76]. Chez l'humain, le gène codant pour l'ANP, appelé *Nppa* (GeneID 4878) est localisé sur le chromosome 1p36.21. *Nppa* a une longueur approximative de 2 Kb et est formé de 3 exons et 2 introns. L'ARNm qui en résulte est traduit en un polypeptide de 151 acides aminés, appelé pré-pro-ANP. Les 25 premiers acides aminés constituent un peptide signal qui est clivé pour donner un peptide de 126 acides aminés appelé pro-ANP. C'est sous cette forme que l'ANP est stocké dans les granules de sécrétions des CM de l'oreillette [79]. Chez l'humain, il a été démontré que suite à la sécrétion des myocytes, le pro-ANP est clivé par plusieurs enzymes de clivage afin de donner le fragment biologiquement actif. Parmi ces enzymes, la plus importante est

l'enzyme Corine, une sérine protéase membranaire hautement exprimée à la surface extracellulaire des CM de l'oreillette. En effet, la Corine clive le pro-ANP au niveau de l'arginine 98, générant un fragment (NT)-pro-ANP de 98 acides aminés en position aminoterminal (N-Terminal) et l'ANP bioactive de 28 acides aminés en position carboxyle terminale (C-terminal) [80, 81]. Chez l'humain, l'homologie de l'ANP ne diffère que d'un acide aminé de celui du rat, et est identique à celui du chimpanzé, du chien, du cochon, du cheval et du mouton. De plus, la séquence entière du pré-pro-ANP est également très conservée chez les mammifères [79]. L'ANP est majoritairement exprimé et entreposé dans les oreillettes du cœur, mais il est présent à des concentrations plus faibles dans d'autres tissus comme le ventricule, le rein, le tissu adipeux et le cerveau. Enfin, le pro-ANP, NT-pro-ANP et l'ANP sont tous libérés dans la circulation. Par ailleurs, l'ANP et les autres PNs partagent une structure commune de 17 acides aminés en forme de boucle qui est fermée par un pont disulfure, entre les résidus cystéines intrachaînes, requise pour son activité biologique [82, 83]. L'ANP possède également 2 extrémités exocycliques N- et C-terminales. La modification de l'extrémité exocyclique N-terminale de l'ANP n'a pas d'effet significatif sur son affinité pour son récepteur, ni sur son activité biologique. Par contre, la délétion de l'extrémité exocyclique C-terminale ou l'ajout de résidus arginine en C-terminal réduit de 1000 fois l'affinité et l'activité biologique de l'ANP [84, 85].

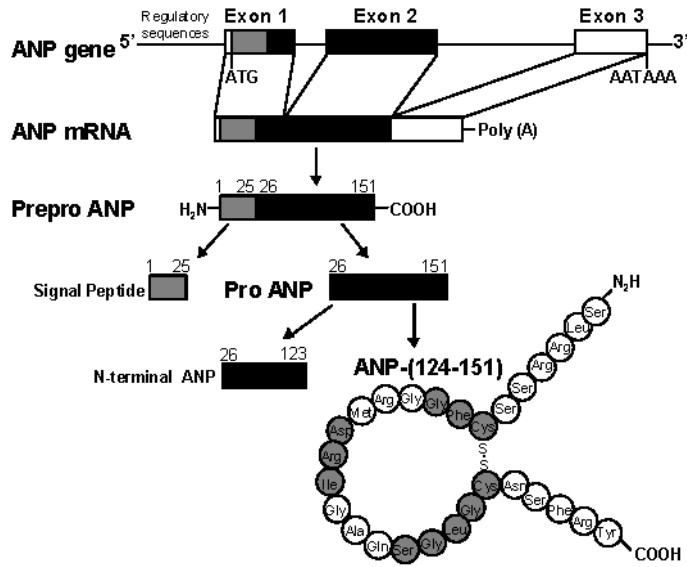
### ***1.5.3 BIOSYNTHÈSE ET SÉCRÉTION DE L'ANP :***

Durant l'embryogenèse, le gène qui code pour l'ANP est exprimé tant au niveau de l'oreillette que du ventricule. Après la naissance, ce peptide est exprimé principalement dans l'oreillette, mais son expression est diminuée dans le ventricule. Dans le cœur, les myocytes cardiaques sont les cellules prédominantes pour la production de l'ANP [86], bien que l'ANP puisse également être synthétisée par les fibroblastes [87]. L'oreillette est le site le plus important pour la synthèse de l'ANP, puisque les niveaux d'ARNm de l'ANP dans les oreillettes sont 100 fois plus élevés que dans les ventricules [76]. L'ANP retrouvé dans les oreillettes est sécrété de façon constitutive et régulatrice [88], tandis que la sécrétion d'ANP ventriculaire survient principalement dans une voie constitutive [89]. Ainsi, la sécrétion

d'ANP se fait selon un mode semi-constitutif puisque 60 % de l'ANP nouvellement synthétisé est stocké dans les myocytes alors que les 40 % restant sont sécrétés en absence de stimulation [90]. Il a été suggéré que l'étirement des CM, plus précisément le BVE, était le stimulus primaire pour la libération de l'ANP [91]. Dans un même contexte, il a été démontré que l'étirement de la paroi des oreillettes du cœur suite à une hausse du volume intravasculaire était le principal stimulus capable d'induire la sécrétion d'ANP [92, 93]. Aussi, il a été décrit que beaucoup de facteurs neurohumoraux avaient la capacité d'induire la libération de l'ANP [94], de même que certaines hormones comme l'endothéline (ET) [95], l'angiotensine [96] et l'AVP, qui contrairement aux autres facteurs, induit la sécrétion d'ANP seulement par des effets hémodynamiques [97]. Les voies majeures de la dégradation de l'ANP sont l'endocytose médiée par son récepteur et la dégradation médiée par la Neutral-Endopeptidase (NEP) [98].

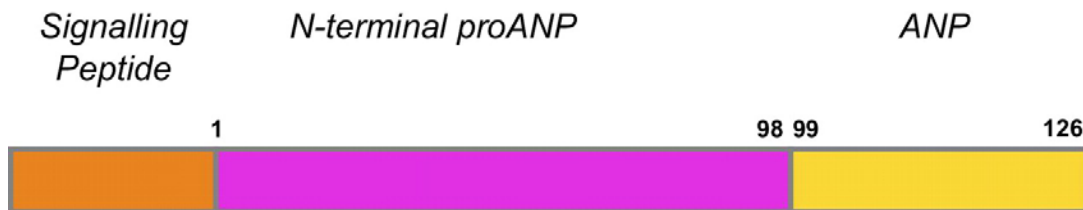
#### ***1.5.4 RÉGULATION DE L'EXPRESSION DU GÈNE DE L'ANP :***

Au niveau transcriptionnel, l'expression de l'ANP est aussi régulée, par le promoteur de son gène. Au niveau basal, le gène de l'ANP est transcrit par plusieurs éléments de réponse tels que GATA, TBE, NKE et SRE. Les facteurs de transcription de la famille GATA, en particulier GATA-4 et GATA-6, se lient sur deux sites de réponse GATA positionnés dans le promoteur proximal (-280 et -120). Le facteur NK-homeobox Nkx2-5 et le facteur T box Tbx5, qui jouent un rôle critique dans le développement cardiaque, se lient à l'élément de réponse NKE2 (- 240) et aux sites TBE (-485, -252, -90), respectivement. Ces 2 facteurs sont capables de s'associer pour induire la transcription du gène.



**Schéma 3 - Formation du peptide bioactif de l'ANP.**

Image tiré de la thèse de MARIA SUO [99] (voir aussi [100]).

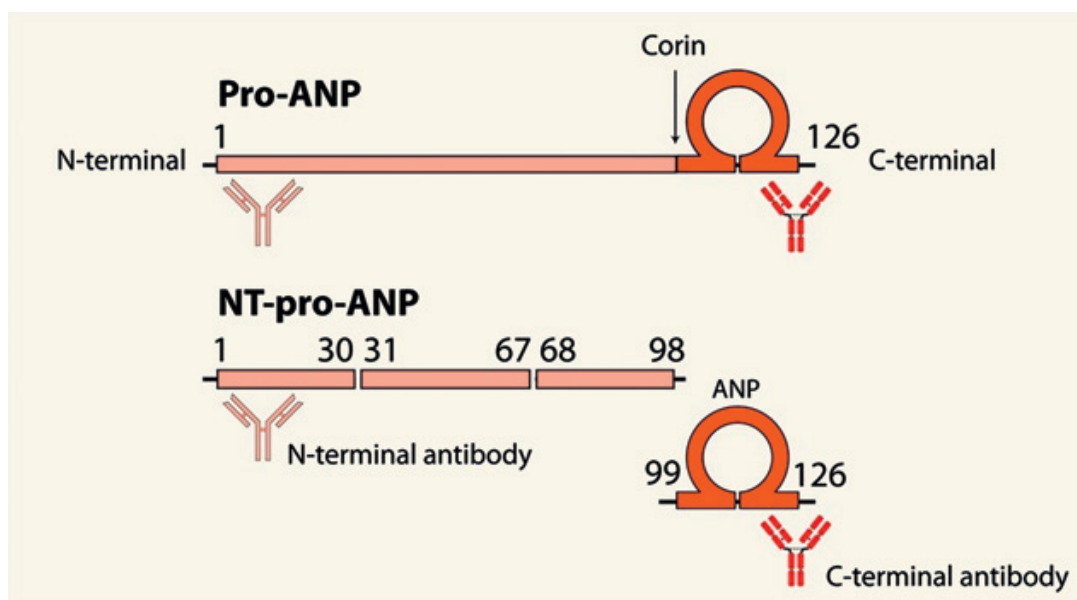


**Pro-ANP**

**Schéma 4 - Séquence du Pro-ANP.**

Image tiré de Von Haehling et al, 2007 [101]





**Schéma 5 - Transformation du Pro-ANP en NT-pro-ANP et ANP bioactive.**

Figure tiré de Xu-Cai et al, 2010 [102]

### ***1.5.5 ACTION PHYSIOLOGIQUE ET MÉCANISMES D’ACTION DE L’ANP :***

L’ANP se lie tout d’abord à son récepteur peptidique natriurétique de type A (NPR-A) dans les organes cibles, puis enclenche l’activité intrinsèque de la guanylyl cyclase de NPR-A et génère le GMPc intracellulaire [103]. Les premiers rapports démontrant que l’ANP stimule la production de GMPc dans plusieurs tissus [104, 105] et que celui-ci active la forme particulière de la guanylate cyclase [106-108] sont apparus dans les années 1980. L’ANP antagonise également le système rénine-angiotensine, inhibe la sécrétion de l’AVP, de l’endothéline et réduit l’activité sympathique systémique et rénale, ce qui augmente l’activité natriurétique, diurétique et vasorelaxante. L’ANP agit ainsi comme un processus de compensation visant à promouvoir la fonction cardiaque. En revanche, le pro-ANP possède une activité biologique minime [109]. De plus, l’ANP est métabolisé par au moins deux mécanismes différents. D’une part, l’ANP peut se lier à son récepteur de clairance NPR-C

pour être internalisé et hydrolysé par les enzymes lysosomales. D'autre part, l'ANP peut être dégradé par une enzyme appelée neutral endopeptidase 24.11 (enzyme de clivage).

#### ***1.5.6 L'EXPRESSION DE L'ANP AU COURS DU DÉVELOPPEMENT CARDIAQUE :***

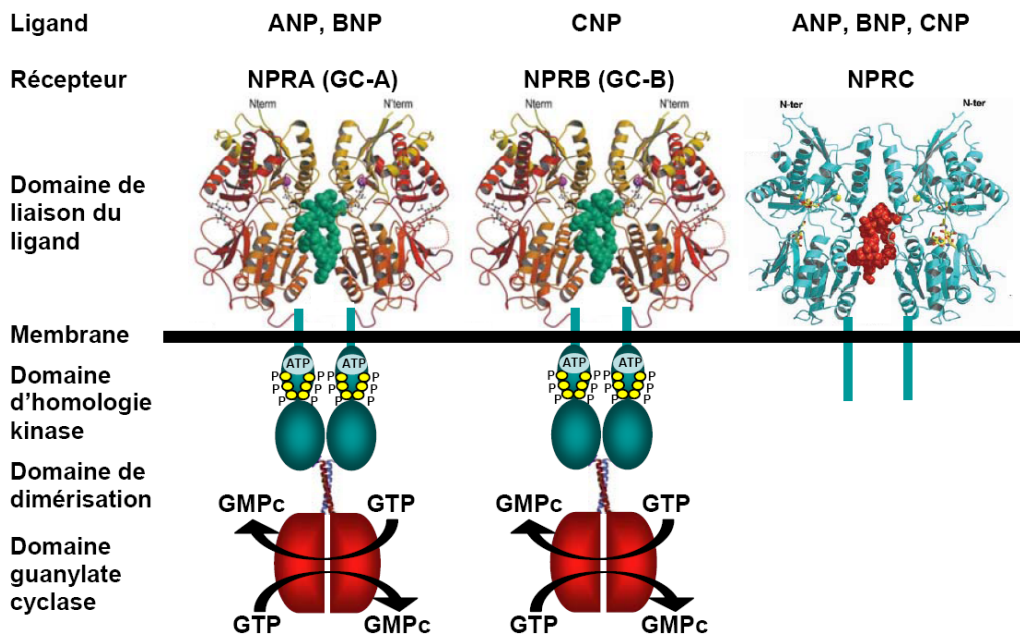
Dans le cœur adulte, l'oreillette est le site majeur d'expression de l'ARNm de l'ANP, avec des niveaux dans le ventricule gauche d'environ 0,5-3% des niveaux retrouvés dans l'oreillette [98]. Toutefois, au cours du développement, de nombreuses études chez les rongeurs signalent que ces niveaux d'ANP sont plus élevés dans les ventricules que dans les oreillettes, à la fois au niveau de l'expression de l'ARNm de l'ANP [110, 111] et de l'expression du peptide de l'ANP [112]. Néanmoins, dans les ventricules fœtaux humains et ovins, les niveaux d'ARNm de l'ANP sont considérablement plus élevés que dans les ventricules adultes et tendent à diminuer avec l'âge gestationnel [113-115]. De plus, les niveaux peptidiques de l'ANP dans les ventricules fœtaux ont également été signalés à être plus grand que dans les ventricules adultes [112, 116, 117]. Toutefois, cela peut résulter en partie d'une grande capacité de stockage de l'ANP dans des granules auriculaires que dans le ventricule, où la sécrétion est principalement constitutive avec un temps de transit plus rapide [118]. En général, ces études indiquent que la contribution relative de l'ANP ventriculaire est significativement plus élevée chez l'embryon que chez l'adulte, et chez certaines espèces, le ventricule est le site d'expression prédominant de l'ANP au cours du développement. Au cours des processus moléculaires qui sous-tendent l'hypertrophie cardiaque, de nombreux gènes normalement exprimés au cours du développement sont réactivés, y compris l'ANP ventriculaire [119, 120]. En effet, l'expression du gène cardiaque de l'ANP est augmenté dans des modèles animaux ayant subi un infarctus du myocarde [87], une insuffisance cardiaque [121, 122], une hypertrophie [123], et aussi dans les maladies cardiaques humaines [124, 125]. Par conséquent, l'apparition de l'expression accrue d'ANP ventriculaire chez l'adulte s'est imposée comme un marqueur impliqué dans l'induction du programme génique embryonnaire au cours du développement de l'hypertrophie ventriculaire [119]. Des observations quotidiennes de l'expression des PNs au cours de l'embryogenèse chez la souris montrent que l'ARNm de l'ANP apparaît entre les 8<sup>ème</sup> - 9<sup>ème</sup>

jours de gestation avec un pic important des niveaux d'ARNm au 12,5<sup>ème</sup> jours et de plus petits pics aux 14,5<sup>ème</sup> et 16,5<sup>ème</sup> jours post-coïtum [110]. Chacune de ces étapes coïncide avec un point de repère dans le développement du cœur embryonnaire. En outre, le jour 9 coïncide avec le début des battements réguliers du cœur primitif, le jour 12 marque la formation progressive du septum pour construire les quatre cavités cardiaques, et aux environs du jour 15, la modification de l'axe cardiaque a lieu [126]. Ce modèle d'expression est compatible avec le rôle de l'ANP dans la formation du cœur en développement.

### **I.6 LA FAMILLE DES RÉCEPTEURS PEPTIDIQUES NATRIURÉTIQUES (NPRs) :**

Les divers effets biologiques des PNs sont médiés par leur liaison à des récepteurs membranaires possédant un domaine guanylate cyclase (GCs), connus sous le nom de NPRs [127, 128]. Il existe deux sous type de récepteurs, le NPR-A connu aussi comme GC-A et le NPR-B connu comme GC-B, qui sont majoritairement responsable des effets physiologiques des peptides via la GC qui va médier la conversion du guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Sur le NPR-A se lie l'ANP et le BNP alors que sur le NPR-B se lie sélectivement le CNP. Un troisième récepteur, le NPR-C, sur lequel se lient tous les peptides, joue un rôle primaire de récepteur de clairance et sert d'internalisation cellulaire et de dégradation. Au niveau tissulaire, l'ARNm codant pour le NPR-A est exprimé dans le muscle lisse vasculaire, l'endothélium, le cœur, le rein, la glande surrénale, les poumons, l'intestin, le cerveau, le tissu adipeux, la rate, les ovaires et les testicules [79, 129, 130]. L'affinité relative des PNs pour le NPR-A est dans l'ordre suivant :  $ANP \geq BNP \geq CNP$ . Au niveau tissulaire, l'ARNm codant pour le NPR-B est exprimé dans le muscle lisse vasculaire, l'endothélium, le cœur, la glande surrénale, les poumons, le cerveau, le tissu adipeux, les os, le foie, les fibroblastes et les utérus [79, 129, 130]. Le NPR-B est le principal NPR dans le cerveau. La protéine NPR-B a été trouvée à des concentrations relativement élevées dans les fibroblastes. Le NPR-B a la même topologie que le NPR-A. L'affinité relative des PNs pour le NPR-B est dans l'ordre suivant :  $CNP \gg ANP \geq BNP$ . Au niveau tissulaire, l'ARNm codant pour le NPR-C est exprimé dans le

muscle lisse vasculaire, le cœur, les reins, les cellules endothéliales, la glande surrénale, les poumons, le tissu veineux, le placenta, l'intestin et le cerveau [79, 129-131]. L'affinité des PN pour le NPR-C est dans l'ordre suivant : ANP  $\geq$  CNP > BNP à la fois chez les humains et les rats [132].



**Schéma 6 - Structure des récepteurs peptidiques natriurétiques et spécificité de liaison des peptides natriurétiques à leurs récepteurs.**

Schéma tiré de la thèse de Marie Parat, 2009 [133].

## **I.7 ANTAGONISTES DES RÉCEPTEURS PEPTIDIQUES NATRIURÉTIQUES :**

La recherche des antagonistes ciblant le récepteur NPR-A n'a pas été entièrement développée depuis que le blocage du récepteur NPR-A n'a jamais été proposé à des fins thérapeutiques. Depuis la découverte de l'ANP par de Bold [4], quelques antagonistes des récepteurs NPR-A et NPR-B ont été utilisés, afin de définir le rôle endogène des PNs dans la régulation de la natriurèse et la diurèse avec précision. Parmi ces antagonistes, seulement trois ont été majoritairement utilisés : le HS-142-1, l'A71915 et l'anantin.

Le HS-142-1, un polysaccharide naturel isolé d'une culture bactérienne de l'*Aureobasidium* sp., est un inhibiteur relativement spécifique de l'activité GC, qui inhibe la liaison des ligands et l'activation des deux récepteurs NPR-A et NPR-B, via un mécanisme allostérique plutôt qu'un mécanisme compétitif [134, 135]. Cet inhibiteur n'antagonise pas les réponses médiées par le NPR-C. Bien que HS-142-1 a été largement utilisé dans la recherche des PNs, sa production a cessé actuellement, probablement pour des raisons commerciales. Enfin, un autre antagoniste l'anantin, est un peptide cyclique du *Streptomyces coeruleus*, qui agit comme un antagoniste compétitif au récepteur NPR-A [136].

### ***I.7.1 ANTAGONISTE DU GUANYLATE CYCLASE PARTICULÉ, A71915 :***

L'antagoniste A71915 [Arg6, H-cyclohexyl-Ala8, D-Tic16, Arg17, Cys18)-ANP (6-18) amide] est un peptide synthétique dérivé de l'ANP, présentant des propriétés compétitives antagonistes au récepteur NPR-A [137]. A71915 est un peptide dérivé de l'ANP, possédant deux acides aminés non naturels dans les positions 8 et 26 (cyclohexylalanine et acide 1,2,3,4 tétrahydroisoquinoléine-3-carboxylique, respectivement) [138], avec une affinité de liaison seulement 22 fois moins puissante que l'ANP de rat (1-28) [137]. A71915, a émergé comme le plus puissant inhibiteur de la production de GMPc stimulée par l'ANP et médiée par le récepteur NPR-A [138]. Plusieurs études de liaison ont montré que le mécanisme d'action de l'antagoniste A71915 consistait à interférer fortement avec les sites de liaison de l'ANP et d'induire une très faible production de GMPc [137]. En ce qui concerne sa taille, A71915 a une structure plus petite (composé de 12 acides aminés) que l'ANP 1-28 [137]. De

plus, il a été démontré que ce peptide exerce une faible toxicité et c'est pour cette raison qu'il a été utilisé dans des études *in vivo*. Brunner et Woelkert [139] ont utilisé A71915 pour montrer que le niveau basal de l'ANP contribue à la régulation de la résistance périphérique totale et coronaire chez les rongeurs. En outre, A71915 a été utilisé pour l'étude de l'antagonisme du récepteur de l'ANP dans une étude *in vivo* chez l'homme fournissant la preuve directe que le blocage des effets issus du niveau basal de l'ANP augmente le tonus veineux, réduisant ainsi le volume vasculaire [140].

## **I.8 IMPLICATION DU GMP<sub>c</sub> DANS LE DEVELOPPEMENT DU CŒUR :**

### ***I.8.1 L'IMPLICATION DU NO/GMP<sub>c</sub> DANS LE DÉVELOPPEMENT DU CŒUR :***

Le monoxyde d'azote (NO) est un radical libre diatomique et c'est l'une des molécules les plus importantes dans les voies de signalisation connues dans la physiologie des mammifères. En effet, le NO médie une foule d'événements physiologiques telles que la relaxation des muscles lisses, le phénomène de vasodilatation, la neurotransmission, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, et la modulation du système immunitaire [141-143]. En outre, au niveau cellulaire, le NO régule la croissance cellulaire, la survie, l'apoptose, la prolifération et la différenciation [143]. De plus, le NO est également impliqué dans la physiopathologie de plusieurs maladies comme le diabète, le cancer, les maladies cardiovasculaires, et aussi dans diverses affections inflammatoires, en raison de sa biodisponibilité réduite ou de sa production ou à cause de la surproduction de NO [142]. Le NO est synthétisé par un groupe d'enzymes appelées oxyde nitrique synthase (NOS) via un mécanisme d'oxydation qui transforme la L-arginine en L-citrulline et NO [143]. Il existe trois isoformes de NOS (NOS-1, NOS-2, et NOS-3), qui utilisent une gamme complexe de cofacteurs et de co-substrats tels que l'oxygène moléculaire, le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), la tétrahydrobioptérine, la flavine mononucléotide, la flavine adénine dinucléotide, l'hème et le complexe calcium/calmoduline pour la synthèse du NO [142, 143]. Les NOS-1 (NOS neuronale) et NOS-3 (NOS endothéliale) sont des enzymes NOS synthétisées de façon constitutives et régulées par le complexe

calcium/calmoduline. L'enzyme NOS-2 (NOS inducible) est une des enzymes NOS induite en réponse à des stimuli inflammatoires et est activée de manière indépendante du calcium, puisque l'enzyme est toujours liée au complexe calcium/calmoduline une fois qu'elle est synthétisée. Les trois isoformes de NOS sont codées par trois gènes différents sur différents chromosomes, et elles présentent une homologie de 50 à 60% l'une envers l'autre ainsi qu'avec les enzymes du cytochrome P450 [144-147]. Les isoformes de NOS possèdent un groupement hème prosthétique et sont actives en tant qu'homodimères constitués de deux monomères identiques, qui peuvent être divisées en un domaine C-terminal carboxyle réductase et un domaine aminé N-terminal oxygénase [145, 148]. De plus, le NO médie ses effets soit par le biais de mécanismes dépendants du GMPc, soit par des mécanismes indépendants du GMPc. Le mécanisme dépendant du GMPc est médié par son récepteur, la guanylate cyclase soluble (GCs). Or, les effets indépendants du GMPc provenant du NO sont médiés par son interaction avec les complexes métalliques, l'oxygène ( $O_2$ ), et l'ion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) qui médient différents événements en aval. Des études antérieures ont clairement démontré le rôle crucial du NO au cours du développement. Ce rôle a été principalement identifié à l'aide de la création d'animaux knock-out (KO) pour les enzymes NOS dans toutes les combinaisons des trois isoformes [149]. Auparavant, il a été attribué un rôle compensatoire aux isoformes de NOS puisqu'ils pouvaient permettre aux modèles KO simples pour NOS de se développer plutôt normalement, mais il y avait tout de même des malformations cardiaques [150, 151]. Or, il a été démontré qu'en induisant un double-KO pour les NOS chez des animaux, on pouvait observer une diminution de viabilité et surtout une incapacité de produire une progéniture avec d'autres animaux double-KO. Cependant, puisque ces animaux double-KO étaient tout de même capables de se reproduire avec des animaux de type sauvage, un défaut dans le développement était à prévoir. Pour confirmer la nécessité du NO dans le développement, un modèle triplement KO pour les enzymes NOS, ayant ainsi une production endogène de NO totalement nulle, démontra également un faible taux de survie et une réduction significative du nombre de descendants [152]. De plus, les animaux ayant subis le KO pour les NOS présentaient des troubles de diabète insipide néphrogénique et de l'artériosclérose. Ces résultats ont ainsi fourni la première preuve que la suppression systémique de l'ensemble des trois NOS pouvait causer une variété de maladies

cardio-vasculaires chez la souris, démontrant ainsi le rôle essentiel du système endogène NOS dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire.

### ***1.8.2 IMPLICATION DU NO/GCs/GMPc DANS LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES***

#### ***SOUCHES :***

Le rôle important de la voie de signalisation impliquant le NO-GMPc dans la régulation de la différenciation des cellules souches a émergé suite aux études de Murad et al [153-157], de nos travaux [28] ainsi que d'autres chercheurs. L'importance de la voie de signalisation impliquant le NO-GMPc dans la différenciation des cellules souches adultes a été mise en évidence par le travail d'autres chercheurs, qui ont démontré que l'altération des niveaux de NO-GMPc intracellulaire pouvait moduler la différenciation des cellules souches progénitrices dérivées de la moelle osseuse [158-162]. En effet, l'importance du NO dans la régulation du nombre de cellules souches et de leur fonction *in vivo* a été démontrée par l'exposition de souris à des inhibiteurs de NOS, montrant une augmentation du nombre de cellules souches par rapport à des souris non traitées [160]. Par ailleurs, d'autres études menées chez des souris KO pour le gène eNOS (isoforme endothélial du NOS) démontrèrent que ces souris avaient une déficience quant à la mobilisation des cellules souches et progénitrices de moelle osseuse [161], ce qui pourrait avoir un lien avec leur incapacité à produire de nouveaux vaisseaux sanguins (néo-vascularisation). En outre, ces souris KO pour le gène eNOS présentent une capacité nettement réduite quant à la production de cellules endothéliales progénitrices à partir de cellules souches hématopoïétiques. Par conséquent, ces souris sont incapables de revasculariser les tissus ayant subi une lésion ischémique [162]. Le rôle du NO dans le développement du cœur a été auparavant mis en évidence dans des études impliquant des embryons et des cellules souches en développement. Dans ces études, il a été démontré que les cardiomyocytes dérivés à partir de cellules souches embryonnaires exprimaient NOS-2 et NOS-3, de façon similaire aux observations faites *in vivo*. En outre, l'incubation de ces cultures cellulaires avec l'inhibiteur de NOS, L-NG-Nitroarginine Methyl Ester (L-NAME), a entraîné un arrêt complet de la différenciation de ces CM [163]. Il a en outre été démontré que le NO peut faciliter la différenciation de CSE en CM via deux stimulations exogènes : d'une part avec des



donneurs de NO, d'autre part via l'introduction du gène NOS-2. De façon intéressante, cette étude portant sur le rôle du NO endogène dans la différenciation des CSE en CM semble différer des études précédentes, puisque dans cette étude, la différenciation n'a été que légèrement compromise en présence du L-NAME [164]. Plusieurs études menées par Murad et al [153-157] indiquent que l'isoforme NOS-1 est exprimé à la fois chez la souris et dans les CSE humaines. De plus, leurs études ont démontré que le niveau d'expression d'ARNm et de protéine de NOS-1 tombait au niveau basal lorsque les CSE se différenciaient. En revanche, il a été observé que les isoformes NOS-2 et NOS-3 étaient induits lors des différentes étapes de la différenciation des CSE, que ce soit des cellules d'origine murine ou humaine. En effet, cette observation de la régulation temporelle des enzymes NOS a permis de mettre en évidence que les CSE n'expriment pas de récepteur liant le NO (GCs) enzymatiquement actif. Toutefois, il a été démontré que les niveaux d'expression des sous-unités  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , et  $\beta 1$  de la GCs augmentent durant la différenciation cellulaire, ce qui coïncide avec une forte augmentation des niveaux intracellulaires de GMPc médiés par le NO dans les cellules différenciées à partir des CSE ainsi que les CM dérivés des CSE [153, 154]. En revanche, il a été observé que l'expression du gène de la sous-unité  $\beta 2$  de la GCs dans les CSE humaines diminue à mesure que la différenciation cellulaire progresse, ce qui indiqua aux chercheurs que cette sous-unité pourrait avoir un certain rôle dans la pluripotence des cellules souches. Ainsi, tous ces résultats mis ensemble indiquèrent la participation des voies de signalisation impliquant le NO dans la différenciation des cellules souches. En effet, il a été démontré qu'en plus des donneurs de NO, les stimulateurs allostériques de la GCs, BAY41-2272 ainsi que le stimulateur YC-1, augmentaient nettement l'expression des facteurs de transcription cardiaques spécifiques ainsi que l'expression des protéines cardiaques spécifiques [155]. Fait intéressant, il a été démontré que la mobilisation du calcium intracellulaire médiée par le récepteur OTR a été nécessaire pour réguler l'augmentation du NO dans les cellules endothéliales [165]. Danalache et al [28] ont constaté que le L-NAME, le N-(3-(Aminométhyl)benzyl)acetamidine (1400W) et l'1H-(1,2,4)oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), des inhibiteurs de la voie de signalisation NO/GCs/GMPc, avaient initié de façon modeste la cardiomyogenèse dans les CECs de souris P19. De plus, Danalache et al [28] ont aussi remarqué qu'OT augmentait le

niveau d'expression d'eNOS au cours de la différenciation des cellules P19 en CM, et que l'inhibition de la voie de signalisation NO/GCs/GMPc au cours de ce processus réduit le rendement des CM. Ce même groupe a aussi démontré que le NO produit sous l'effet du donneur de NO, S-nitroso-N-acetyl penicillamine (SNAP), bien qu'ayant une activité cardiomyogénique, n'a pas initié la différenciation en CM induite par l'OT [28]. En effet, les colonies de cellules battantes obtenues sous la stimulation de l'OT étaient plus grandes que dans les cellules en cultures induites par SNAP. Ceci a suggéré l'existence d'autres voies de signalisation impliquées dans la cardiomyogenèse induite par la stimulation de l'OT, qui pourraient être supplémentaires ou complémentaires à celle du NO/GCs/GMPc. En outre, il a été démontré que l'inhibition de la voie du NO initie partiellement la différenciation des cellules P19 en CM, suggérant que le NO influe sur la différenciation des cellules P19 en CM via un mécanisme pléiotrope [28]. Ainsi, il a été suggéré que la diminution de NO via le L-NAME aurait pu activer un mécanisme supprimant une barrière répressive sur la différenciation et/ou fournissant un élément capable d'initier la cardiomyogenèse, mais que ce mécanisme est insuffisant pour terminer la différenciation et la maturation des CM. À cet égard, Danalache et al [28] ont observé que l'OT ainsi que le L-NAME ont favorisé la prolifération des cellules P19, or cette prolifération a été diminuée par le donneur de NO, SNAP. Il a ainsi été proposé que l'effet sur la prolifération puisse être l'un des mécanismes d'action cardiomyogénique du L-NAME, estimant que la forte densité de cellules pouvait induire la différenciation des cellules souches en CM de façon spontanée [166]. De plus, il a été observé que la combinaison de différents donneurs de NO et de stimulateurs de la GCs activaient encore plus l'expression des marqueurs cardiaques spécifiques, tout en augmentant l'expression des sous-unités de la GCs, au niveau des ARNm et des protéines. Ces études démontrent donc que les donneurs de NO ainsi que les divers activateurs de la GCs seuls ou en combinaison peuvent faciliter la différenciation des cellules souches en myocytes cardiaques, avec une forte augmentation de l'accumulation du second messager GMPc [155], impliquant ainsi un rôle crucial de la voie de signalisation NO-GMPc dans la différenciation des cellules souches. Bien que la voie du NO/GCs/GMPc soit impliquée dans la différenciation cardiaque, il n'en reste pas moins que le rôle de la voie NP/GCp/GMPc ne soit pas encore élucidé.

### ***1.8.3 IMPLICATION DE LA GCp/GMPc DANS LA FONCTION CARDIAQUE :***

Les enzymes du guanylate cyclase particulé (GCp) ont été trouvées dans presque tous les tissus et tous les types de cellules, toutefois, leur distribution est spécifique de certains isoformes. Sept différents isoformes de l'enzyme ont été identifiés à ce jour chez les vertébrés, leur nomenclature va de GC-A à GC-G [167]. Parmi elles, GC-A semble être la plus largement exprimée à travers tout le corps dans différents types cellulaires. En effet, elle a été retrouvée dans les cellules du système nerveux, les cellules du système immunitaire, du rein, du poumon, de l'intestin, des testicules, et du cœur [168-172]. GC-B est également exprimée dans différents organes y compris le cerveau, les reins, les poumons, la rate, les testicules, et les yeux [171, 173]. GC-C quant à elle est presque exclusivement exprimée dans le tractus intestinal, principalement dans l'intestin grêle, mais elle est également présente dans le foie, l'utérus et le rein [174-177]. GC-D est exprimée principalement dans les cellules olfactives [178]. GC-E et GC-F ont été trouvées principalement dans les cellules photoréceptrices de la rétine des vertébrés, et elles sont aussi appelés GC rétinienne ou photorécepteur spécifiques [179-185]. GC-E a été détectée dans la glande pinéale de rat, de bovin et de poulet [186-188]. La dernière cyclase particulière découverte, à savoir GC-G, a été retrouvée dans les poumons, l'intestin et le muscle squelettique [189]. Le NO et les PNs partagent d'importantes similitudes puisqu'ils agissent tous les deux comme des vasodilatateurs, via l'activation des voies de signalisation impliquant la GC / GMPc. En effet, le NO active l'hémoprotéine hétérodimérique cytoplasmique, GCs [190], tandis que les PNs activent la protéine membranaire, le GCp [107, 173]. La stimulation d'un des GC, que ce soit le GCs ou le GCp, résulte en la conversion du GTP en second messenger intracellulaire, le GMPc, qui est responsable pour réguler l'homéostasie cardiovasculaire. Il a été démontré que le système NO-GCs-GMPc est influencé par la concentration ambiante de NO, éventuellement à travers un mécanisme dépendant du GMPc [191]. Par ailleurs, Gyurko et al, avaient observé que les concentrations cardiaques de GMPc étaient les mêmes chez les souris KO pour le gène eNOS ainsi que chez les souris de type sauvage, malgré l'absence d'eNOS fonctionnelle. Cette observation les avait conduits à rechercher d'autres stimulateurs physiologiques de l'activité guanylyl cyclase cardiaque, tels que l'ANP [192]. Ainsi, Gyurko et al, avaient constaté une hausse de

l'expression de l'ANP dans le ventricule gauche des souris KO pour le gène eNOS, fournissant un mécanisme compensatoire pour maintenir les niveaux basaux de GMPc malgré l'absence d'eNOS [192]. En effet, une autre étude a permis d'identifier une interaction entre les systèmes impliquant le NO-GCs-GMPc et les systèmes impliquant l'ANP-GCp-GMPc, de telle mesure que des changements dans la sensibilité d'une des voies de signalisation sont imités par le système suppléant afin de compenser en générant le GMPc [193]. Ainsi, pris ensemble ces résultats suggèrent que les voies de signalisation GCs-GMPc et GCp-GMPc ont un rôle complémentaire dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire. Par ailleurs, une étude plus récente a démontré que les deux récepteurs couplés à la GCp, soit NPR-A et NPR-B, sont modulés par la voie de signalisation impliquant le NO / GMPc dans l'aorte de souris [194].

### **I.9 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS:**

Suite aux évidences antérieures apportées par notre groupe concernant l'implication du GMPc dans la différenciation des CECs en CM fonctionnels, et aussi grâce aux évidences démontrant que l'ANP médie son activité physiologique en stimulant la production du GMPc, nous nous sommes intéressés à l'ANP comme agent cardiomyogénique sur la base des observations suivantes :

- L'OT, en se liant à son récepteur OTR situé au niveau des oreillettes, induit la libération de l'ANP qui est un peptide produit, stocké et sécrété par les myocytes cardiaques.
- L'OT, un morphogène myogénique établi, induit la différenciation des cellules souches embryonnaires carcinomateuses de souris P19 en cardiomyocytes fonctionnels.
- Il a été démontré que l'OT induisait la différenciation des cellules souches embryonnaires carcinomateuses de souris P19 en cardiomyocytes via la libération du second messager GMPc médiée par le NO.

- Tout comme l'OT, il a été démontré que l'ANP induisait aussi la production du GMPc.
- De plus, l'ANP est impliqué dans la natriurèse, le contrôle de la pression artérielle, la vasodilatation et le développement du cœur.

Puisque l'OT stimule la libération de l'ANP, induit la différenciation cardiaque dans les cellules P19 par le biais de la production du GMPc via le NO, et puisque l'ANP stimule aussi la production du GMPc alors notre hypothèse est que l'ANP pourrait stimuler la cardiomyogenèse dans les cellules P19.

Nous nous sommes intéressés aux SP comme sous-population cellulaire des cellules souches embryonnaires carcinomateuses de souris P19 sur la base des observations suivantes :

- De nombreuses études ont démontré que le cœur lésé pouvait être régénéré à partir d'une population isolée de cellules souches et progénitrices transplantées.
- Une de ces populations de cellules, fréquemment isolées à partir d'organes provenant d'animaux aux stades de développement embryonnaire et adulte, appelée « Side Population » (SP), sont identifiées par cytométrie en flux (FACS) comme une population de cellules non marquées par le colorant fluorescent Hoechst 33342.
- La sous-population de cellules SP isolée du cœur affiche un potentiel de différenciation cardiaque amélioré en réponse à un traitement de l'OT.
- Récemment, l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des cellules souches embryonnaires a été mise en évidence, et cela a été corrélé avec la présence de sous-populations cellulaires ressemblant beaucoup aux cellules SP issues du cœur.
- Toutes ces observations suggèrent que les SP de cellules souches embryonnaires pourraient être de bon candidat ayant un plus grand potentiel d'induire la différenciation cellulaire vers le phénotype cardiaque.

Dans ce mémoire, nous avons donc voulu mettre en évidence le potentiel du peptide natriurétique auriculaire comme inducteur de la différenciation cardiaque dans des SP de cellules souches embryonnaires carcinomateuses de souris P19. Nous avons également voulu vérifier l'hypothèse selon laquelle dans les cellules souches embryonnaires carcinomateuses de souris P19, l'ANP sert de médiateur de la différenciation en cardiomyocytes. Dans ce contexte, nous avons aussi voulu déterminer si la voie de signalisation ANP/GCp/GMPc est impliquée dans la différenciation cardiaque.

Pour cela nos objectifs ont été les suivants :

- Déterminer la présence et isoler, s'il y a lieu, les SP issues des cellules souches embryonnaires carcinomateuses de souris P19.
- Caractériser le phénotype de ces cellules
- Déterminer la concentration optimale d'ANP, d'OT et de l'antagoniste A71915 pour induire la différenciation cellulaire, c'est-à-dire la concentration la moins cytotoxique pour les cellules.
- Déterminer si l'ANP induit la cardiomyogenèse dans les cellules SP P19 en identifiant le phénotype obtenu à l'aide de marqueurs de cellules progénitrices cardiaques.
- Déterminer si l'ANP induit l'apparition de colonies de cellules battantes et si l'ANP potentialise les effets cardiomyogéniques de l'OT et s'il y a lieu, déterminer le phénotype des cellules différenciées.
- Déterminer si le blocage de la production du GMPc, médié par le récepteur NPR-A de l'ANP, en utilisant l'antagoniste A71915, est impliqué dans la différenciation cardiaque.
- Si l'antagoniste A71915 est impliqué dans le phénomène de différenciation cardiaque, déterminer si celui-ci potentialise les effets de l'ANP et de l'OT.

Enfin, dans ce mémoire, nous résumerons aussi ce que ce modèle *in vitro* nous a appris sur les mécanismes de différenciation cardiaque.

## CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

### II.1 CULTURE ET INDUCTION DE LA DIFFÉRENCIATION CARDIAQUE DES

**CELLULES P19.** Les cellules P19, une lignée cellulaire dérivée d'un carcinome embryonnaire induit chez la souris C3H/He, ont été obtenues à partir de l'American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD) et cultivées dans du milieu de culture  $\alpha$ -minimum essentiel medium (MEM) (Invitrogen, Grand Island, NY) supplémenté avec 10% de sérum d'origine fœtal (FBS; Invitrogen), 100 U / ml de pénicilline (Invitrogen) et 100 pg / ml de streptomycine (Invitrogen). Toutes les cellules ont été passées à 2-3 jours d'intervalle afin qu'elles puissent atteindre entre 60-70% de confluence puis les cellules mortes ont été retirées en utilisant un kit de purification par microbilles magnétiques appelé « Dead Cell Removal » (Miltenyi Biotec). Les cellules P19 ont ensuite été propagées et différenciées selon les procédures de Rudnicki et McBurney, avec des modifications mineures (voir Figure) [195]. Brièvement, en utilisant la méthode de la « goutte pendante », des gouttelettes (50 par pétri) de 25  $\mu$ l de milieu  $\alpha$ -MEM complet supplémenté avec de l'ANP  $10^{-7}$ M et / ou de l'OT  $10^{-7}$ M, contenant chacune 1000 cellules, ont été placées en suspension sur une surface non adhérente telle que l'intérieur du couvercle de boîtes de Pétri (pétri de 10 cm de diamètre). 10 mL de tampon phosphate salin (PBS) 1X a été placé dans la partie inférieure du pétri, afin d'empêcher la déshydratation ou l'évaporation des gouttelettes suspendues dans le couvercle. Les cellules ont été stimulées pendant 5 jours en présence de l'ANP  $10^{-7}$ M, l'OT  $10^{-7}$ M, A71915  $10^{-6}$ M et les combinaisons OT+ANP, A71915+ANP, A71915+OT. Au jour 5, les sphéroïdes multicellulaires tridimensionnels, formés par gravitation des cellules dans la goutte, ont été transférés dans des pétris de culture (10 cm de diamètre) et cultivés dans 10 ml de milieu  $\alpha$ -MEM complet contenant 10% de FBS inactivé par la chaleur et 1% de pénicilline / streptomycine en l'absence des inducteurs. Les populations cellulaires ont été ensuite analysées à partir du jour 6 jusqu'au jour 14 du protocole de différenciation cardiaque pour observer l'apparition des colonies de cellules battantes avec un microscope inversé Zeiss (Zeiss IM, Carl Zeiss, Jena, Allemagne) équipé d'objectifs à contraste de phase et avec un appareil photo MC-100. De plus, les changements



morphologiques des cellules P19 ont été examinés.

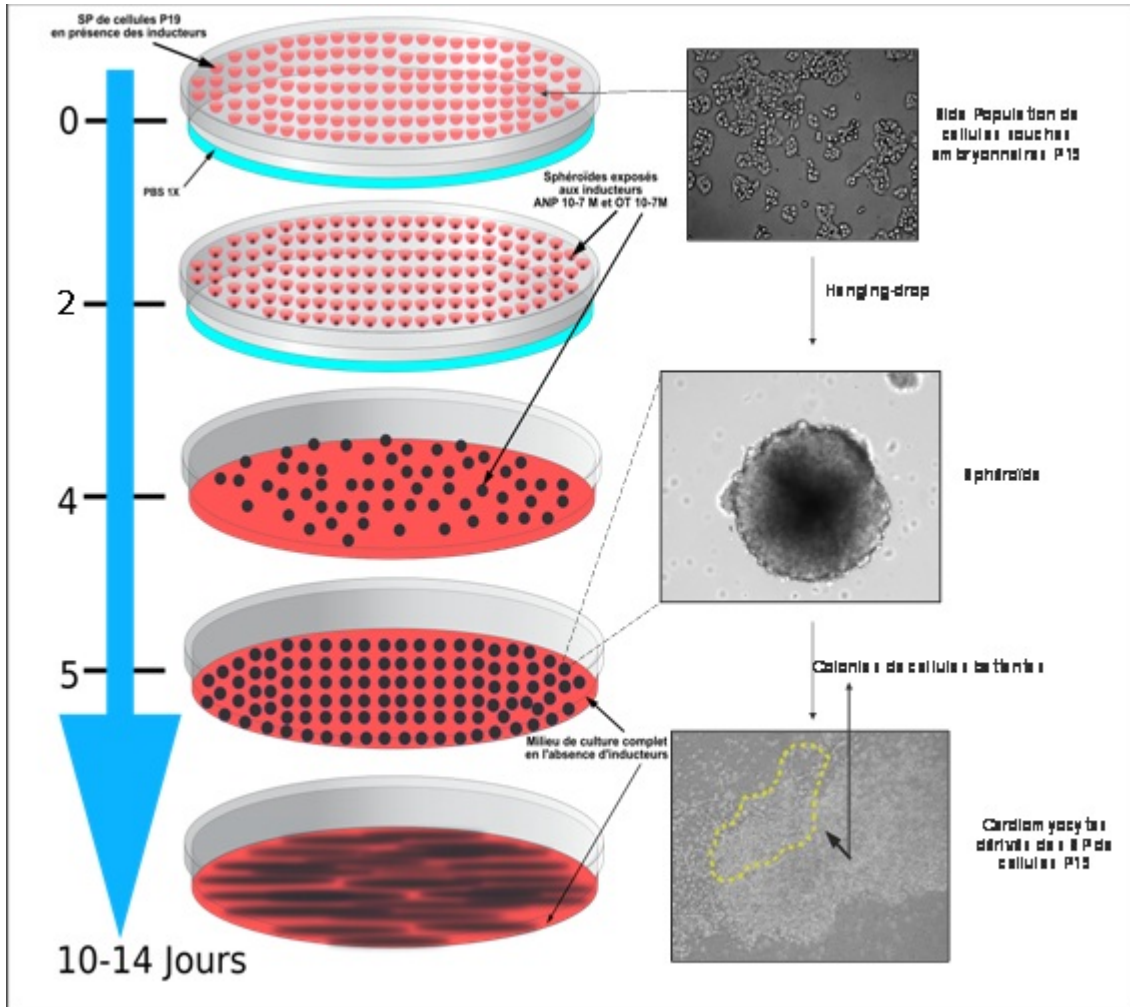


Schéma 7 - Méthode de la goutte pendante [195].

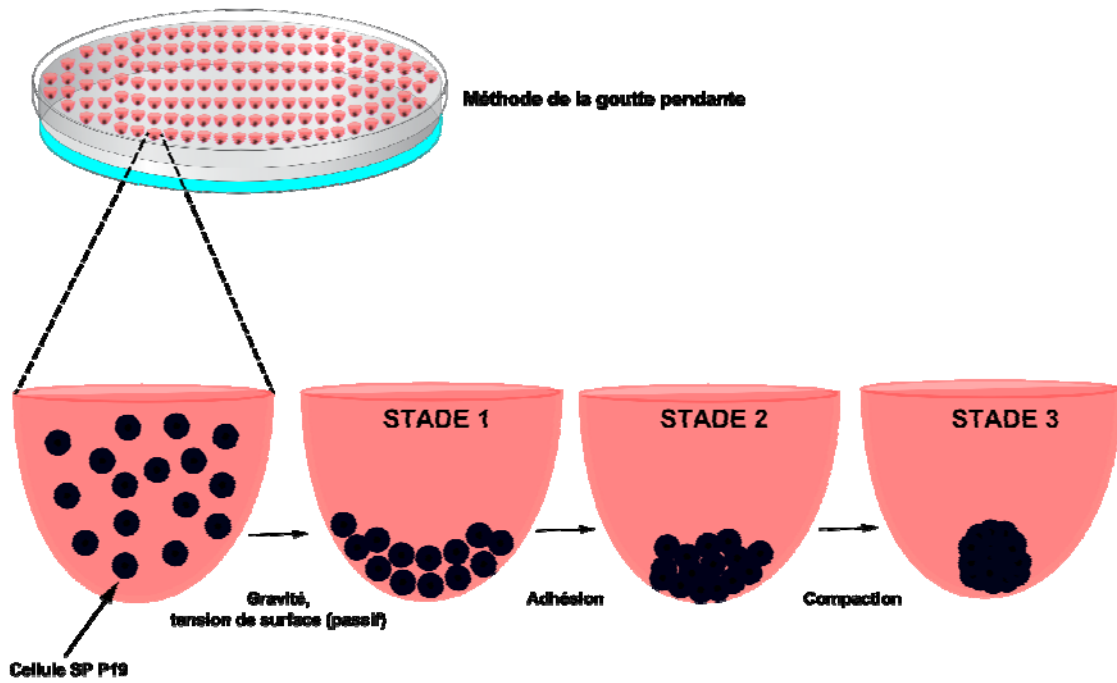


Schéma 8 - Processus de formation des sphéroïdes (adaptée de [196]).

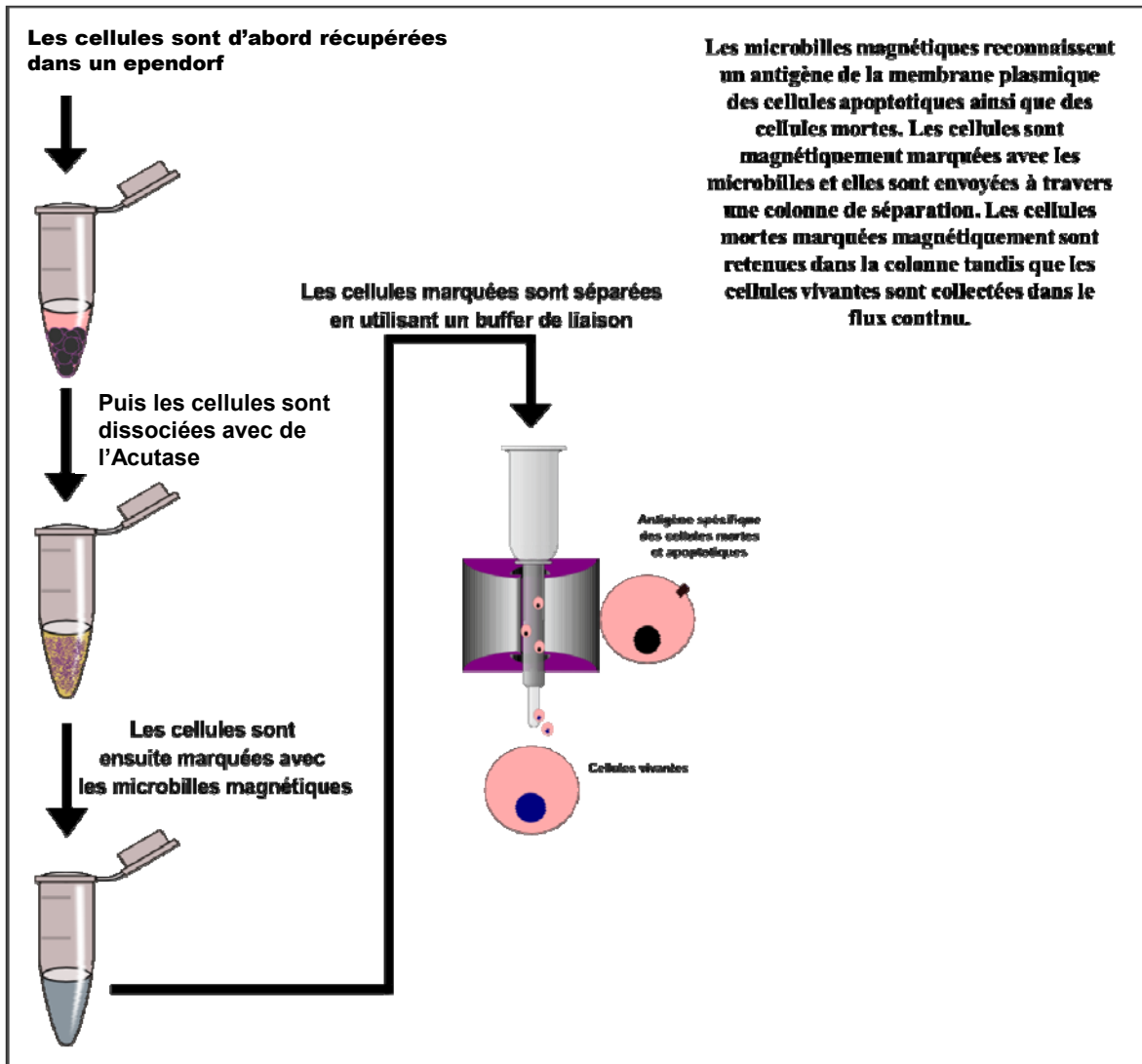


Schéma 9 - Purification des cellules SP P19 avec les microbilles magnétiques.

**II.2 IMMUNOFLUORESCENCE.** Dans le cas de la procédure d'immunofluorescence des sphéroïdes, les sphéroïdes ont été recueillis dans des tubes coniques de 50 ml. Ils ont ensuite été colorés à l'hématoxyline ou l'acridine orange pendant 10 min. Suite à cela, ils ont été lavés 4 fois pendant 5 min chacun avec du PBS 1X jusqu'à ce que l'excès de colorant ait été retiré des sphéroïdes. Ensuite, les sphéroïdes ont été fixés à l'aide d'une incubation de 15 min dans un fixateur histologique tamponné neutre appelé TissuFix (fourni par le département de pathologie du CHUM-Hôtel Dieu) et ensuite ils ont été lavés avec du PBS 1X 4 fois pendant 5 min. Afin de préparer les sphéroïdes pour la cryosection, les sphéroïdes ont été incubés dans un gel appelé optimum cutting temperature (OCT) jusqu'à ce que des coupes histologiques soient faites. Les sections de sphéroïdes ont ensuite été rincées dans du PBS 1X 3 fois pendant 5 min. Les sphéroïdes fixés ont été perméabilisés pendant 10 min dans du PBS 1X contenant 0,25% de Triton X-100, et ils ont été bloqués avec du PBST 1X contenant 1% d'albumine de sérum bovin (BSA) pendant 30 min. Les sections ont ensuite été incubées avec Tom22, GATA4, Nkx2.5 à 4°C pendant la nuit dans le PBST 1X contenant 10% de sérum d'animaux, respectivement. Après trois lavages de 5min chacun dans du PBS 1X, les sections ont été incubées avec l'anticorps secondaire pendant 1 h dans l'obscurité à la température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées 3 fois pendant 5 min à chaque fois avec du PBS 1X dans l'obscurité. Puis, les cryosections ont été montées et colorées avec du 1,5 µg/ml de 4', 6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) contenant un réactif protecteur contre la perte de fluorescence. Enfin, l'immunofluorescence a été visualisée à l'aide d'un microscope inversé Zeiss (Zeiss IM, Carl Zeiss, Jena, Allemagne).

Dans le cas de la procédure d'immunocytochimie, les cellules ont été cultivées sur des lamelles de verre circulaire recouvertes de 0,01% de poly-L-Lysine. Elles ont ensuite été fixées par incubation de 15 min dans du tissuFix à température ambiante, et conservées à 4 degrés dans ce tampon fixateur jusqu'à son utilisation. Toutes les étapes subséquentes de perméabilisation, de blocage, de lavage et d'incubation avec les anticorps ont été effectuées à température ambiante. Les cellules fixées ont tout d'abord été lavées brièvement avec du PBS 1X, puis elles ont été perméabilisées avec du PBS 1X contenant 0,25% de Triton X-100 pendant 10 min, et elles ont été bloquées avec du PBS-Tween (PBST) 1X contenant 1% de BSA pendant 30 min. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 1 heure avec les anticorps primaires dilués 1/200. Après trois lavages de 5 min chacun dans du PBS 1X, les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire conjugué à la fluorescéine diluée 1/400 pendant 1h dans l'obscurité à la température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées 3 fois pendant 5 min à chaque fois avec du PBS 1X dans l'obscurité. Puis, les lamelles de verre

ont été montées et colorées avec 1,5 µg/ml de 4', 6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) contenant un réactif protecteur contre la perte de fluorescence. Enfin, l'immunofluorescence a été visualisée à l'aide d'un microscope inversé Zeiss (Zeiss IM, Carl Zeiss, Jena, Allemagne).

### **II.3 ISOLATION DES « SIDE POPULATION » DE CELLULES P19 PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX (FACS) EN UTILISANT LE COLORANT NUCLÉAIRE HOECHST 33342**

les expériences d'isolation des SP de P19 ont été réalisées selon les procédures de Goodell, M., et al. [55], avec des modifications mineures. Brièvement, un seul homogénat cellulaire, obtenu par trypsinisation de cellules P19 en culture, a été centrifugé 5 min à 1000g et rincé une fois avec du milieu de culture alpha-MEM supplémenté avec 10% de FBS pour éliminer les traces de trypsine. Le culot cellulaire a ensuite été remis en suspension à  $10^6$  cellules par millilitre dans du milieu de culture alpha-MEM, supplémenté avec 10% de FBS, contenant le colorant fluorescent Hoechst 33342 (Ho) (Sigma) aux concentrations indiquées (voir procédure de Goodell, et al [55]) et incubé pendant 90 min dans un bain marie chauffé à 37°C. Le contrôle négatif des SP a été exécuté 5 min avant l'analyse par FACS, en incubant le culot cellulaire avec le Ho et le vérapamil (VP) (Sigma), un bloqueur des pompes utilisées par les SP pour exclure le colorant Ho, aux concentrations indiquées. Après l'incubation à 37°C, les échantillons ont été refroidis sur la glace pendant 5 min et centrifugés à 1000g pendant 5 min à 4°C. Les cellules colorées avec le colorant Ho ont ensuite été remises en suspension dans du D-PBS 1X pré-refroidi, supplémenté avec 2% FBS, et maintenu sur de la glace dans l'obscurité jusqu'à l'isolement des cellules par FACS, généralement pas plus de 30 min. Juste avant l'analyse par FACS, il a été ajouté 2 µg/ml d'iodure de propidium (PI) (Sigma) afin de distinguer les cellules vivantes et les cellules mortes.

## **II.4 MÉTHODOLOGIE DE LA RÉACTION EN CHAÎNE PAR POLYMÉRASE EN TEMPS-RÉEL (RT-PCR) :**

**II.4.1 EXTRACTION DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE (ARN) TOTAL :** Avant de commencer l'extraction d'ARN, tout l'espace de travail et tous les équipements ont été lavés avec un décontaminant, le ribonucléase (RNase) AWAY. Ensuite, les échantillons de tissus préalablement stockés à -80 °C, ont ensuite été placés sur la glace sèche. Puis, à l'aide d'azote liquide, les tissus ont été congelés et pulvérisés via un pistolet broyeur. Ensuite par l'intermédiaire d'une spatule, 50-100 mg de chaque échantillon de tissu a été placé dans 1ml de réactif TRIZOL. Enfin à l'aide d'un appareil Polytron, les tissus ont été homogénéisés dans le TRIZOL. Les échantillons ont été homogénéisés (trois fois pendant dix secondes (sec) à chaque fois) tout en étant maintenu sur de la glace. L'équipement a été lavée avec de l'eau, l'éthanol, et dans TRIZOL entre les groupes-échantillon (seulement pour des échantillons de tissu). Les échantillons de cellules quant à eux ont été placés directement dans 1 ml de TRIZOL ( $10^6$  cellules pour 1 ml TRIZOL) et homogénéisés en étant vortexés 3 fois. Suite à cela, les échantillons homogénéisés ont été incubés pendant 5 minutes de 15 à 30 °C pour permettre la dissociation complète des complexes nucléoprotéiques. Ensuite 0,2 ml de chloroforme, conservé dans la glace, a été ajouté pour chaque 1 ml de TRIZOL. Chaque tube a été agité vigoureusement à la main pendant 15 secondes et incubé entre 15 et 30 °C pendant 2 à 3 minutes. Tous les échantillons ont été par la suite centrifugés pendant 15 minutes à une vitesse de 12.000 xg à 4 °C. Après la centrifugation, le mélange se sépare en trois phases : une phase inférieure rouge, phase phénol-chloroforme, une interphase et une phase aqueuse supérieure incolore. L'ARN reste exclusivement dans la phase aqueuse supérieure. Le volume de la phase aqueuse est d'environ 60% du volume de réactif TRIZOL utilisé pour l'homogénéisation. Ainsi, la phase aqueuse supérieure incolore a été transférée dans de nouveaux tubes pré-refroidis. 0,5 ml d'isopropanol a été ensuite ajouté à chaque tube, les tubes ont été vortexés, et enfin laissé une nuit à une température de -20 °C pour laisser précipiter au maximum les ARNs au fond du tube. Le lendemain, les tubes ont été à nouveau centrifugé pendant une période de dix minutes à une vitesse de 12.000 xg à 4 °C et

le surnageant a été complètement enlevé pour ne garder que le culot. 0,5 ml d'éthanol à 75% préparé avec de l'eau absent de ribonucléase - désoxyribonucléase (RNase-DNase), conservé dans la glace, a été ajouté à chaque tube, et les tubes ont été vortexés pendant une minute. Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant une période de 5 min à une vitesse de 7500 xg à 4 °C, et une fois de plus le surnageant a été complètement enlevé. Le culot d'ARN a été laissé à l'air libre pendant une période de dix minutes tout en étant maintenu sur de la glace, et l'eau sans RNase-DNase a finalement été ajouté à chaque tube afin de dissoudre l'ARN. Chaque tube a été ensuite mis à incuber dans un bain d'eau à 65 °C pendant une période de cinq minutes, replacé tout de suite dans de la glace pour refroidir les échantillons, vortexé, et placé ensuite dans une machine de spin-down pendant dix secondes, afin que la concentration des ARNs puisse être mesurée ultérieurement. Mesure de la concentration des ARNs: 2 µL de chaque échantillon d'ARN a été placé dans 0,5 ml d'eau absent de RNase-DNase, puis chaque échantillon a été vortexé et la concentration en ARN de chaque échantillon a été mesurée en utilisant le spectrophotomètre Ultrospec 3100 pro UV / visible. Un ratio A260/A280 de 1.6 à 2.4 implique une bonne pureté de l'échantillon.

**II.4.2 PURIFICATION DES ARN AVEC LE TRAITEMENT DNase :** 30 µg d'ARN a été prélevé de chaque échantillon et à ceux-là assez d'eau absente de RNase-DNase a été ajouté. Puis, une solution de trishydroxyméthylaminométhane - acide chlorhydrique (Tris-HCl) 200 mM, une solution de chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>) 20 mM, de désoxyribonucléase (DNase) 1 (182 unités / µL), et de RNaseOUT (40 unités / µL) ont été ajoutés à chaque échantillon. Les échantillons ont ensuite été incubés pendant une période de 30 min à 37 °C, et du TRIZOL ainsi que du chloroforme ont été ajoutés par la suite à chaque échantillon. Chaque échantillon a été agité doucement pendant une période de 15 secs, puis les échantillons ont été incubés pour une période de cinq minutes à température ambiante. Les échantillons ont ensuite été centrifugés pour une période de 15 min à une vitesse de 12.000 xg à 4 °C, et la phase aqueuse supérieure incolore a été récupérée. Puis l'isopropanol a été ajouté à chaque échantillon, les échantillons ont été vortexés, et laissés toute la nuit à -20 degrés pour laisser précipiter l'ARN. Le lendemain, les tubes ont été centrifugés à nouveau pour une période de 10 min à une vitesse de 12.000 xg à 4 °C et le surnageant a été

complètement enlevé. L'éthanol à 75% préparée avec l'eau absent de RNase, conservé dans la glace, a été ajouté à chaque tube, et les tubes ont été vortexés pendant une minute. Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant une période de 5 min à une vitesse de 7500 xg à 4 °C, et une fois de plus le surnageant a été complètement enlevé. Le culot d'ARN a été laissé à l'air libre pendant une période de dix minutes tout en étant maintenu sur de la glace, et de l'eau absent de RNase a finalement été ajouté à chaque tube afin de dissoudre l'ARN. Chaque tube a été ensuite mis à incuber dans un bain d'eau à 65 °C pendant une période de 5 min, replacé tout de suite dans de la glace pour refroidir les échantillons, puis les échantillons ont été vortexés et placés dans une machine de spin-down pendant dix secondes afin que la concentration des ARNs puisse être mesurée ultérieurement.

**II.4.3 TRANSCRIPTION INVERSE DE L'ARNm EN ADNc:** 4 µg d'ARN ont été prélevés sur chaque échantillon et à ceux-là assez d'eau absente de RNase-DNase a été ajouté pour atteindre le même volume final dans chaque tube. Ensuite, une solution d'amorces aléatoires a été ajoutée à chaque échantillon. Les échantillons ont ensuite été incubés pendant une période de 10 min à 70 °C. Après cette étape, une solution de First Strand Buffer 5X, une solution de déoxynucléoside triphosphate (dNTPs) (Adénine, Cytosine, Guanine, Thymine), de l'eau absent de RNase, une solution de dithiothreitol (DTT) 0.1M, une solution de RNaseOUT, et une solution d'enzyme reverse transcriptase de M-MLV ont ensuite été ajoutées à chaque échantillon. Les échantillons ont ensuite été bien agités et incubés pendant une période de 60 min à 42 °C suivi de 5 min à 70 °C.

**II.4.3 EXTRACTION DES RÉSULTATS A PARTIR DE L'ADNc:**

Une fois que l'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) a bien été vortexé, 2µl d'ADNc ont ensuite été placés dans les puits d'une plaque à PCR de 96 puits iCycler iQ. À chaque puits, il a été ajouté une solution composée de : IQTM SYBR Green Supermix, de l'eau absent de RNase-DNase, 50 pmol d'amorces Sens et 50 pmol d'amorces anti-Sens, afin d'obtenir un volume final dans chaque puits de 20µL. La plaque a ensuite été recouverte d'un film protecteur, et placée la machine de PCR en temps réel (Color Real-Time PCR



Detection System iCycler iQ), et pour finir le programme d'amplification de la plaque de PCR sélectionnée a été démarré.

#### ***II.4.4 PARAMÈTRES D'AMPLIFICATION DE LA MACHINE DE PCR EN TEMPS RÉEL:***

Cycle 1: 95 °C pendant 03:00 min

Cycle 2 (40X): 95 °C pendant 00:25 min  
60 °C pendant 00:25 min  
72 °C pendant 00:40 min

Cycle 3: 95 °C pendant 01:00 min

Cycle 4: 55 °C pendant 01:00 min

Cycle 5: 55 °C pendant 00:10 min

***II.4.5 SÉLECTION DU GÈNE CONSTITUTIF GAPDH POUR LA MESURE SEMI-QUANTITATIVE DE L'EXPRESSION DES ARNm:*** glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été utilisé, comme gène constitutif dans toutes les expériences décrites, dans le but de normaliser tous les niveaux d'ARNm à la fois entre et au sein des groupes d'échantillons, et aussi dans les deux cas. La raison pour laquelle GAPDH a été utilisé, est que dans toutes les expériences, celui-ci a montré un taux de variabilité très bas entre les échantillons.

#### **II.4.6 CALCUL DE L'EXPRESSION DES ARNm PAR LA MACHINE DE PCR EN TEMPS**

**RÉEL:** L'expression relative des produits de RT-PCR a été déterminée par la méthode  $\Delta\Delta CT$ . Cette méthode calcule l'expression relative à l'aide de l'équation: nombre de fois où le gène est induit =  $2^{-[\Delta\Delta CT]}$  où  $CT$  = le cycle seuil, c'est à dire le nombre de cycles au cours duquel le niveau de fluorescence relatif de chaque échantillon s'élève au-dessus de celui du niveau de fluorescence de fond;  $\Delta\Delta CT = \Delta CT$  de l'échantillon d'essai –  $\Delta CT$  de l'échantillon de calibration; et  $\Delta CT = CT$  de la cible –  $CT$  de la référence. Un des échantillons de contrôle a été choisi comme échantillon d'étalonnage et testé dans chaque PCR. Chaque échantillon a été amplifié en double, et la moyenne  $CT$  a été prise dans l'équation  $\Delta\Delta CT$ . GAPDH a été choisi pour la normalisation, car ce gène a montré une expression cohérente par rapport à d'autres gènes constitutifs dans nos expériences.

### **II.5 MÉTHODE D'IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN :**

#### **II.5.1 PRÉPARATION DU TAMPON DE LYSE CELLULAIRE**

**RADIOIMMUNOPRECIPITATION ASSAY (RIPA) :** La solution RIPA a été préparée comme suit : solution de chlorure de sodium 150 mM, solution de Triton X-100 1%, solution de sodium déoxycholate 0.5%, solution de SDS (sodium dodécyl sulfate) 0.1%, solution de trishydroxyméthylaminométhane (Tris) 50 mM et assez d'eau distillée pour atteindre un volume total de 100 ml, ont été ajoutés. Puis le pH a été ajusté à pH 8,0.

#### **II.5.2 EXTRACTION DES PROTÉINES:**

Les cellules ont été mises sur la glace et elles ont été lavées avec du PBS 1X froid 2 fois. Puis le PBS 1X a été aspiré avec une pompe afin de pouvoir ajouter le tampon RIPA contenant les inhibiteurs de protéases et de phosphatases (les quatre inhibiteurs: sodium fluoride (NaF), fluorure de phenylméthanesulfonyle (PMSF), acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), et pepstatine A à la solution RIPA dans un rapport de 10 $\mu$ L d'inhibiteur / 1 ml RIPA). Après avoir ajouté le tampon RIPA, les cellules ont été grattées avec un racloir cellulaire, puis transférées dans différents ependorfs

étiquetés pré-refroidis. Les échantillons ont ensuite été vortexés chaque 5 min pendant 30 min sur la glace. Puis les échantillons ont subi une sonication de 10 sec 2 fois. Puis, une fois les échantillons homogénéisés, ils ont ensuite été centrifugés pour une période de 20 min à une vitesse de 12.000 xg à 4 °C, et le surnageant a été transféré dans de nouveaux tubes pré-refroidis.

**II.5.3 MESURE DE LA CONCENTRATION EN PROTÉINES:** Les dilutions des échantillons ont été préparées par addition d'eau distillée à chaque échantillon, puis les échantillons ont été vortexés, puis 100 µl de chaque échantillon ont été déplacés dans de nouveaux tubes de sorte que chaque tube ait maintenant 100 µl de la solution. Les dilutions de la courbe standard ont été préparées en prenant 12 tubes, l'ajout de 100 µl d'eau distillée et 0 µl de BSA (0,2 mg / ml) dans les deux premiers tubes, 80 µl d'eau distillée et 20 µl de BSA dans les deux prochains, 60 µl d'eau distillée et 40 µl de BSA dans le deux suivants, 40 µl d'eau distillée et 60 µl de BSA dans deux tubes d'après, 20 µl d'eau distillée et 80 µl de BSA dans les tubes suivants, et enfin, 0 µl d'eau distillée et 100 µl de BSA dans les deux derniers tubes. La solution de Bradford a été préparée en combinant la solution de Bradford à de l'eau distillée (proportion de 1 : 4 respectivement), et enfin 2 ml de cette préparation de solution de Bradford a été ajouté à chaque tube préparé. L'absorbance a été mesurée à 595 nm en utilisant le spectrophotomètre Ultrospec 3100 Pro UV / visible.

**II.5.4 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS:** A partir des mesures de concentration en protéine données par le Spectrophotomètre, la quantité d'échantillon nécessaire pour atteindre une concentration finale en protéines d'au moins 3 µg / µl a été calculée, et la dilution ultérieure nécessaire effectuée en ajoutant de l'eau distillée selon les besoins. Pour ce mélange, une solution de tampon de chargement 5X a été ajoutée afin d'obtenir un tampon de chargement 1X, et les échantillons ont été chauffés dans l'eau bouillante pendant une période de cinq minutes. Ils ont ensuite été remis sur la glace, bien vortexés et enfin placés à l'intérieur de la machine spin-down pendant 10 secondes. Le tampon de chargement 5X a été initialement préparé comme suit: 2,5 ml d'une solution de Tris 1,25 M à un pH de 6,8, 5 ml de glycérol, 1 g de SDS, et 2,5 ml bêta-mercaptoéthanol. La solution complète a été chauffée

doucement dans un bain-marie pendant une période de dix minutes pour que le SDS puisse se dissoudre complètement dans la solution, et quelques gouttes de bleu de bromophénol ont finalement été ajoutées.

**II.5.5 PRÉPARATION DES GELS:** afin de migrer les échantillons, deux gels ont été préparés, un gel de séparation et un gel d'entassement. Le gel de séparation (gel inférieur) a été préparé en combinant les matériaux suivants : 8,33 ml d'acrylamide, 10,04 ml d'eau distillée, 6,25 ml de Tris pH 8,8, 250 µl de SDS 10%, 12,5 µl de NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED), et enfin 125 µl de persulfate d'ammonium (APS) préparé frais en plaçant d'abord 0,1 g d'APS dans 1 ml d'eau distillée. Le gel d'entassement (gel supérieur) a été préparé en combinant les matériaux suivants : 1,3 ml d'acrylamide, 6,1 ml d'eau distillée, 2,5 ml de Tris pH 6,8, 100 µl de SDS 10%, 10 µl de TEMED et 50 µl d'APS fraîchement préparés comme décrit précédemment.

**II.5.6 PROCÉDURE D'ÉLECTROPHORÈSE:** Le tampon d'électrophorèse 1X a été préparé en combinant 100 ml de tampon d'électrophorèse 10X avec 900 ml d'eau distillée. Le tampon d'électrophorèse 10X a été préparé en combinant 144,2 g de glycine, 24,2 g de Tris UltraPure, 10 g de SDS 1%, et suffisamment d'eau distillée pour remplir un récipient à 1 L, puis le pH de la solution finale a été ajusté à une valeur finale de 8,3. En ce qui concerne la procédure d'électrophorèse elle-même, un peigne de 10 puits a été utilisé et 10 µg de protéines provenant de chaque échantillon a été ajouté à côté du premier puit chargé avec 15 µl de solution de standard de poids moléculaires (Precision Plus Protein). Quatre gels ont été placés dans l'appareil à électrophorèse (Bio-Rad Mini PROTEAN Tetra Cell) avant le début de la procédure d'électrophorèse. En ce qui concerne le lancement de l'électrophorèse, la migration des échantillons dans les gels a été exécutée pour une période de 20 min à 100V, puis à 140V jusqu'à ce que la protéine d'intérêt ait migrée vers deux tiers de la descente de la longueur du gel.

**II.5.7 PROCÉDURE DE TRANSFERT DE TYPE «SEMI-DRY»:** Le tampon de transfert 1X a été préparé en combinant 100 ml du tampon de transfert 10X avec 200 ml de méthanol et 700 ml d'eau distillée. Le tampon de transfert 10X a été préparé en combinant 38.2 g de Tris UltraPure, 29.3 g de glycine, 3.75 g de SDS 1%, et suffisamment d'eau distillée pour remplir un récipient de 1 L. Le pH n'a pas été ajusté. En ce qui concerne la procédure de transfert semi-dry, tous les gels et les membranes ont d'abord été placés dans la solution tampon de transfert 1X pour une période d'au moins 15 minutes avant le début de la procédure elle-même. Par la suite, trois morceaux de papier buvard, les membranes, les gels, et trois autres morceaux de papier buvard ont été superposés à l'intérieur de l'appareil de transfert (Bio-Rad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell), tout en s'assurant qu'aucune bulle d'air ne se forme entre les deux couches. L'appareil a ensuite été fermé et exécuté pour une période de 1 heure et 15 min à 20V.

**II.5.8 POINT DE CONTRÔLE AVEC LE PONCEAUX ROUGE, LAVAGE, ET BLOCAGE:** Après que le transfert a été achevé, les membranes ont été retirées et trempées dans une solution de Ponceaux rouge pour une période d'environ 3 min. La solution Ponceaux rouge a été préparée en combinant 1g de Ponceaux et 15g d'acide trichloro-acétique (TCA) avec de l'eau distillée assez pour remplir un conteneur de 500 ml. Les membranes ont ensuite été lavées en douceur avec de l'eau distillée jusqu'à ce que l'excès de rouge ne soit plus visible sur les membranes. Le point de contrôle à cette étape fait en sorte qu'on puisse supposer que le transfert a été exécuté avec succès. Après ce point de contrôle, et en supposant un transfert réussi, les membranes ont été lavées trois fois avec du tris-buffered saline-tween20 (TBST) 1X. Le TBST 1X a été préparé en combinant 1 ml de Tween 20 avec 1L de tris-buffered saline (TBS) 1X. Le TBS 1X a été préparé en combinant 100 ml de TBS 10X avec 900 ml d'eau distillée. Le TBS 10X a été préparé en combinant 87,7 g de chlorure de sodium (NaCl) et 24,2 g de Tris à de l'eau distillée, assez pour remplir un conteneur à 1 L, puis ajuster le pH de la solution complète à une valeur finale de 7-7,5. Les membranes ont ensuite été lavées pendant une période de cinq minutes la première fois, dix minutes pour la deuxième fois, et 15 min pour la troisième fois, et ont été ensuite bloquées en étant incubées dans une solution de 5 g de poudre de lait écrémé dilué dans 100 ml TBST 1X. Le blocage a

été fait durant la nuit à 4 °C.

**II.5.9 QUANTIFICATION DES BANDES:** Les films autoradiographiques ont été numérisés et sauvegardés dans des fichiers portant l'extension ".tif" sans aucune compression. En utilisant le programme Image J 1.45s, ces images ont ensuite été ouvertes, automatiquement contrastées, et transformées en négatifs. L'étape suivante, faite manuellement, impliquait d'entourer chaque bande attendue de la protéine d'intérêt, à l'aide de l'outil de sélection rectangulaire. La protéine d'intérêt a toujours été identifiée en comparant la position de la bande obtenue avec l'échelle de notre standard de poids moléculaire. Afin de pouvoir quantifier nos bandes d'intérêt avec précision, on a utilisé l'outil d'analyse d'image J appelé "Gels" comme suit : en premier cliquer sur "select first lane", puis faire glisser la flèche du curseur autour de chaque bande à l'aide de la sélection rectangulaire, et enfin lorsque toutes les bandes sont sélectionnées, cliquer sur "plot lanes" pour obtenir l'intensité relative de chaque bande tel que donnée par l'ordinateur. La quantification fut d'abord faite pour la protéine constitutive GAPDH, et par la suite pour toutes les autres protéines d'intérêt. Une fois que toutes les valeurs ont été obtenues, les valeurs ont été normalisées en divisant la valeur de chaque échantillon de chaque protéine d'intérêt par leurs valeurs correspondantes en termes de protéine constitutive GAPDH. Les résultats ont été représentés graphiquement en utilisant le logiciel GraphPad Prism 3.

**II.6 PRODUCTION DE GMPc ET RADIOIMMUNOASSAY (RIA):** Les cellules P19 propagées dans des plaques de 12 puits (Costar Corp) ont été prétraitées avec de l'isobutylméthylxanthine (IBMX, 0,2 mM) pendant 30 min avant l'addition de l'ANP ( $10^{-7}$  M), A71915 ( $10^{-6}$  M) ou ANP + A71915. Les cellules P19 stimulées avec l'A71915 et la combinaison A71915+ANP ont été prétraitées pendant 30min avec l'antagoniste A71915 avant de débiter l'incubation des cellules P19. Suite à cela, les cellules ont été stimulées et incubées à 37 °C pendant 15, 30 et 60 min avant d'en extraire les cellules et le milieu de culture. Afin de doser la production de GMPc dans le milieu extracellulaire et intracellulaire, le milieu de culture a été prélevé après 15, 30 et 60 min de stimulation avec les peptides afin

d'obtenir la fraction extracellulaire et la fraction intracellulaire a été obtenue lorsque la réaction a été stoppée par l'élimination du milieu contenant l'IBMX et les peptides suivi de deux lavages avec du PBS 1X froid. Après cette étape, les cellules ont été lysées avec un tampon de lyse appelé «cold lysis buffer» contenant des inhibiteurs de phosphatases et de protéases. Puis, les plaques ont été placées sur la glace pendant 30 min, et le tampon de lyse contenant les cellules a été recueilli pour des mesures ultérieures. Les niveaux de GMPc ont été mesurés avec un kit de RIA standard. Pour les traitements avec l'antagoniste A71915, l'antagoniste a été ajouté 30 min avant le début de la stimulation du GMPc.

Les sphéroïdes induits par la stimulation de l'ANP ( $10^{-7}$ M), OT ( $10^{-7}$ M) et de l'ANP + OT, pendant 5 jours ont été cultivés 2 jours de plus dans des pétri de culture pour les laisser attacher. Ensuite les cellules ont été prétraitées avec de l'isobutylméthylxanthine (IBMX, 0,2 mM) pendant 30 min, puis elles ont été lavées brièvement pour éliminer la présence des peptides, avant d'ajouter le tampon de lyse contenant des inhibiteurs de phosphatases et de protéases. Une fois le tampon de lyse ajouté, les plaques ont été placées sur la glace pendant 30 min, et le tampon de lyse contenant les cellules ont été recueillies pour des mesures ultérieures. Les niveaux de GMPc ont été mesurés avec un kit de RIA standard.

Les dilutions de la courbe standard ont été préparées en prenant 24 tubes (12 tubes en double exemplaire). La courbe standard inclus également le totale (la radioactivité seule), le background (l'eau acétylée + la radioactivité) et l'anticorps (anticorps + eau acétylée + la radioactivité).

**II.7 VIABILITÉ CELLULAIRE :** Pour évaluer la viabilité des cellules, nous avons utilisé le Cell Titer 96 AQueous One Solution Cell Prolifération Assay. L'effet des différents traitements sur la viabilité des cellules a été mesuré en utilisant un kit MTT, qui est basé sur la transformation du 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide (MTT) en cristaux de formazan par l'enzyme succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes ayant une activité métabolique. Les cellules ont été propagées dans des pétris de culture de 96 puits avec une densité de 1000 cellules / puits dans du milieu de culture alpha-

MEM supplémenté avec 10% de FBS et 1% Pen / Strep. Après 24h d'incubation à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub>, les peptides à tester ont été ajoutés dans chaque puits pendant 2h. Le milieu de culture contenant les peptides a ensuite été aspiré et 100 µL de la solution de MTT a été ajouté pour une incubation de 2h. Puis la solution de MTT a été retirée et remplacée par 100 µl de DMSO pour dissoudre les cristaux de formazan produits et finalement, l'absorbance a été lue à 490 nm en utilisant un spectrophotomètre pour microplaques. Pour les traitements avec l'antagoniste de la guanylate cyclase particulée A71915, l'antagoniste a été ajouté 30 min avant de débiter le traitement cytotoxique.

**II.8 ANALYSES STATISTIQUES :** Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SE. Les comparaisons statistiques ont été faites en utilisant GraphPad Prism 3 (GraphPad Software, San Diego, CA). La signification statistique a été évaluée avec un t-test non apparié de comparaison entre les 2 groupes ou avec ANOVA pour la comparaison et le contraste entre plusieurs groupes. Le niveau de signification a été fixé à une valeur  $P \leq 0,05$ .

**Tableau 1 - Réactifs employés dans la culture cellulaire.**

Réactifs	Compagnie	No. Cat
MEM-Alpha medium 1X	GIBCO	12571
Qualified FBS	GIBCO	12483
Antibiotic 1X (Penicillin/Streptomycin)	GIBCO	15140
Trypsin 0.25%/EDTA 0.1%	MULTICELL	325-043-EL
Acutase	Innovative Cell Technology	AT104



**Tableau 2 - Séquences des amorces pour le PCR en temps réel.**

Gènes	Amorces sens (5'-3')	Amorces anti-sens (5'-3')
ANP	CAGCATGGGCTCCTTCTCCA	GTCAATCCTACCCCCGAAGCAGCT
OTR	AAGATGACCTTCATCATTGTTC	CGACTCAGGACGAAGGTGGAGGA
GATA4	CACTATGGGCACAGCAGCTCC	TTGGAGCTGGCCTGCGATGTC
GAPDH	TTCAATGGCACAGTCAAGGC	TCACCCCATTTTCATGTTAGCC
NPR-A	AGTACGCCAACAACCTGGAG	AAGAGCTGTAAAGCCACGA
NPR-B	TCATGACAGCCCATGGTAAA	GGTGACAATGCAGATGTTGG

OTR, récepteur de l'ocytocine; ANP, peptide natriurétique auriculaire; le facteur de transcription GATA-4 ; GAPDH, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ; NPR-A, récepteur peptidique natriurétique de type A ; NPR-B, récepteur peptidique natriurétique de type B.

**Tableau 3 - Réactifs employés dans la réaction de PCR en temps réel.**

Réactifs	Compagnie	No. Cat
RNase AWAY	Molecular BioProducts	7003
Trizol	Invitrogen	15596-018
Chloroform	Fisher Scientific	C-574
Isopropanol	Laboratoire MAT	IH-0101
Ethanol	ACP	E-2205
RNase-free Water	GIBCO	10977-015
UltraPure Tris	Invitrogen	15504-020
10X PCR Rxn Buffer - MgCl <sub>2</sub>	Invitrogen	Y02028
DNase 1 (242U/ul)	Invitrogen	18047-019

<b>RNaseOUT (40 U/ul)</b>	<b>Invitrogen</b>	<b>100000840</b>
<b>Random Primer</b>	<b>Invitrogen</b>	<b>48190-011</b>
<b>5X First Strand Buffer</b>	<b>Invitrogen</b>	<b>Y02321</b>
<b>dNTP set (100mM each A,C,G,T)</b>	<b>Invitrogen</b>	<b>55082, 55083, 55084, 55085</b>
<b>0.1 M DTT</b>	<b>Invitrogen</b>	<b>Y00147</b>
<b>M-MLV reverse transcriptase</b>	<b>Invitrogen</b>	<b>28025-013</b>
<b>iQ<sup>TM</sup> SYBR Green Supermix</b>	<b>BIO-RAD</b>	<b>20289</b>
<b>iCycler iQ PCR Plates, 96 well</b>	<b>BIO-RAD</b>	<b>2239441</b>

**Tableau 4 - Réactifs employés dans l'immunofluorescence.**

<b>Réactifs</b>	<b>Compagnie</b>	<b>No. Cat</b>
<b>Tissue Fix</b>	<b>Chapteck Inc.</b>	<b>N/A</b>
<b>Polysine Microscopy Slides</b>	<b>Thermo Scientific</b>	<b>P-4981</b>
<b>D-PBS 1X</b>	<b>GIBCO</b>	<b>14190</b>
<b>Mayer's Hematoxylin Solution</b>	<b>Sigma</b>	<b>MHS1</b>
<b>VWR micro cover glass</b>	<b>VWR International</b>	<b>49393 106</b>
<b>ProLong Gold with DAPI</b>	<b>Invitrogen</b>	<b>P36931</b>
<b>Poly-L-Lysine 0.01%</b>	<b>Sigma</b>	<b>P4832</b>
<b>Acridine Orange</b>	<b>Becton Dickinson (BD)</b>	<b>212536</b>

Tableau 5 - Réactifs employés dans l'immunobuvardage de type Western.

Réactifs	Compagnie	No. Cat
UltraPure Tris	Invitrogen	15504-020
NaCl	ACP	S2838
NP-40	Sigma	I3021
Sodium deoxycholate	Sigma	D6750
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Invitrogen	15525-017
PMSF	Sigma	P7626
EDTA	Sigma	E6758
Pepstatin A	Sigma	P5318
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma	A7888
Protein Assay (Bradford)	Bio-Rad	500-0006
Glycerol	Sigma	G6279
Beta-mercaptoethanol	Gibco	21985-023
Bromophenol blue	Sigma	B-5525
Acrylamide	Invitrogen	15512-023
TEMED	Sigma	T-8133
Ammonium persulfate (APS)	Sigma	A3678
Glycine	Invitrogen	15527-013
Precision Plus Protein Standards	Bio-Rad	161-0375
Methanol	ACP	M-3660
Hybond-C Extra Nitrocellulose Membrane (0.45 microns)	Amersham	RPN303E
Ponceaux	MP Biomedicals	190644
Trichloroacetic acid (TCA)	Sigma	T9159
TWEEN 20	Sigma	P1379
Dry non-fat milk	Carnation	500g

anticorps Anti-GAPDH	Santa Cruz	sc-25778
Donkey anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz	sc-2020
anticorps Anti-rabbit IgG-HRP	GE Healthcare	NA934V
Système de détection ECL+	GE Healthcare	RPN2132
Cassette d'autoradiographie	Fisher Scientific	FBCA 810
Scientific Autoradiography Film	Progène	39-20810

**Tableau 6 - Conditions dans lesquelles les anticorps primaires ont été utilisés (Immunobuvardage).**

Protéines d'intérêt	Anticorps primaire	Concentration	Temps d'incubation	Temp.
GATA-4	Anti-GATA-4	1:4000	3 jours	4°C
Nkx2.5	Anti-Nkx2.5	1:4000	Toute la nuit	4°C
GAPDH	Anti-GAPDH	1:20000	35 min	TP

**Tableau 7 - Conditions dans lesquelles les anticorps secondaires ont été utilisés (Immunobuvardage).**

Protéines d'intérêt	Anticorps secondaire	Concentration	Temps d'incubation	Temp.
GATA-4	Anti-souris IgG-HRP anticorps	1:10000	1 heure 30 min	TP
Nkx2.5	Donkey anti-chèvre IgG-HRP	1:50000	1 heure 30 min	TP
GAPDH	Anti-lapin IgG-HRP anticorps	1:20000	35 min	TP

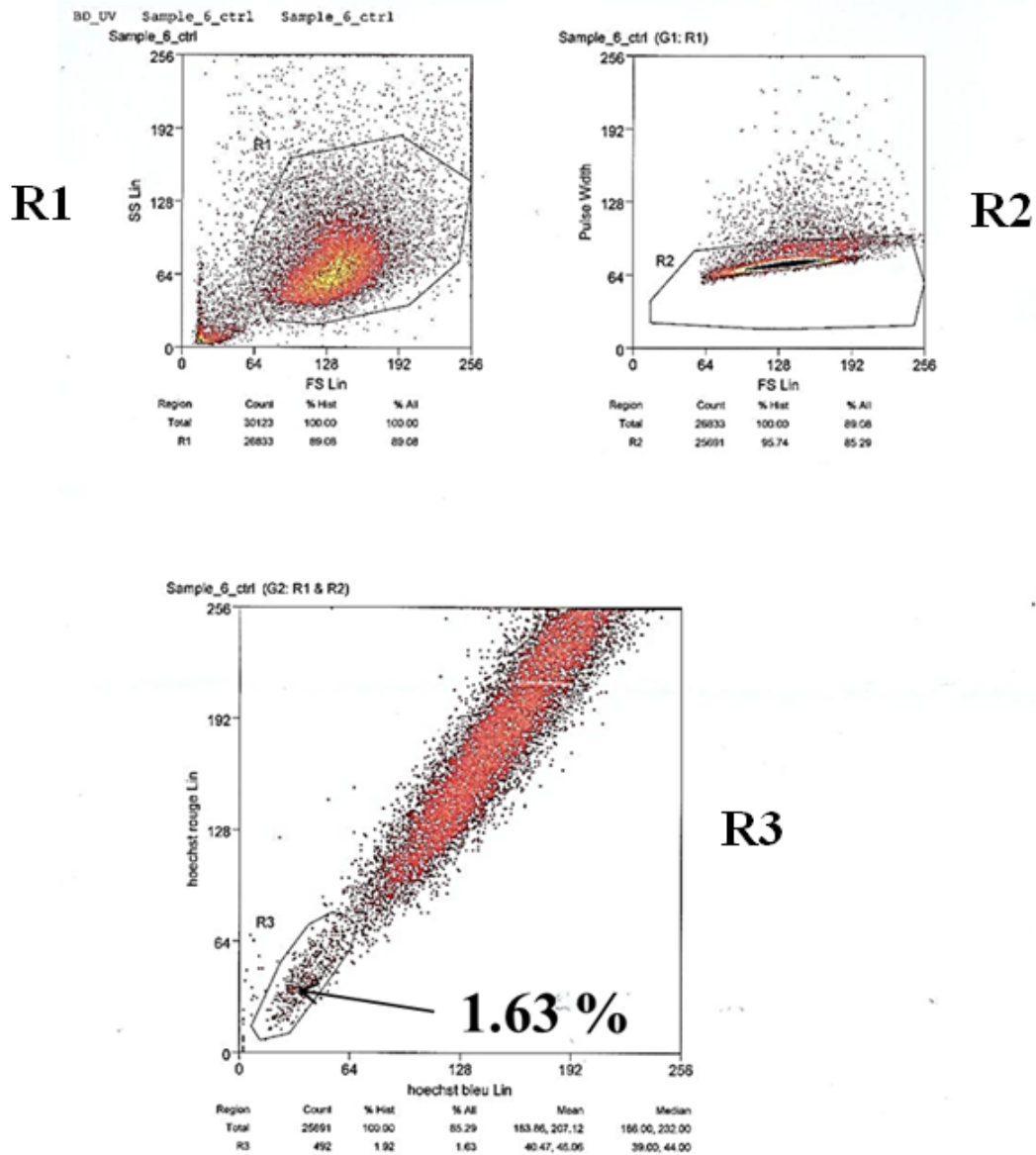
**Tableau 8 - Temps d'exposition et poids moléculaire des protéines d'intérêts (Immunobuvardage).**

<b>Protéines d'intérêts</b>	<b>Temps d'exposition</b>	<b>Poids moléculaire</b>
<b>GATA-4</b>	<b>1 min (ECL Advance)</b>	<b>50 kDa</b>
<b>Nkx2.5</b>	<b>15 min (ECL Advance)</b>	<b>40 kDa</b>
<b>GAPDH</b>	<b>3 min (ECL Plus)</b>	<b>37 kDa</b>

## **CHAPITRE III : RÉSULTATS**

### **III.1 SÉLECTION PAR FACS DES « SIDE POPULATION » (SP) DE CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES CARCINOMATEUSES DE SOURIS P19**

Nous avons isolé par tri cellulaire activé par fluorescence (FACS), la population de cellules exprimant le transporteur ABCG2, ayant la caractéristique de fortement promouvoir l'efflux du colorant fluorescent Hoechst 33342. Les cellules mortes et les cellules vivantes ont été séparées en utilisant le colorant fluorescent iodure de propidium. Dans l'expérience contrôle, le bloqueur des transporteurs ABC, vérapamil, a été utilisé afin d'empêcher l'efflux du colorant Hoechst 33342 à partir des cellules et, par conséquent, les cellules SP n'ont pas été détectées. Dans le cadre de notre expérience, nous avons mis en évidence l'existence de cellules SP au sein de l'ensemble des cellules P19. Nous avons aussi remarqué que la proportion des cellules SP ne représente que 1.63% de la population principale de cellules P19 (Figure 1).



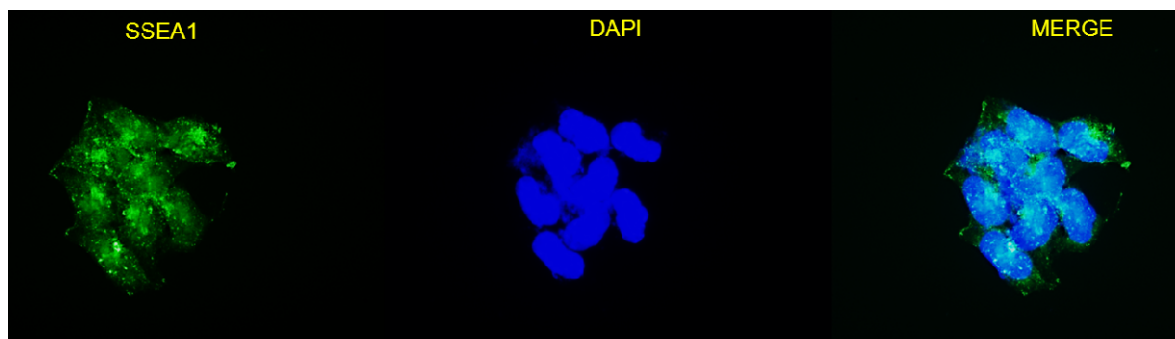
**Figure 1 - Isolation des SP à partir des cellules P19.**

Représentation du profil des cellules souches embryonnaires carcinomateuses de souris P19 marquées avec le colorant fluorescent Hoechst 33342 par FACS. Le graphique R1 représente les débris cellulaires et les cellules viables, le graphique R2 représente les cellules mortes et enfin le graphique R3 représente les cellules triées par FACS. Le pourcentage de cellules SP est indiqué dans

la section R3, soit 1,63% de l'ensemble de la population de cellules P19 triées. Ainsi, on peut observer qu'une très faible proportion des cellules P19 ont les caractéristiques des cellules SP.

### III.2 CARACTÉRISTIQUES PHÉNOTYPIQUES DES SP DE CELLULES P19

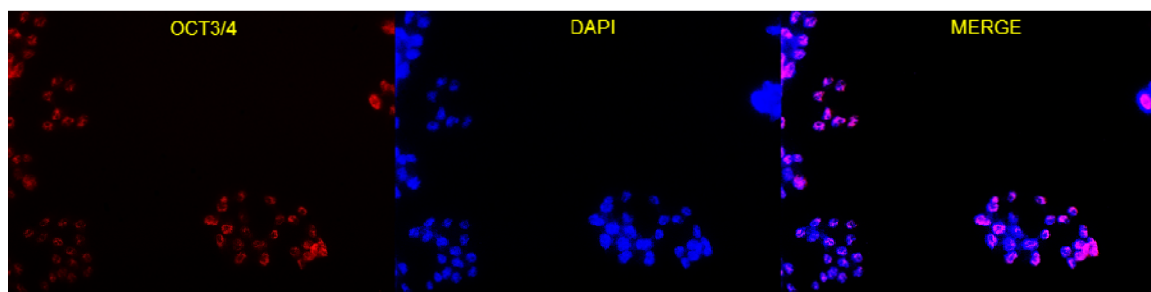
Nous avons vérifié que nos cellules isolées par FACS pour les SP n'avaient pas perdu leurs propriétés de cellules souches avant l'induction de la différenciation. À cet effet, nous avons utilisé OCT3/4 et SSEA1, deux marqueurs de l'état indifférencié et de l'état pluripotent. Nous avons détecté la présence de ces deux marqueurs dans nos cellules sélectionnées confirmant ainsi que nos cellules SP ont bien des caractéristiques de cellules souches pluripotentes (Figure 2A et Figure 2B)



**Figure 2A - Les SP de cellules P19 expriment le marqueur phénotypique de l'état indifférencié SSEA1.**

Les cellules SP sélectionnées à partir des cellules P19 ont été fixées, perméabilisées puis immunocolorées pour la détection du marqueur de l'état indifférencié SSEA1. Le fluorophore DAPI (en bleu) a été utilisé en tant que marqueur nucléaire. La localisation spécifique de SSEA1 (en vert) se localise autour du noyau (en bleu). La fusion des signaux fluorescents (MERGE) indique une coloration membranaire, SSEA1 et DAPI. Les images ont été prises avec un grossissement de 20X. Nous avons utilisé comme contrôle négatif des cellules mises en présence de l'immunoglobuline G de l'animal avec lequel l'anticorps primaire a été produit pour vérifier la spécificité de la réaction.





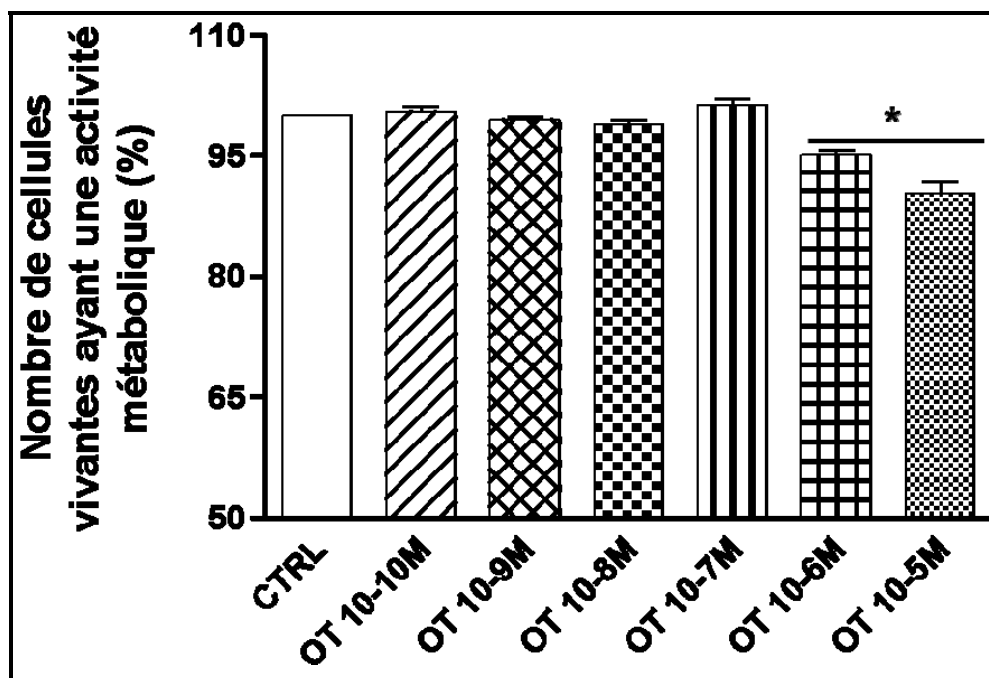
**Figure 3 (2B) - Les SP de cellules P19 expriment le marqueur phénotypique de l'état indifférencié et d'auto-renouvellement OCT3/4.**

Les cellules SP sélectionnées à partir des cellules P19 ont été fixées, perméabilisées puis immunocolorées pour la détection du marqueur de l'état indifférencié et d'auto-renouvellement Oct3/4. Le fluorophore DAPI (en bleu) a été utilisé en tant que marqueur nucléaire. La localisation spécifique d'Oct3/4 (en rouge) se colocalise avec le noyau (en bleu). La fusion des signaux fluorescents (MERGE) indique une coloration nucléaire, Oct3/4 et DAPI. Les images ont été prises avec un grossissement de 10X. Nous avons utilisé comme contrôle négatif des cellules mises en présence de l'immunoglobuline G de l'animal avec lequel l'anticorps primaire a été produit pour vérifier la spécificité de la réaction.

### **III.3 DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION OPTIMALE DES INDUCTEURS**

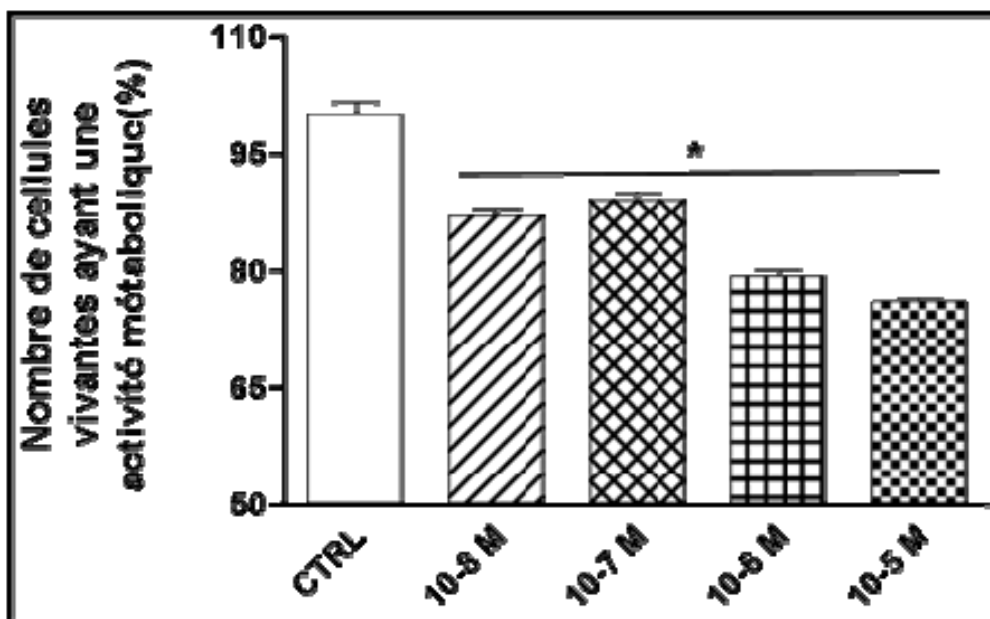
Nous avons essayé d'une part de déterminer quelle concentration d'ocytocine et d'ANP était la plus appropriée pour induire la différenciation. D'autre part, nous voulions vérifier si l'antagoniste du guanylate cyclase particulé, A71915, à sa concentration la plus optimale soit  $10^{-6}$ M n'était pas trop nocif pour les cellules lorsqu'ajouté aux cellules, seul ou en combinaison avec OT et ANP. Pour évaluer la meilleure concentration de ces substances, nous avons utilisé un test MTT pour l'évaluation de la viabilité cellulaire. En effet, pour favoriser la différenciation des SP de cellules souches embryonnaires P19 en cardiomyocytes, nous avons besoin des cellules présentant une activité métabolique suffisante en vertu de la stimulation des composés. La production de formazan résultant semble être proportionnelle au niveau du métabolisme énergétique des cellules. Ainsi, nous avons observé qu'à des concentrations élevées l'OT (Figure 3A) et l'ANP (Figure 3B) diminuent la viabilité des cellules, or à des concentrations allant de  $10^{-10}$  à  $10^{-7}$  M l'OT ne diminue pas la viabilité cellulaire (Figure 3A) tandis que l'ANP diminue toujours la viabilité cellulaire à des concentrations plus faibles telles que  $10^{-8}$  M. On peut observer, qu'à  $10^{-7}$  M, l'OT a une tendance à augmenter la

viabilité cellulaire. Bien que l'ANP diminue la viabilité cellulaire entre  $10^{-8}$  M et  $10^{-5}$  M, on peut observer qu'à  $10^{-7}$ M on obtient le moins de cytotoxicité pour les cellules SP P19. Nous avons donc décidé d'utiliser l'OT et l'ANP à la concentration de  $10^{-7}$ M afin d'éviter au maximum d'induire de la cytotoxicité dans nos cellules. D'autre part, nous avons observé que l'ajout de l'antagoniste A71915  $10^{-6}$ M diminuait la viabilité (Figure 3C) cellulaire mais que cette diminution était presque identique au niveau de viabilité cellulaire des cellules P19 exposée à l'ANP  $10^{-7}$ M. Nous avons donc décidé d'utiliser cet antagoniste à sa concentration la plus optimale, soit  $10^{-6}$ M, seul ou en combinaison avec OT et ANP



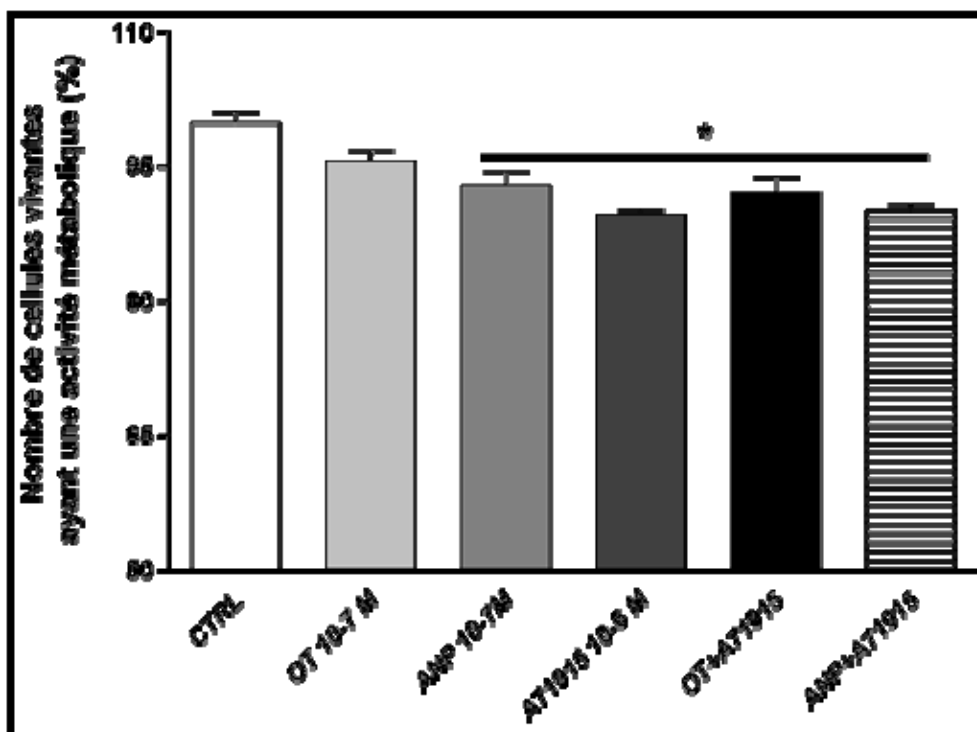
**Figure 4 (3A) - Effet de l'OT sur la viabilité des cellules SP P19 en monocouche.**

Les résultats proviennent d'au moins trois expériences indépendantes. Les différences statistiquement significatives ( $P < 0,05$ ) sont désignées comme '\*' en comparaison au groupe contrôle (CTRL). Les valeurs représentées constituent les moyennes de chaque groupe  $\pm$  SEM ( $n=12$ ). L'OT diminue significativement la viabilité cellulaire à partir de  $10^{-6}$ M. Il n'y a pas de différences significatives à partir de  $10^{-7}$ M.



**Figure 5 (3B) - Effet de l'ANP sur la viabilité des cellules SP P19 en monocouche.**

Les résultats proviennent d'au moins trois expériences indépendantes. Les différences statistiquement significatives ( $P < 0,05$ ) sont désignées comme "\*" en comparaison au groupe contrôle (CTRL). Les valeurs représentées constituent les moyennes de chaque groupe  $\pm$  SEM ( $n=9$ ). L'ANP diminue significativement la viabilité cellulaire à partir de  $10^{-8}$ M.

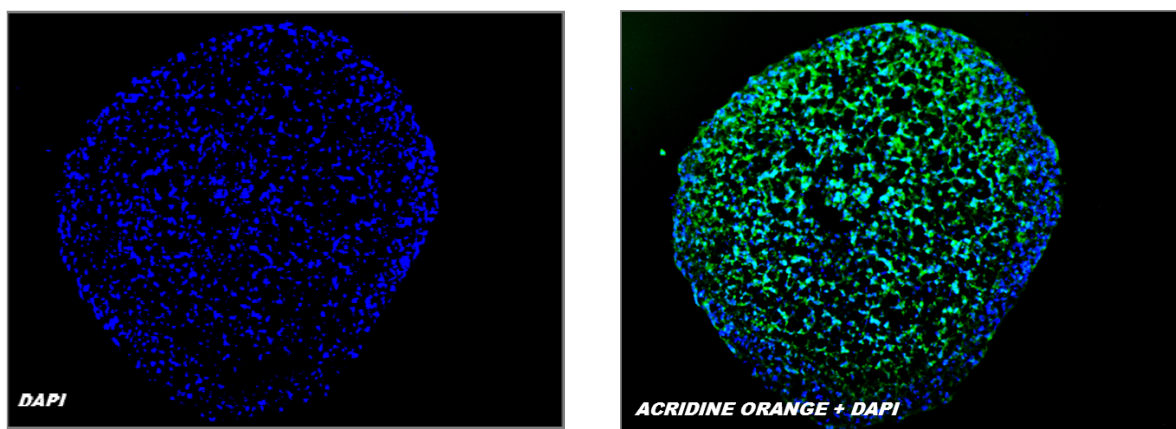


**Figure 6 (3C) - Effet de l'antagoniste A71915 sur la viabilité des cellules SP P19 en monocouche.**

Les résultats proviennent d'au moins trois expériences indépendantes. Les différences statistiquement significatives ( $P < 0,05$ ) sont désignées comme "\*" en comparaison au groupe contrôle (CTRL). Les valeurs représentées constituent les moyennes de chaque groupe  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). L'ANP diminue significativement la viabilité cellulaire à  $10^{-7}$ M. A71915 diminue significativement la viabilité à  $10^{-6}$ M, de même que sa combinaison avec OT et ANP.

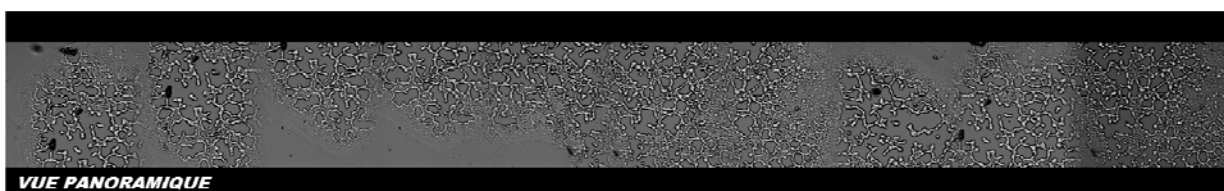
### **III.4 STRUCTURE DES CORPS EMBRYOÏDES OU SPHÉROÏDES :**

En utilisant la microscopie à fluorescence et la microscopie photonique, nous avons observé la structure interne des sphéroïdes. Par immunofluorescence, nous avons coloré le cytoplasme en vert (acridine orange) et les noyaux en bleu (DAPI), à l'aide de cryosection dans les sphéroïdes (Figure 4A). Ensuite, nous avons confirmé notre observation en utilisant la microscopie photonique (Figure 4B). Nous avons ainsi pu remarquer qu'il y avait une absence de structure interne dans les sphéroïdes puisque dans ces zones on ne retrouvait pas de noyaux.



**Figure 7 (4A) - Structure des corps embryoides observée par immunofluorescence.**

Le fluorophore DAPI (en bleu) a été utilisé en tant que marqueur nucléaire. La localisation spécifique de l'acridine orange (en vert) se localise autour du noyau (en bleu). La fusion des signaux fluorescents (acridine orange + DAPI) indique une coloration cytoplasmique. Les images ont été prises avec un grossissement de 10X.



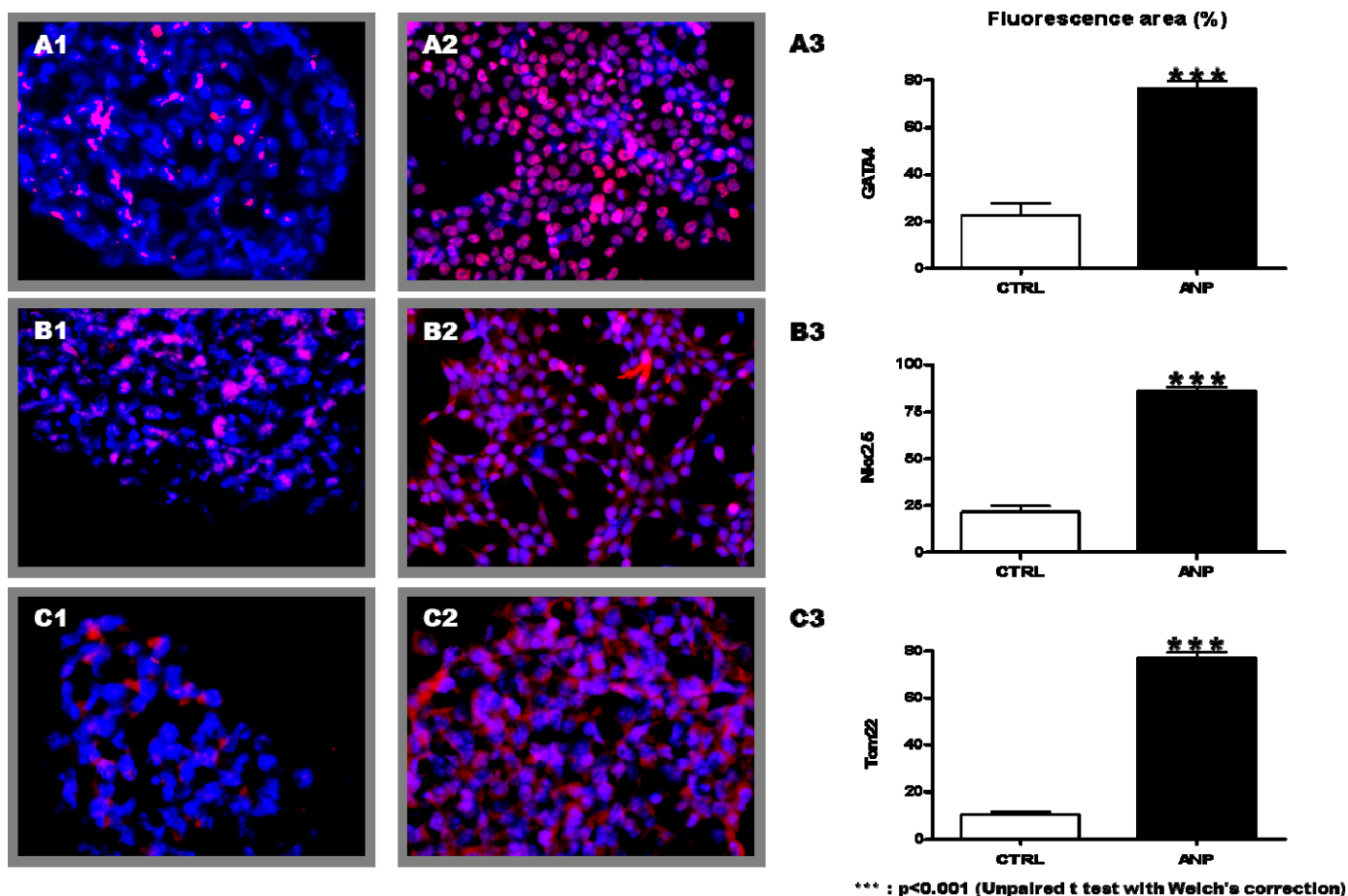
**Figure 8 (4B) - Structure des corps embryoides observée par microscopie photonique.**

Les images ont été prises avec un grossissement de 10X.

### III.5 EFFET CARDIOMYOGÉNIQUE DE L'ANP

Dans le but de déterminer si l'ANP possède une action cardiomyogénique sur les cellules SP P19, nous avons induits des cellules SP P19 et toujours sous l'effet de l'ANP, nous les avons laissé former des sphéroïdes. Au jour 5 d'agrégation, nous avons fait des coupes dans les sphéroïdes, en utilisant la méthode de cryosection, afin de tester différents marqueurs impliqués dans la cardiomyogenèse par immunofluorescence. Nous pouvons observer que sous la stimulation de l'ANP, les sphéroïdes obtenus expriment fortement les facteurs de transcription cardiaque GATA4 (Figure 5 section A) et Nkx2.5 (Figure 5 section B) ainsi que le marqueur spécifique mitochondrial Tom22 (Figure 5 section C) comparativement aux sphéroïdes non induits (Figure 5 sections A1-C1). Cette première

observation de l'effet cardiomyogénique de l'ANP nous permet de spéculer que l'ANP peut induire la différenciation cardiaque dans les cellules SP P19.

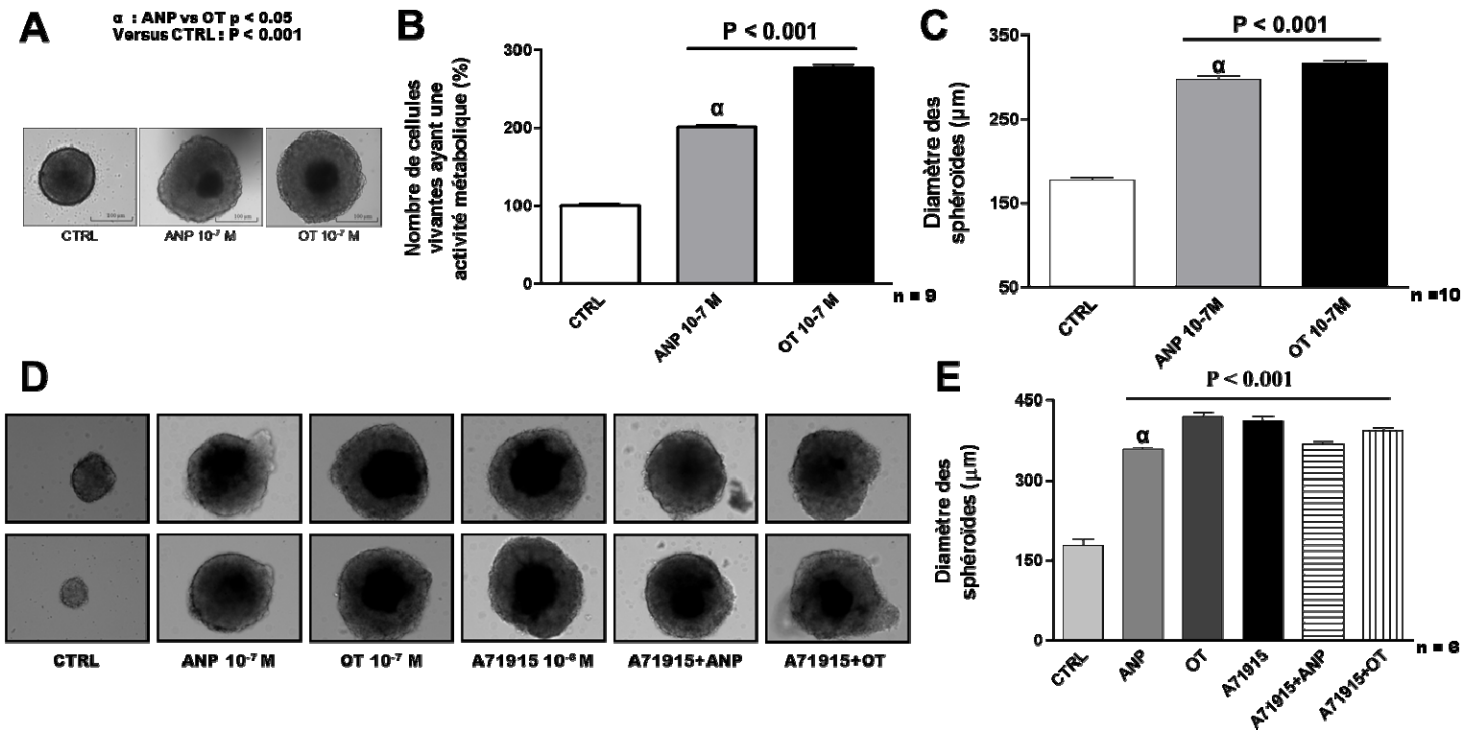


**Figure 9 (5) - Immunofluorescence de marqueurs de différenciation cellulaire dans les cellules SP P19 non-induites (A1-C1) et dans les cellules SP P19 stimulées pour se différencier avec l'ANP (A2-C2).**

(A3) Expression de GATA4, marqueur de différenciation et de développement cardiaque. (B3) Expression de Nkx2.5, facteur de transcription cardiaque. (C3) L'immunocytochimie montre la coloration de Tom22 une protéine présente dans la membrane mitochondriale externe de la mitochondrie. A3-C3 représentent l'analyse quantitative des marqueurs correspondants exprimés en zones fluorescentes. Fluoromicrographes, de cellules SP P19 différenciées au jour 5, présenté à un grossissement de 20X. Les résultats proviennent d'au moins trois expériences indépendantes. Les différences statistiquement significatives ( $P < 0,001$ ) sont désignées comme "\*\*\*\*" en comparaison au groupe contrôle (CTRL). Les valeurs représentées constituent les moyennes de chaque groupe  $\pm$  SEM (n=4). Nous avons utilisé comme contrôle négatif des cellules mises en présence de l'immunoglobuline G de l'animal avec lequel l'anticorps primaire a été produit pour vérifier la spécificité de la réaction.

### **III.6 EFFET DE L'ANP, DE L'OT ET DE L'ANTAGONISTE A71915 SUR LA TAILLE DES SPHÉROÏDES**

Au cours de nos premières expériences sur la différenciation des cellules SP P19 sous la stimulation de l'OT  $10^{-7}$ M et de l'ANP  $10^{-7}$ M, nous avons observé que la taille des sphéroïdes obtenus, au jour 5, était significativement plus grande que dans les sphéroïdes non induits (Figure 6A). Nous avons aussi remarqué que les sphéroïdes induits avec l'OT étaient plus grands que ceux induits par l'ANP (Figure 6C). Sachant que la différenciation cellulaire implique la mort de certains types cellulaires pour favoriser la survie des cellules provenant de la couche germinative désirée, nous avons voulu savoir si la taille des sphéroïdes obtenus avait influencé la viabilité des cellules. Pour cela, nous avons procédé au test de viabilité cellulaire en utilisant le Kit du MTT. À notre grande surprise, la viabilité cellulaire avait significativement augmenté dans les sphéroïdes induits avec l'ANP et l'OT comparativement aux sphéroïdes non induits (Figure 6B). De plus, la viabilité des sphéroïdes induits avec l'OT était significativement plus grande que ceux induits avec l'ANP (Figure 6B). Il est intéressant d'observer la corrélation entre la taille des sphéroïdes et leur niveau de viabilité cellulaire. Suite à cette expérience, nous avons répété cette expérience dans des sphéroïdes stimulés avec l'ANP  $10^{-7}$ M, l'OT  $10^{-7}$ M, l'antagoniste A71915  $10^{-6}$ M, la combinaison A71915 + ANP et la combinaison A71915 + OT (Figure 6D). Nous avons aussi observé ici que la taille de tous les sphéroïdes induits avait significativement augmenté par rapport aux sphéroïdes non induits (Figure 6E). De façon identique, nous avons observé que les sphéroïdes induits avec l'OT étaient plus grands que ceux induits par l'ANP, de même qu'avec la combinaison A71915+ANP (Figure 6E). Or, nous avons observé que les sphéroïdes induits avec l'OT, l'antagoniste A71915 et la combinaison A71915 + OT étaient plus ou moins de la même taille. Cependant, nous pouvons tout de même observer que l'ANP diminue significativement la taille des sphéroïdes lorsque combiné avec l'antagoniste A71915.



**Figure 10 (6) - Effet des inducteurs sur la taille des sphéroïdes.**

Les résultats proviennent d'au moins trois expériences indépendantes. Les différences statistiquement significatives ( $P < 0,001$ ) sont désignées comme "P" en comparaison au groupe contrôle (CTRL). Les différences statistiquement significatives ( $P < 0,05$ ) sont désignées comme "α" en comparaison à l'OT. Les valeurs représentées constituent les moyennes de chaque groupe  $\pm$  SEM (B :  $n=9$  ; C :  $n=10$  ; E :  $n=6$ ). Micrographes de cellules SP P19 différenciées au jour 5, présenté à un grossissement de 20X (A et D). L'ANP et l'OT augmentent significativement la taille des sphéroïdes à  $10^{-7}$ M en comparaison au groupe CTRL (C). L'ANP et l'OT augmentent significativement la viabilité cellulaire à  $10^{-7}$ M en comparaison au groupe CTRL (B). A71915 augmente significativement la taille des sphéroïdes à  $10^{-6}$ M en comparaison au groupe CTRL, de même que sa combinaison avec OT et ANP (E).

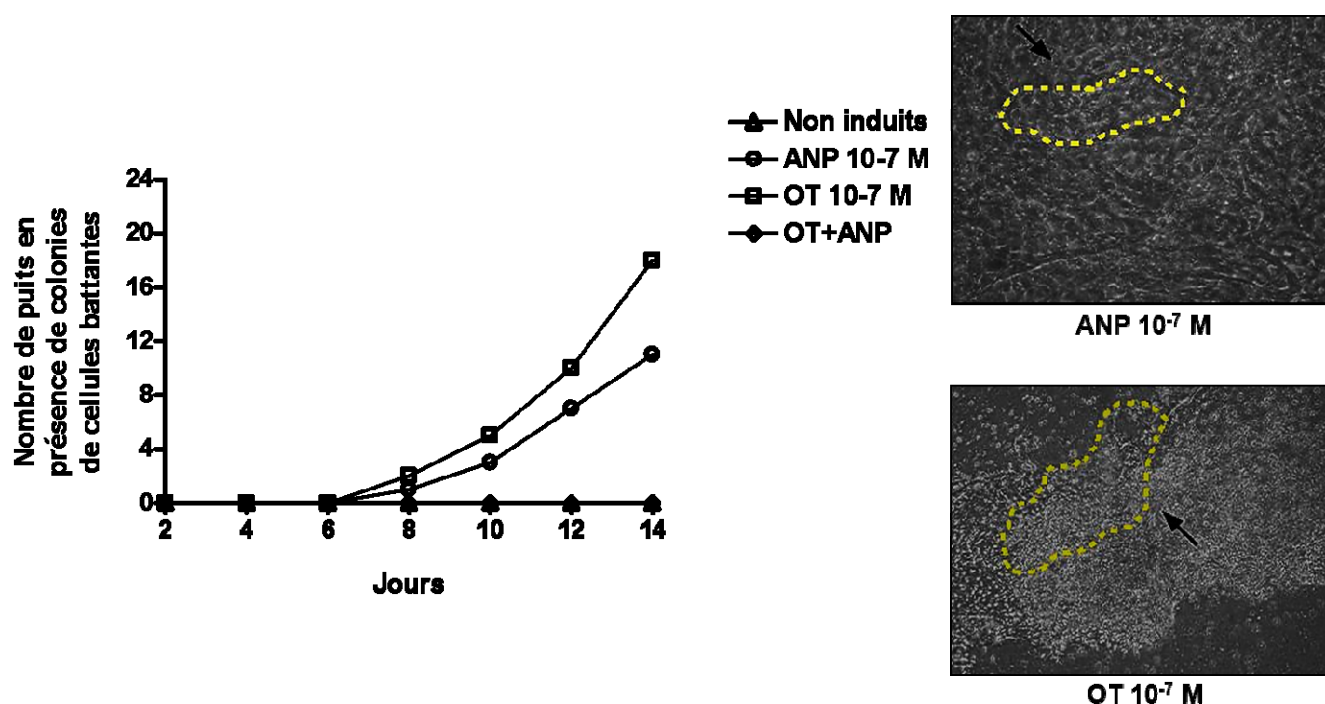
### III.7 L'ANP STIMULE L'APPARITION DE COLONIES DE CELLULES

#### BATTANTES

Dans cette expérience, nous avons utilisé l'OT comme contrôle positif afin d'induire la différenciation cardiaque. En effet, les expériences de Paquin et al [24] ont déjà prouvé le



potentiel cardiomyogénique de l'OT dans les cellules P19. Nous pouvons voir qu'OT est plus puissant que l'ANP puisqu'il présente plus de colonies de cellules battantes. Néanmoins, la taille des colonies de cellules battantes est presque la même (voir vidéos en annexe). Or, de façon surprenante la combinaison de l'OT et de l'ANP ne permet pas de promouvoir la contraction des cellules différenciées suggérant qu'il n'y a pas d'effets additifs de ces deux peptides.

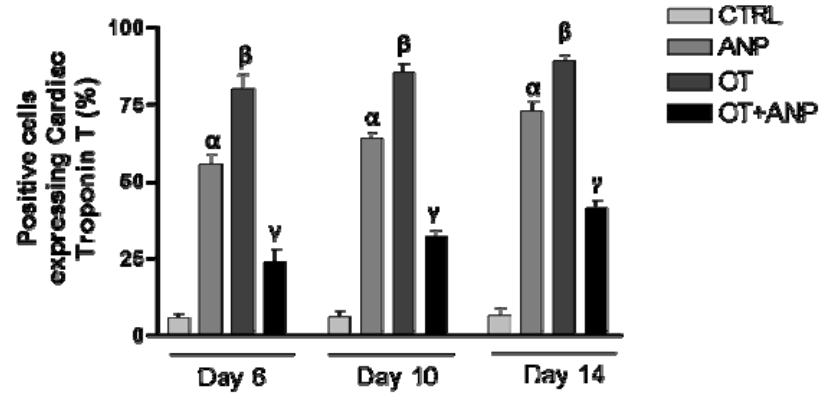
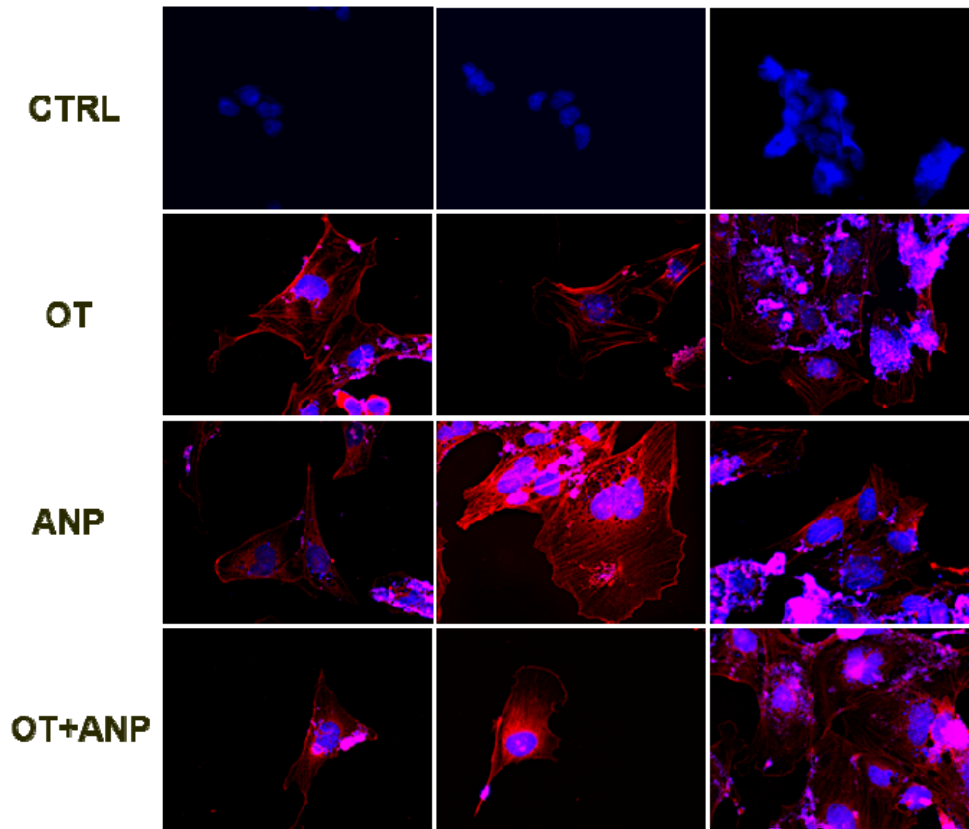


**Figure 11 (7) - Comparaison de l'effet cardiomyogénique de l'OT et de l'ANP.**

Ce graphique représente l'évolution dans le temps d'apparition des colonies de cellules battantes lors du traitement avec l'OT, l'ANP, et la combinaison ANP+OT. Les sphéroïdes, provenant d'une boîte de Pétri, traités pendant 5 jours avec l'agent indiqué ont été répartis dans les puits d'une plaque de 24 puits. Ensuite, chaque plaque a été examinée jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour de différenciation (le 14<sup>ème</sup> jour correspondant au jour de maturation des cardiomyocytes), à 2 jours d'intervalle, pour le nombre de puits contenant des colonies de cellules battantes. Micrographes de colonies de cellules battantes (délimitation des colonies de cellules battantes en jaune) provenant de cellules SP P19 différenciées au jour 8, présenté à un grossissement de 20X. L'ANP et l'OT à une concentration de 10<sup>-7</sup>M stimulent l'apparition de colonies de cellules battantes du jour 7 au jour 14 de différenciation cardiaque. Les sphéroïdes non induits n'ont pas stimulé l'apparition de colonies de cellules battantes. La combinaison de l'ANP et de l'OT n'a pas non plus stimulé l'apparition de colonies de cellules battantes.

### **III.8 DÉTERMINATION DU PHÉNOTYPE DES CELLULES DIFFÉRENCIÉES SOUS LA STIMULATION DE L'ANP, DE L'OT ET DE LEUR COMBINAISON DU JOUR 6 AU JOUR 14**

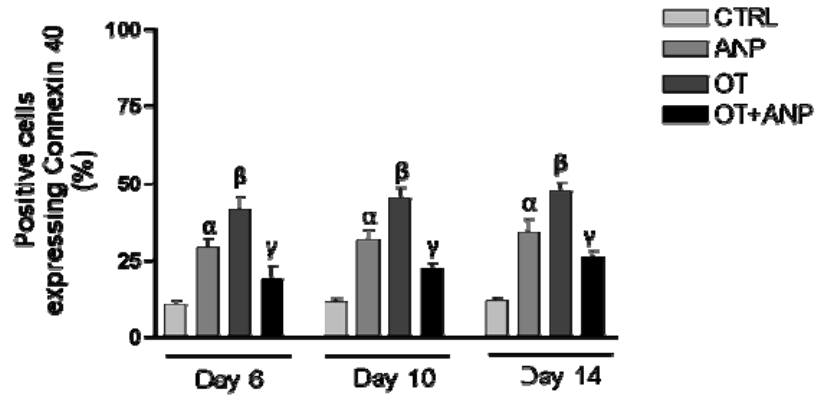
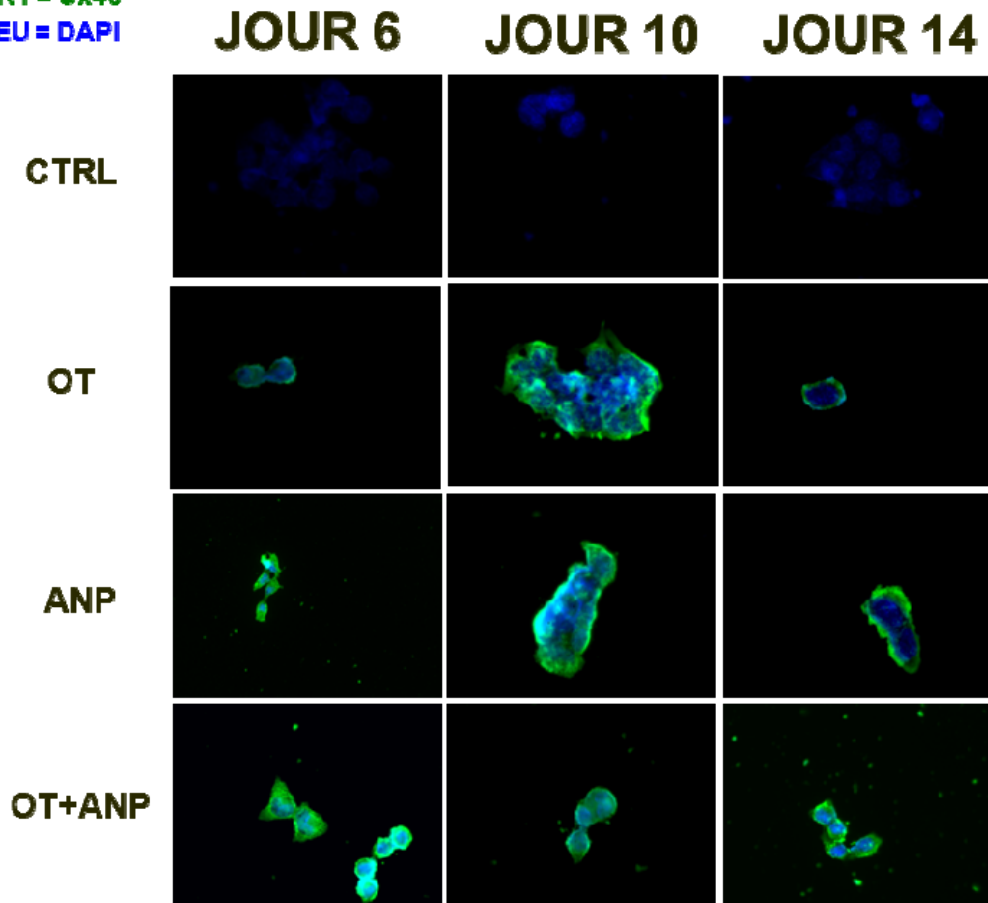
Suite à l'observation de colonies de cellules battantes sous l'induction de l'ANP, nous avons voulu confirmer le phénotype cardiaque par immunofluorescence. Dans cette expérience, nous avons aussi utilisé l'OT comme contrôle positif. Tout d'abord, nous pouvons noter que le taux de cellules différenciées sous la stimulation de l'OT, l'ANP et leur combinaison qui expriment les différents marqueurs cardiaques (A-E), est significativement augmenté comparativement aux cellules non induites. En effet, on peut remarquer que la proportion de cellules non-induites exprimant les marqueurs cardiaques (A-E) est très faible (de 0 à 15%), et cette proportion ne varie presque pas du jour 6 au jour 14, ce qui démontre une absence de différenciation vers le phénotype cardiaque. De plus, on peut observer que sous la stimulation de l'OT (contrôle positif), le taux de cellules exprimant les marqueurs cardiaques (A-E) est plus élevé que sous la stimulation de l'ANP. Or, un point important dans cette expérience, est que la combinaison des deux peptides OT + ANP semble affecter négativement la cardiomyogenèse par rapport aux peptides seuls utilisés pour l'induction de différenciation. En effet, nous pouvons observer que sous la stimulation de la combinaison des peptides OT+ANP, le taux de cellules différenciées exprimant les marqueurs cardiaques (A-E) est diminué significativement en comparaison à la stimulation de l'OT. Qui plus est, nous n'observons pas de dynamique dans l'apparition de cellules différenciées positives pour les marqueurs cardiaques (A-E) du jour 6 au jour 14. En outre, nous pouvons seulement noter une légère tendance à l'augmentation du nombre de cellules différenciées exprimant les marqueurs cardiaques (A-E) sous la stimulation de l'ANP, L'OT et la combinaison des deux peptides ANP+OT. Ainsi dans cette expérience, nous confirmons pour la première fois que les cellules SP P19 différenciées sous la stimulation de l'ANP présentent un phénotype cardiaque. Cependant, nous obtenons la plus grande efficacité de différenciation sous la stimulation de l'OT, et cela est en accord avec les résultats présentés dans la Figure 7.

**A****ROUGE = Troponine T cardiaque****BLEU = DAPI****JOUR 6****JOUR 10****JOUR 14**

α ANP versus CTRL :  $p < 0.05$   
 β OT versus CTRL :  $p < 0.05$   
 γ OT versus OT+ANP :  $p < 0.05$

**B**

VERT = Cx40  
BLEU = DAPI



$\alpha$  ANP versus CTRL :  $p < 0.05$   
 $\beta$  OT versus CTRL :  $p < 0.05$   
 $\gamma$  OT versus OT+ANP :  $p < 0.05$

**C**

VERT = Cx43  
BLEU = DAPI

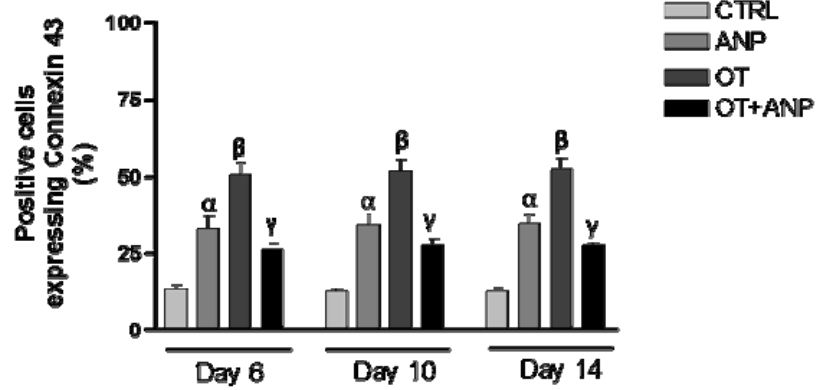
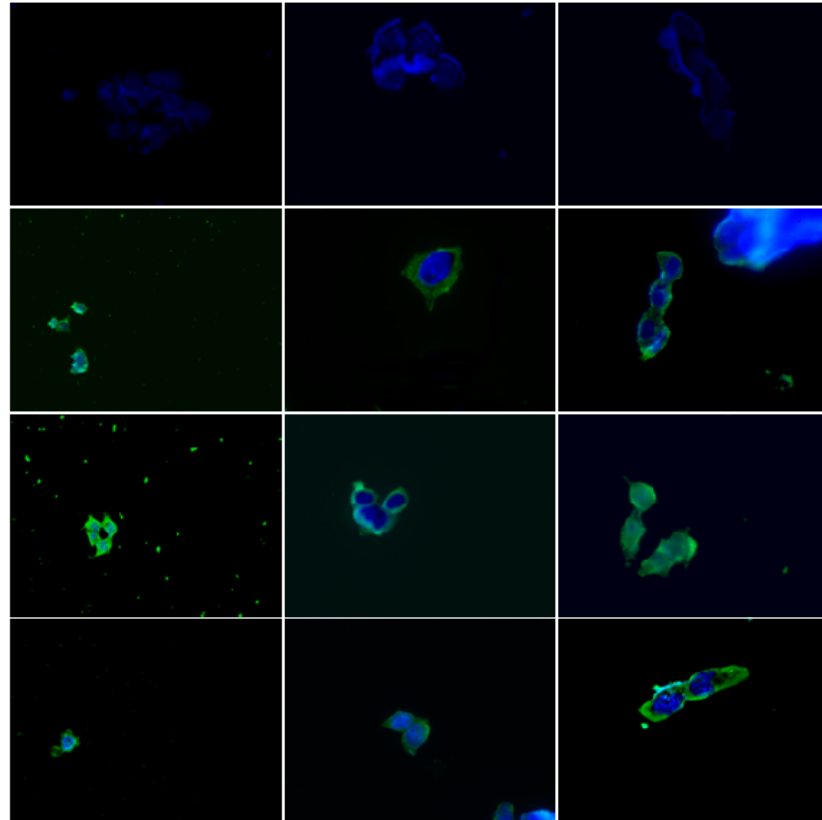
**JOUR 6****JOUR 10****JOUR 14**

CTRL

OT

ANP

OT+ANP

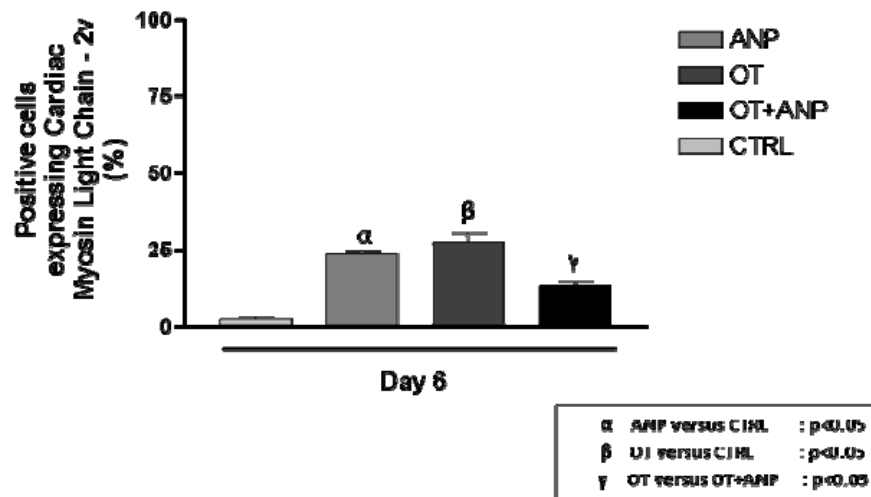
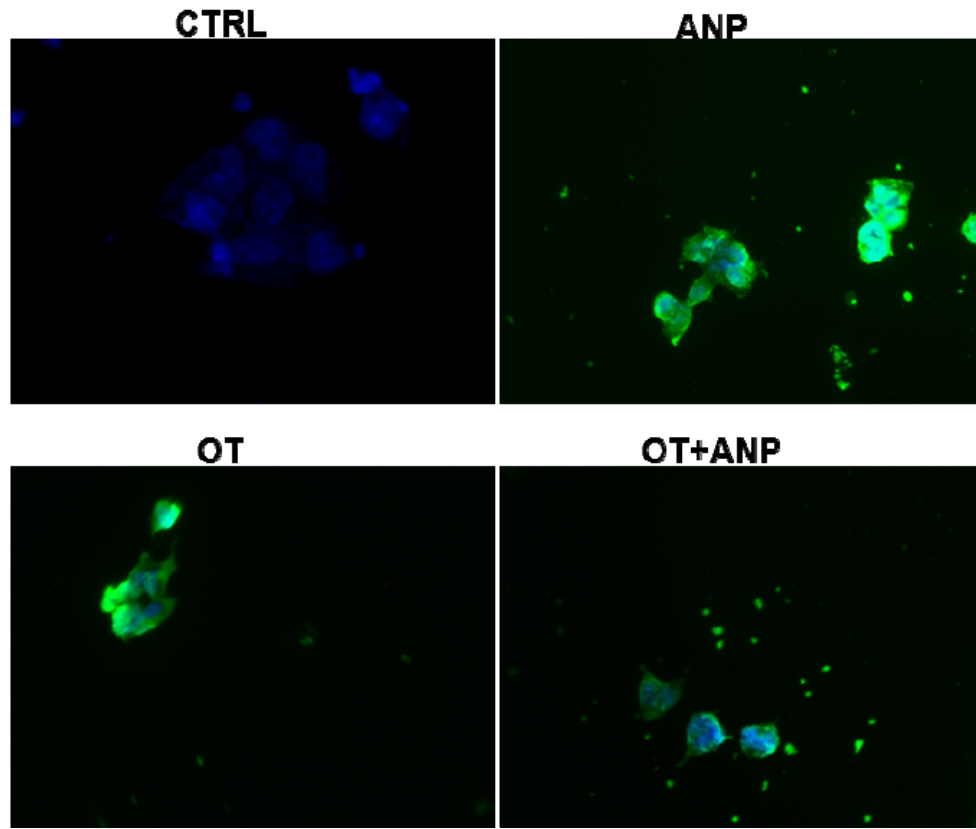


$\alpha$  ANP versus CTRL :  $p < 0.05$   
 $\beta$  OT versus CTRL :  $p < 0.05$   
 $\gamma$  OT versus OT+ANP :  $p < 0.05$

**D**

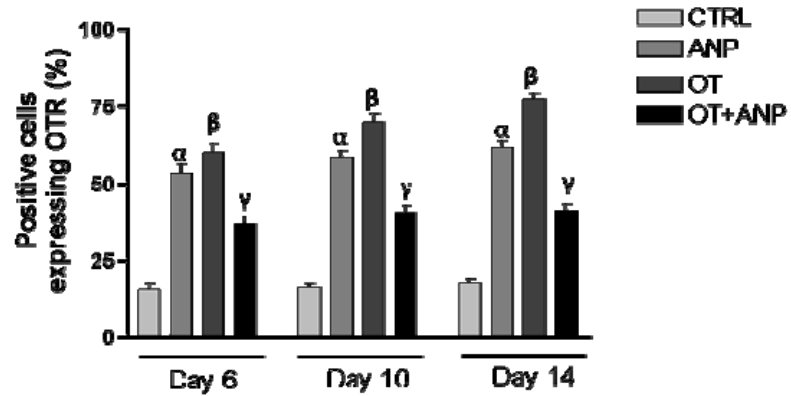
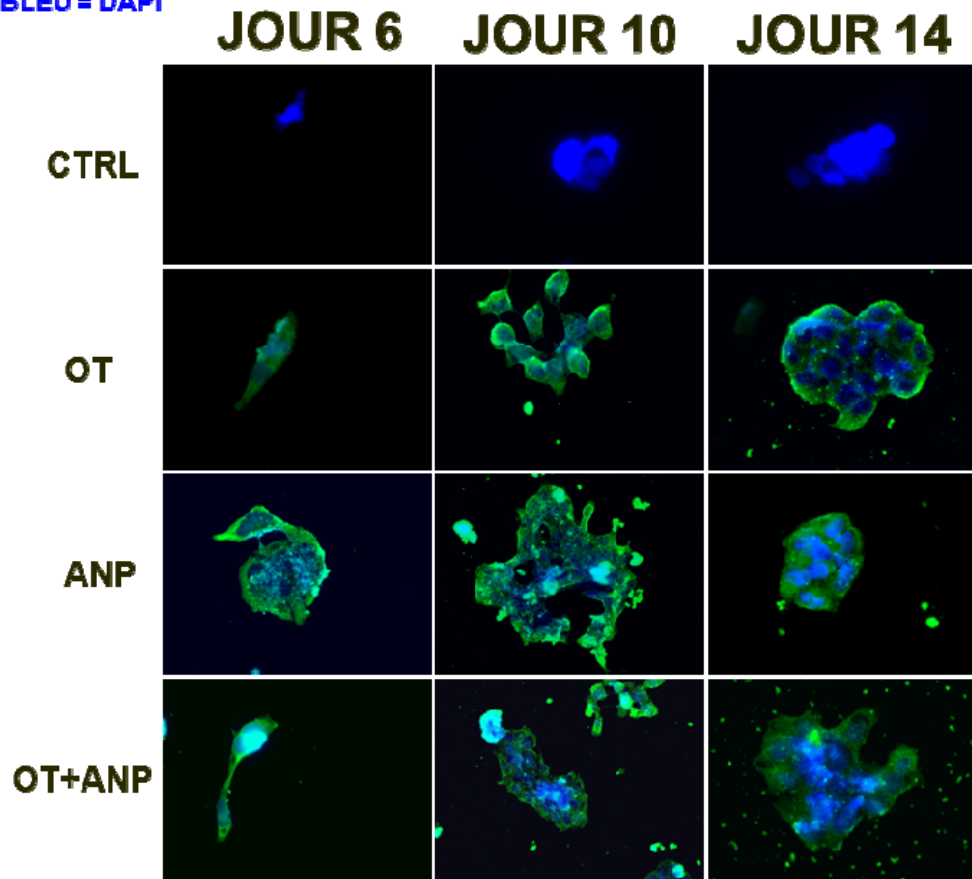
VERT = MLC-2v

BLEU = DAPI

**JOUR 6**

**E**

VERT = OTR  
 BLEU = DAPI



$\alpha$  ANP versus CTRL :  $p < 0.05$   
 $\beta$  OT versus CTRL :  $p < 0.05$   
 $\gamma$  OT versus OT+ANP :  $p < 0.05$

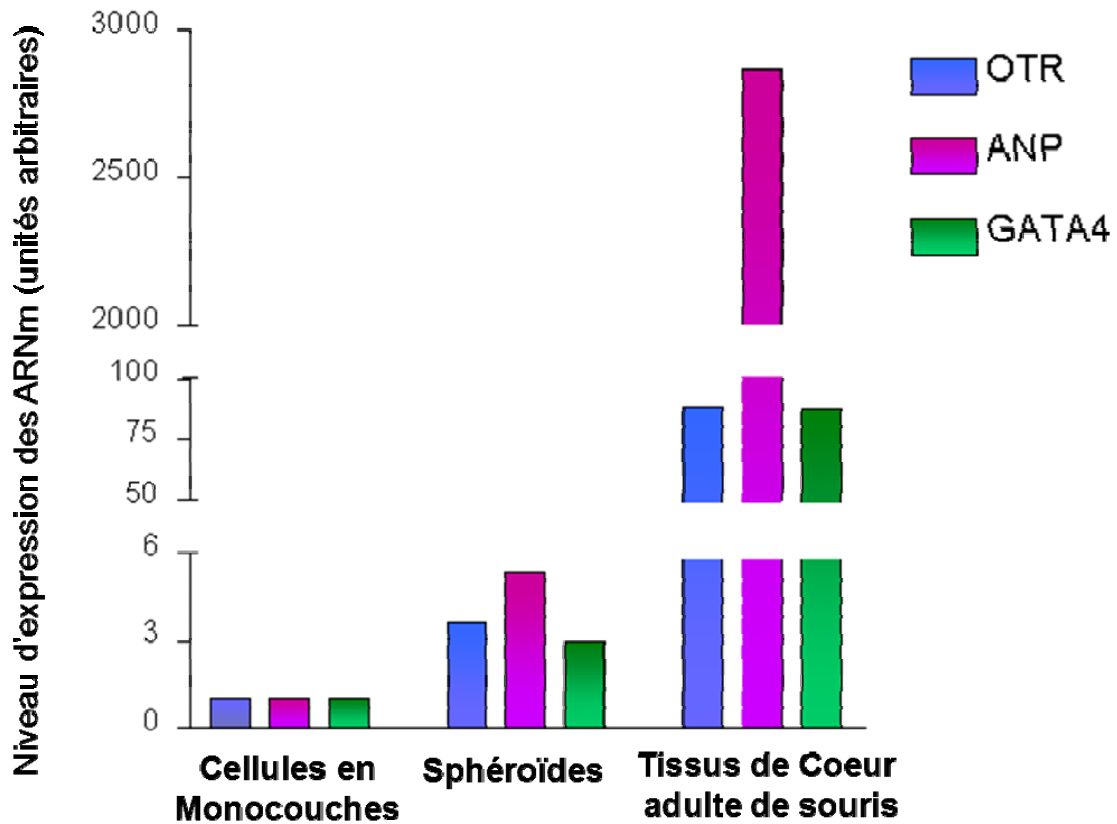
### **Figure 12 (8) - Confirmation du phénotype cardiaque des sphéroïdes induits avec l'ANP.**

Les graphiques A à E représentent respectivement l'analyse quantitative des marqueurs correspondants exprimés en pourcentage du nombre de cellules exprimant les marqueurs troponine T cardiaque, connexine 40 (Cx40), connexine 43 (Cx43), OTR et myosin light chain-2v (MLC-2v), du jour 6 au jour 14 de différenciation, sous la stimulation de l'OT  $10^{-7}M$ , l'ANP  $10^{-7}M$ , et la combinaison ANP+OT. Fluoromicrographes de cellules SP P19 différenciées jusqu'au jour 5, puis cultivées, fixées, perméabilisées et immunomarquées du jour 6 au jour 14. Les fluoromicrographes sont présentés à un grossissement de 20X. Les résultats proviennent d'au moins trois expériences indépendantes. Les différences statistiquement significatives ( $P < 0,05$ ) sont désignées comme "α" pour l'ANP et "β" pour l'OT en comparaison au groupe contrôle (CTRL). Les différences statistiquement significatives ( $P < 0,05$ ) sont désignées comme "γ" pour la combinaison de l'ANP et de l'OT en comparaison à l'OT seul. Les valeurs représentées constituent les moyennes de chaque groupe  $\pm$  SEM (n=3). Nous avons utilisé comme contrôle négatif des cellules mises en présence de l'immunoglobuline G de l'animal avec lequel l'anticorps primaire a été produit pour vérifier la spécificité de la réaction.

### **III.9 LES ARNm D'OTR, DE L'ANP ET DE GATA4 SONT EXPRIMÉS DE FAÇON MODESTE DANS LES CELLULES SP P19**

On peut observer que les cellules SP P19 en monocouche expriment de façon très faible les transcrits des ARNm d'OTR, de l'ANP et de GATA4. Suite à l'agrégation de ces cellules on peut observer une légère hausse de ces transcrits impliqués dans la cardiomyogenèse mais cette hausse reste modeste face aux niveaux d'expression retrouvés dans les tissus de cœur adulte de souris. Les niveaux d'expression des transcrits des ARNm de GATA4, de l'ANP ainsi que de l'OTR retrouvés dans le cœur adulte de souris sont presque 1000 fois plus élevés que les niveaux retrouvés dans les cellules SP P19 en monocouche ou en agrégat (sphéroïde).



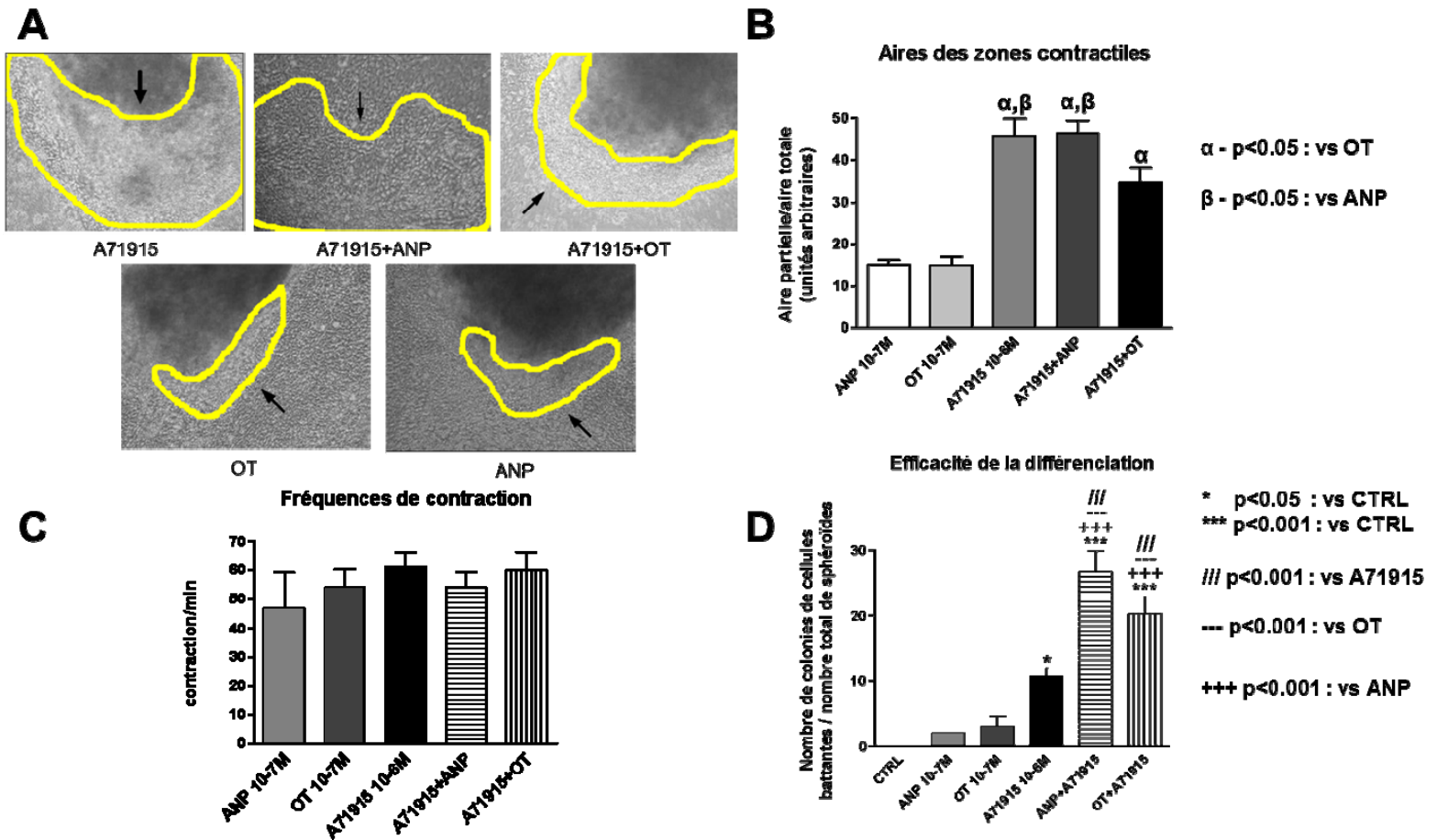


**Figure 13 (9) - Effet de l'agrégation des cellules SP P19 sur l'expression des ARNm.**

L'analyse des transcrits de gène de l'ANP, GATA4 et de OTR dans des agrégats non induits et dans des cultures de cellules P19 en monocouche a été effectuée par PCR en temps-réel. Les cellules ont été agrégées pendant 5 jours en absence d'inducteurs et l'ARN total a été extrait au jour 7 du protocole de différenciation. Les transcrits des gènes de l'ANP, GATA4 et OTR ont également été évalués dans les cellules non différenciées cultivées en monocouches. L'ARNm d'un ventricule de cœur de souris adulte a été utilisé comme contrôle positif. Les niveaux d'ARNm de l'ANP, GATA4 et OTR ont été ajustés en divisant par l'ARNm des GAPDH correspondant.

### **III.10 IMPLICATION DU GUANYLATE CYCLASE PARTICULÉ DANS LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES SP P19 EN CARDIOMYOCYTES FONCTIONNELS**

Suite à notre observation que l'ANP induit l'apparition de colonies de cellules battantes du jour 6 au jour 14 de différenciation cellulaire et suite à la confirmation du phénotype cardiaque résultant de la différenciation sous la stimulation de l'ANP, nous avons voulu comprendre si la production du GMPc provenant de la stimulation de l'ANP était le facteur influençant la différenciation cellulaire vers le phénotype cardiaque. Étant donné que l'ANP stimule la production du GMPc via les récepteurs NPR-A/NPR-B par le biais du guanylate cyclase particulé, nous avons décidé d'utiliser un inhibiteur spécifique du guanylate cyclase particulé. De façon inattendue, nous avons observé que sous la stimulation de l'antagoniste du guanylate cyclase particulé, A71915, à une concentration de  $10^{-6}$ M, l'apparition de colonies de cellules battantes était significativement plus importante que sous la stimulation de l'OT et de l'ANP (Figure 10D). De plus, nous avons remarqué que lorsqu'on combine notre antagoniste à l'OT ou à l'ANP, la proportion de colonies de cellules battantes est encore plus importante que lorsqu'on ajoute l'antagoniste A71915 seul (Figure 10D). Par ailleurs, nous avons observé que sous la stimulation de l'antagoniste A71915, la combinaison A71915+ANP et la combinaison A71915+OT, les tailles des colonies de cellules battantes sont significativement augmentées par rapport à l'OT et l'ANP (Figure 10A et 10B). Néanmoins, les colonies de cellules battantes obtenues sous la stimulation de l'OT et de l'ANP ont approximativement les mêmes tailles (Figure 10A et 10B). Dans, un autre contexte, nous avons mesuré la fréquence des contractions des cellules battantes sous les diverses stimulations et nous n'avons pas remarqué de différences significatives (Figure 10C). En contraste avec les données précédemment présentées dans la Figure 7 montrant que la combinaison des deux peptides ANP+OT n'induit pas l'apparition de colonies de cellules battantes, on peut observer ici que l'ajout de l'antagoniste A71915 à l'OT ou à l'ANP potentialise sensiblement l'efficacité de la différenciation cellulaire (voir vidéos des colonies de cellules battantes en annexes). Les sphéroïdes non induits n'ont pas stimulé l'apparition de colonies de cellules battantes.



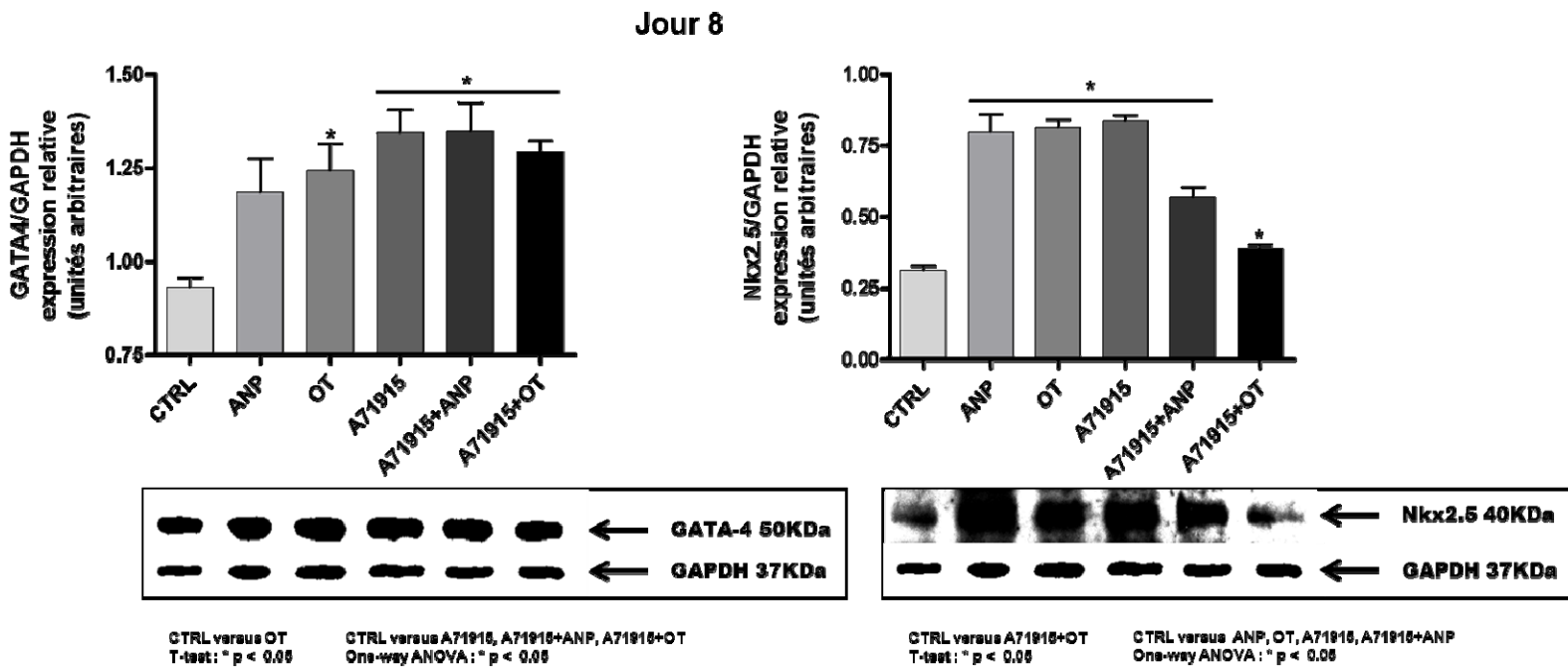
**Figure 14 (10) - Comparaison de l'efficacité de la différenciation sous la stimulation de l'OT, l'ANP, A71915, A71915 + ANP et A71915 + OT.**

Le graphique B représente la mesure de l'aire des zones contractiles observées sous la stimulation de l'OT 10<sup>-7</sup>M, l'ANP 10<sup>-7</sup>M, l'antagoniste A71915 10<sup>-6</sup>M et la combinaison d'A71915 avec l'ANP et l'OT. Les sphéroïdes, provenant d'une boîte de Pétri, traités pendant 5 jours avec l'agent indiqué ont été cultivés et examinés au jour 7 de différenciation (stade précoce de différenciation cellulaire). Micrographes de colonies de cellules battantes (délimitation des zones contractiles en jaune) provenant de cellules SP P19 différenciées au jour 7, présenté à un grossissement de 20X (Figure 10A). Le graphique D représente la proportion de colonies de cellules battantes par rapport à la proportion de sphéroïdes dans chaque pétri. Le graphique C représente la vitesse de contraction des colonies de cellules battantes observée sous la stimulation de l'ANP, l'OT, A71915, A71915+ANP et A71915+OT. Les différences statistiquement significatives (P <0,05) sont désignées comme "α" en comparaison à l'OT (Figure 10B). Les différences statistiquement significatives (P <0,05) sont désignées comme "β" en comparaison à l'ANP (Figure 10B). Les différences statistiquement significatives (P <0,05) sont désignées comme "\*" en comparaison au groupe contrôle (CTRL) (Figure 10D). Les différences statistiquement significatives (P <0,001) sont désignées comme "\*\*\*" en comparaison au groupe contrôle (CTRL) (Figure 10D). Les différences statistiquement significatives (P <0,001) sont désignées comme "///" en comparaison à l'antagoniste A71915 (Figure 10D). Les différences statistiquement significatives (P <0,001) sont désignées comme "---" en

comparaison à l'OT (Figure 10D). Les différences statistiquement significatives ( $P < 0,001$ ) sont désignées comme "+++" en comparaison à l'ANP (Figure 10D). Les valeurs représentées constituent les moyennes de chaque groupe  $\pm$  SEM ( $n=5$ ).

### III.11 L'ANTAGONISTE DU GUANYLATE CYCLASE PARTICULÉ STIMULE L'EXPRESSION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION CARDIAQUE GATA4 ET NKX2.5 DANS LES CELLULES SP P19.

Dans le but de déterminer si l'antagoniste A71915 avait induit la cardiomyogenèse dans les cellules contractiles issues des cellules SP P19, nous avons, par immunobuvardage de type Western, quantifié GATA4 et Nkx2.5, deux facteurs de transcription clés impliqués dans le développement et la différenciation cardiaque. Ainsi, nous avons observé une hausse significative de l'expression de GATA4 et de Nkx2.5 sous la stimulation de l'antagoniste A71915 seul ou combiné avec l'OT et l'ANP comparativement aux cellules non induites au jour 8 de différenciation cardiaque (Figure 11). Il est intéressant de remarquer que l'ANP semble avoir une tendance à augmenter GATA4 et que celui-ci augmente significativement les niveaux de Nkx2.5 comparé aux cellules non induites. De même, OT augmente significativement les niveaux d'expression de GATA4 et de Nkx2.5. On peut remarquer que l'antagoniste A71915 semble améliorer la cardiomyogenèse dans les cellules SP P19 différenciées.

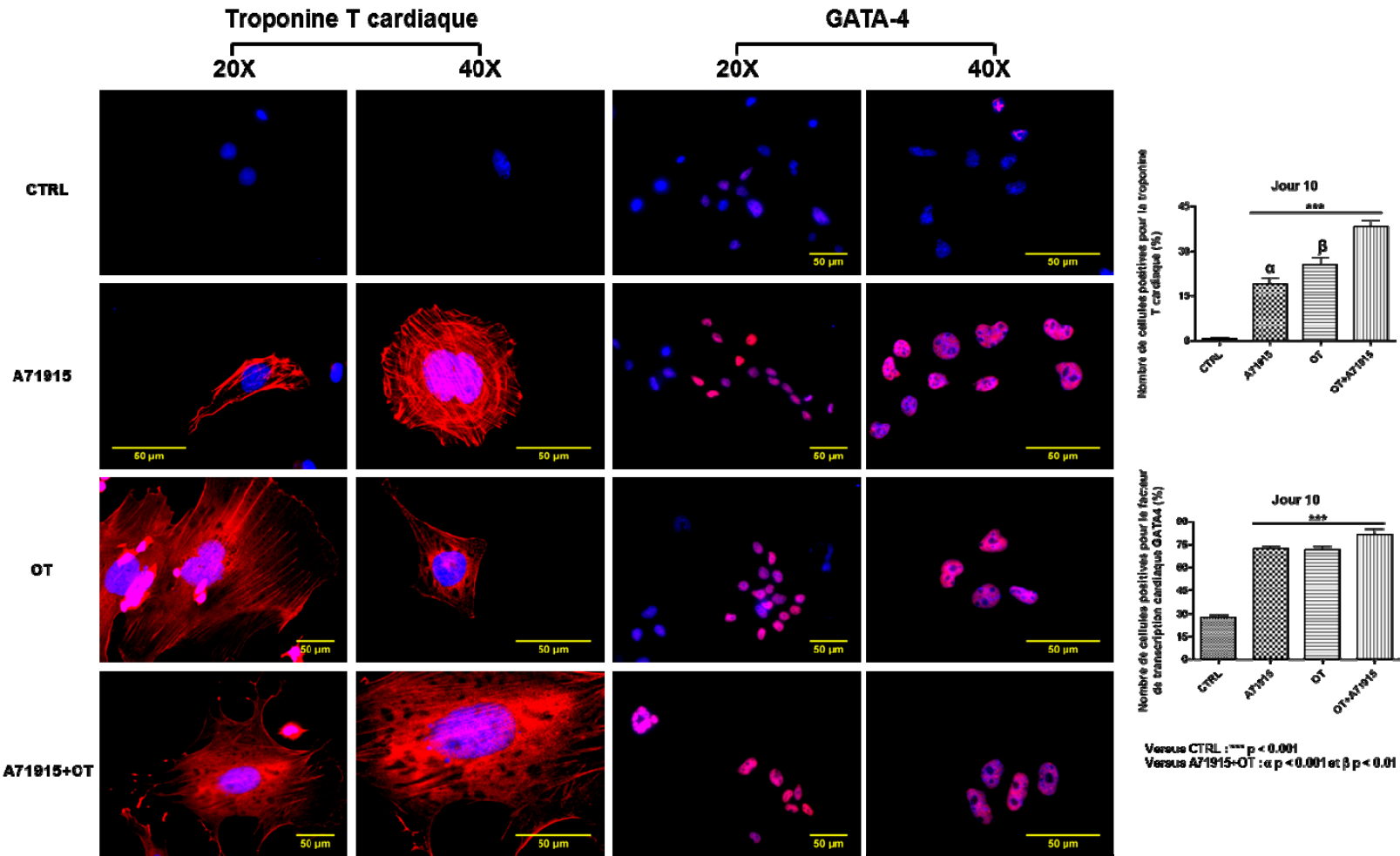


**Figure 15 (11) - Expression relative de GATA4 et Nkx2.5 dans les cellules différenciées sous la stimulation de l'antagoniste du guanylate cyclase particulé, A71915.**

L'analyse des niveaux d'expression relatifs des protéines de GATA4 et de Nkx2.5 dans des cellules SP P19 différenciées sous la stimulation de l'ANP  $10^{-7}M$ , de l'OT  $10^{-7}M$ , de l'antagoniste A71915  $10^{-6}M$  et de la combinaison A71915+ANP et A71915+OT a été effectuée par immunobuvardage de type Western. Les cellules ont été agrégées pendant 5 jours en présence des inducteurs, puis cultivées jusqu'au jour 8 sans les inducteurs et les protéines ont été extraites au jour 8 du protocole de différenciation. Les protéines provenant d'un ventricule de cœur de souris adulte ont été utilisées comme contrôle positif de la réaction. Les niveaux d'expression relatifs de GATA4 et de Nkx2.5 ont été normalisés par les niveaux d'expression relatifs des GAPDH correspondant. Les différences statistiquement significatives ( $P < 0,05$ ) sont désignées comme "\*" en comparaison au groupe contrôle (CTRL) (Figure 11). Les valeurs représentées constituent les moyennes de chaque groupe  $\pm$  SEM (n=3).

**III.12 CONFIRMATION DU PHÉNOTYPE DES CELLULES SP P19  
DIFFÉRENCIÉES SOUS LA STIMULATION DE L'ANTAGONISTE DU  
GUANYLATE CYCLASE PARTICULÉ A71915**

Nous pouvons observer que sous la stimulation d'A71915, les cellules différenciées obtenues expriment fortement le facteur de transcription cardiaque GATA4 ainsi que la protéine de la contractilité troponine T cardiaque comparativement aux sphéroïdes non induits (Figure 12). Cela nous permet de conclure que l'antagoniste A71915 peut induire la différenciation cardiaque dans les cellules SP P19. Afin d'être certain du phénotype, nous avons aussi utilisé un marqueur du muscle lisse, soit l'isoforme du muscle lisse de la chaîne lourde de myosine (MHC) et nous n'avons rien détecté (Figure 13) car on ne pouvait discerner que les noyaux colorés en bleu. Nous avons aussi voulu confirmer la disparition du marqueur de l'état indifférencié SSEA1 (Figure 14). En effet, on peut observer qu'il y a une diminution significative de la présence du marqueur SSEA1 dans les cellules différenciées sous la stimulation de l'OT, A71915 et la combinaison A71915+OT comparativement au CTRL (Figure 14).

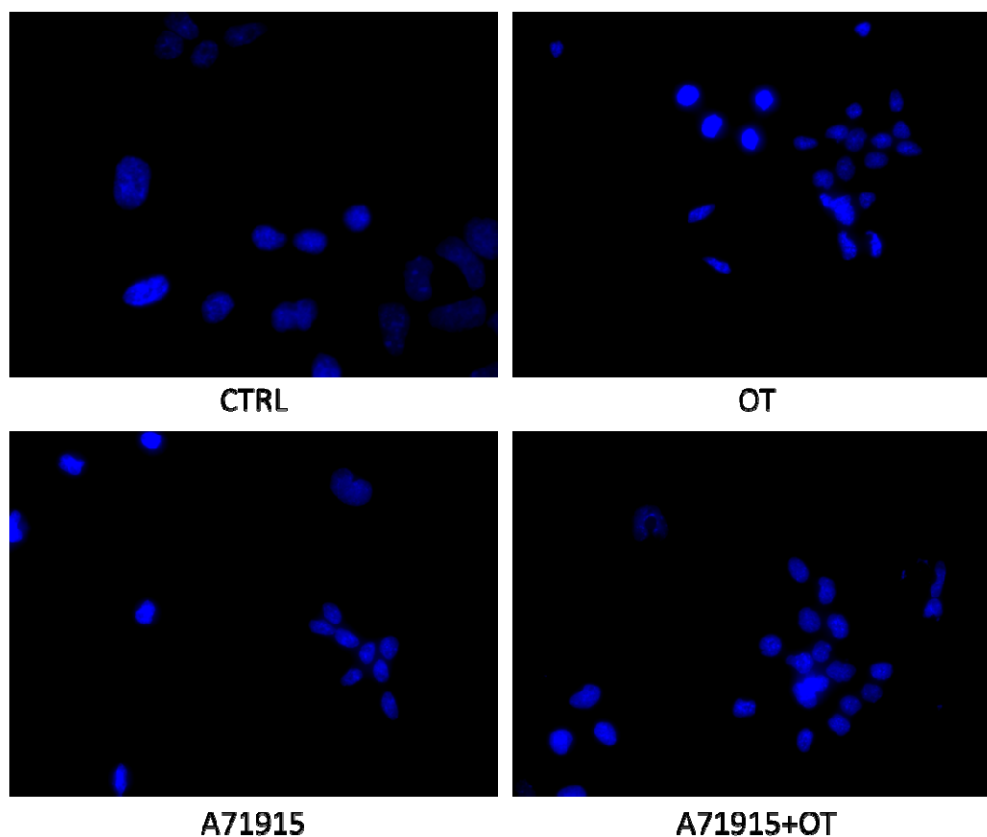


**Figure 16 (12) - Immunofluorescence de marqueurs de différenciation cardiaque dans les cellules P19 non-induites et dans les cellules P19 induites avec l'Antagoniste A71915.**

Des cellules P19 différenciées sous la stimulation d'A71915  $10^{-6}$ M, d'OT  $10^{-7}$ M et de la combinaison d'A71915 avec OT ont été agrégées jusqu'au jour 5 pour les laisser former des sphéroïdes. Au jour 5 d'agrégation, les cellules P19 différenciées ont été propagées sans les inducteurs, fixées au jour 10 de différenciation, perméabilisées puis immunocolorées pour la détection des marqueurs cardiaques troponine T cardiaque et GATA4. Le fluorophore DAPI (en bleu) a été utilisé en tant que marqueur nucléaire. La localisation spécifique de la troponine T cardiaque (en rouge) se localise autour du noyau (en bleu). La localisation spécifique du facteur de transcription cardiaque GATA4 (en rouge) se colocalise avec le noyau (en bleu). La fusion des signaux fluorescents indique une coloration nucléaire, GATA4 et DAPI et une coloration cytoplasmique et membranaire, troponine T cardiaque et DAPI. Les fluoromicrographes de cellules P19 différenciées au jour 10 sont présentés à un grossissement de 20X et 40X. Les différences statistiquement significatives ( $P < 0,001$ ) sont désignées comme '\*\*\*' en comparaison au groupe contrôle (CTRL). Les différences statistiquement significatives ( $P < 0,001$ ) sont désignées comme ' $\alpha$ ' en comparaison au groupe A71915+OT. Les différences statistiquement significatives ( $P$

<0,01) sont désignées comme "β" en comparaison au groupe A71915+OT. Les valeurs représentées constituent les moyennes de chaque groupe ± SEM (n=3). Nous avons utilisé comme contrôle négatif des cellules mises en présence de l'immunoglobuline G de l'animal avec lequel l'anticorps primaire a été produit pour vérifier la spécificité de la réaction.

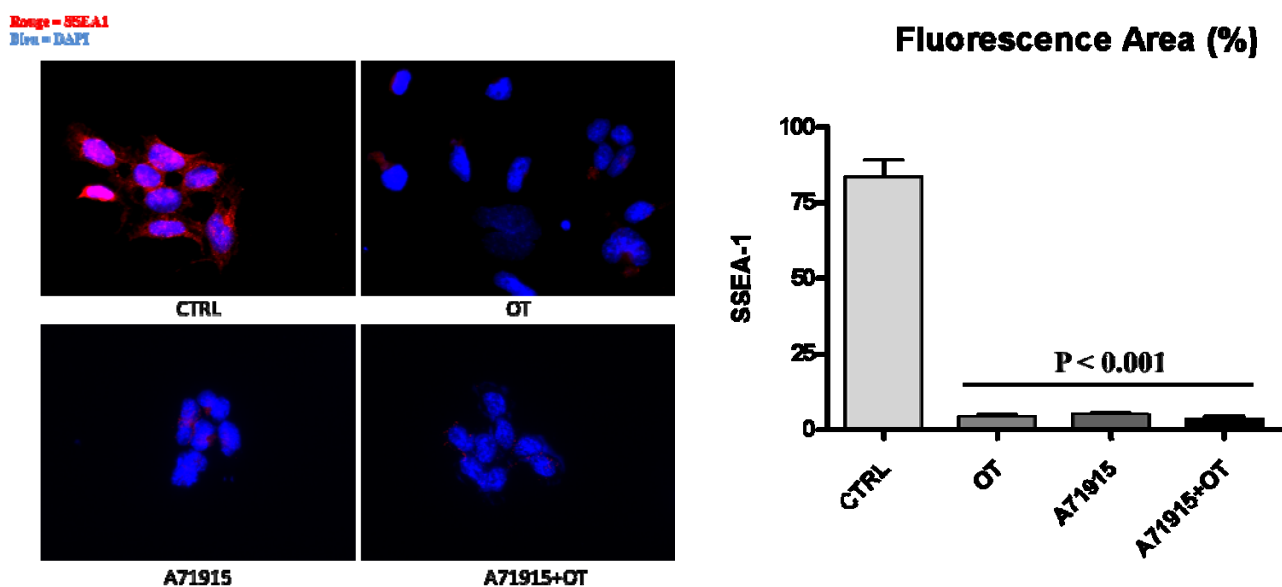
Rouge : MHC  
Bleu : DAPI



**Figure 17 (13) - Immunofluorescence de marqueur du muscle lisse dans les cellules P19 non-induites et dans les cellules P19 induites avec l'Antagoniste A71915.**

Des cellules P19 différenciées sous la stimulation d'A71915  $10^{-6}$ M, d'OT  $10^{-7}$ M et de la combinaison d'A71915 avec OT ont été agrégées jusqu'au jour 5 pour les laisser former des sphéroïdes. Au jour 5 d'agrégation, les cellules P19 différenciées ont été propagées sans les inducteurs, fixées au jour 10 de différenciation, perméabilisées puis immunocolorées pour la détection du marqueur de muscle lisse, l'isoforme du muscle lisse de la chaîne lourde de la myosine (smooth muscle MHC). Le fluorophore DAPI (en bleu) a été utilisé en tant que marqueur nucléaire. La localisation spécifique de la MHC (en rouge) se localise autour du noyau (en bleu). La fusion des signaux fluorescents indique une absence de cellules du muscle lisse. Les fluoromicrographes de cellules P19 différenciées au jour 10 sont présentés à un grossissement de 40X. Nous avons utilisé

comme contrôle négatif des cellules mises en présence de l'immunoglobuline G de l'animal avec lequel l'anticorps primaire a été produit pour vérifier la spécificité de la réaction.



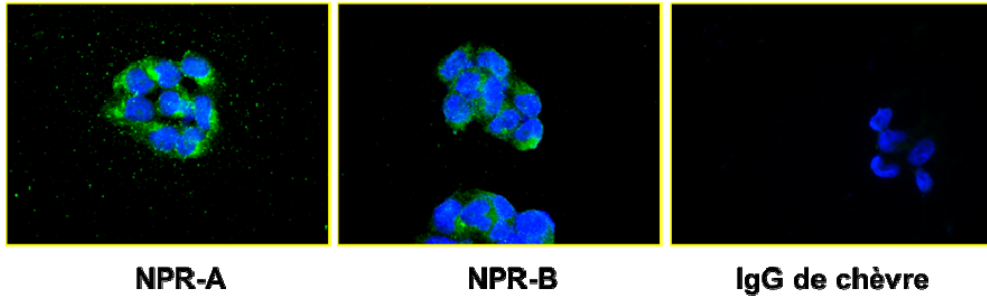
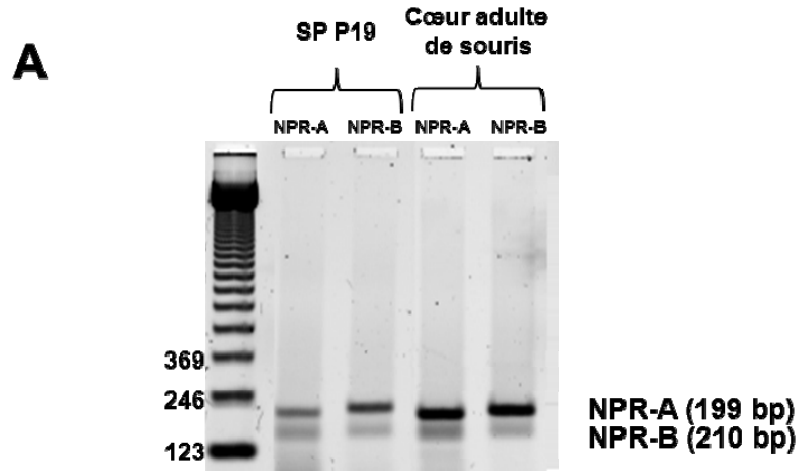
**Figure 18 (14) - Immunofluorescence du marqueur de l'état indifférencié SSEA1 dans les cellules P19 non-induites et dans les cellules P19 induites avec l'Antagoniste A71915.**

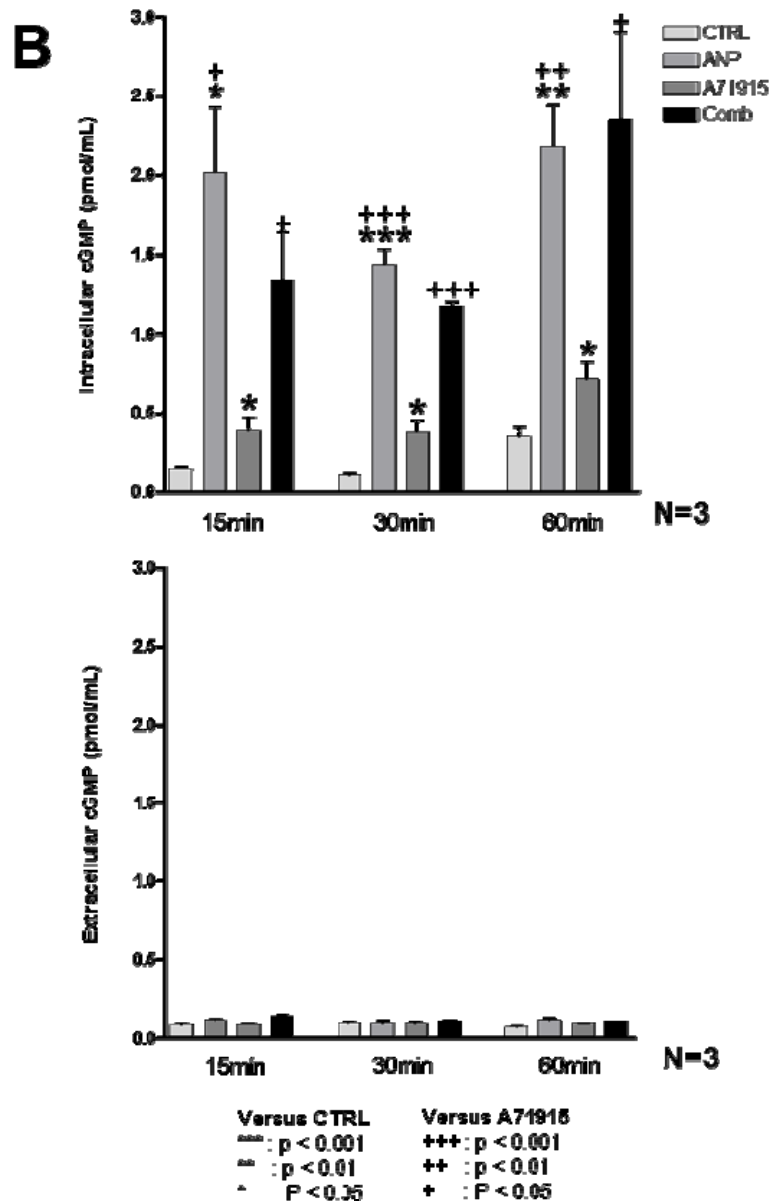
Des cellules P19 différenciées sous la stimulation d'A71915  $10^{-6}$ M, d'OT  $10^{-7}$ M et de la combinaison d'A71915 avec OT ont été agrégées jusqu'au jour 5 pour les laisser former des sphéroïdes. Au jour 5 d'agrégation, les cellules P19 différenciées ont été propagées sans les inducteurs, fixées au jour 10 de différenciation, perméabilisées puis immunocolorées pour la détection du marqueur de l'état indifférencié SSEA1. Le fluorophore DAPI (en bleu) a été utilisé en tant que marqueur nucléaire. La localisation spécifique de SSEA1 (en rouge) se localise autour du noyau (en bleu). La fusion des signaux fluorescents indique localisation cytoplasmique de SSEA1 (en rouge). Les fluoromicrographes de cellules P19 différenciées au jour 10 sont présentés à un grossissement de 40X. La proportion de SSEA1 présent dans les cellules a été quantifiée en faisant le rapport du niveau de fluorescence émis en rouge par les cellules positives pour SSEA1 avec le niveau de fluorescence émis en bleu par les noyaux marqués avec le DAPI. Les différences statistiquement significatives ( $P < 0,01$ ) sont désignées comme "-" en comparaison au groupe contrôle (CTRL). Les valeurs représentées constituent les moyennes de chaque groupe  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). Nous avons utilisé comme contrôle négatif des cellules mises en présence de l'immunoglobuline G de l'animal avec lequel l'anticorps primaire a été produit pour vérifier la spécificité de la réaction.



### **III.13 MISE EN ÉVIDENCE DES RÉCEPTEURS PEPTIDIQUES NATRIURÉTIQUES COUPLÉS AUX GUANYLYL CYCLASES (NPR-A ET NPR-B) AINSI QUE L'EFFET DE L'ANTAGONISTE A71915 SUR LA PRODUCTION DU GMPC**

Étant donné que l'ANP stimule la production du GMPC via son récepteur NPR-A ou NPR-B, nous avons tenté de déterminer si les cellules SP P19 expriment les gènes ou protéines de ces récepteurs. Nous avons mis en évidence la présence des gènes et protéines codants pour NPR-A et NPR-B dans les cellules SP P19 (Figure 15A). Suite à cela, nous avons cherché à comprendre si l'antagoniste A71915 avait complètement bloqué la production du GMPC pour induire la différenciation cellulaire, Nous avons observé que l'ANP a augmenté de façon significative la production du GMPC intracellulaire, or l'antagoniste A71915 a aboli cet effet, cependant il a montré un effet agoniste partiel, tandis que la combinaison A71915 + ANP a été diminuée par rapport à l'ANP seul (Figure 15B). Par ailleurs, nous avons observé qu'au cours du temps, l'antagoniste A71915 augmente la production du GMPC intracellulaire et à 60min de stimulation, il y a une tendance d'effet additif de l'antagoniste A71915 sur l'ANP (Figure 15B). Bien qu'il y ait des effets de ces molécules dans la fraction intracellulaire, il n'y en a pas dans la fraction extracellulaire. Ainsi, nous pouvons observer que dans cette expérience, l'antagoniste A71915 ne fonctionne pas bien comme antagoniste de la production de GMPC par l'intermédiaire de l'ANP puisque le GMPC libéré en combinaison est relativement élevée. De plus, les mécanismes par lesquels cet antagoniste fonctionne sont à déterminer dans des expériences supplémentaires afin de montrer si l'antagoniste A71915 peut influencer la production du GMPC stimulée par le NO dans ces cellules.





**Figure 19 (15) - Détermination de la présence des récepteurs peptidiques natriurétiques couplés aux guanylyl cyclases dans les cellules SP P19 et évaluation de la production du GMPc intracellulaire et extracellulaire dans les cellules SP P19.**

**A)** L'analyse des transcrits des gènes NPR-A et NPR-B a été effectuée dans les cellules SP P19 en monocouches via PCR en temps réel. L'ARN total a été extrait après 2 passages cellulaires. La présence des protéines de NPR-A et NPR-B a aussi été évaluée par immunofluorescence dans les cellules SP P19 propagées en monocouche (non diff.). Nous avons utilisé comme contrôle négatif des cellules mises en présence de l'immunoglobuline G de chèvre pour vérifier la spécificité de la réaction. **B)** L'analyse des niveaux de GMPc a été effectuée dans les cellules SP P19 en monocouche

par dosage radioimmunologique (RIA). Pour cela, les cellules ont été cultivées avec l'alpha-MEM contenant 10% de FBS et 1% pénicilline/streptomycine jusqu'à ce qu'elles atteignent la confluence de 60%, puis les cellules ont été cultivées avec du milieu de culture alpha-MEM appauvri en sérum (0,2% de FBS) pour 24h. Puis les cellules ont été pré-traitées avec l'inhibiteur de la phosphodiesterase, l'IBMX. Dans le cas des cellules traitées avec l'antagoniste A71915 ou A71915+ANP, celles-ci ont été pré-traitées avec l'antagoniste A71915  $10^{-6}$ M pendant 30min à 37 degrés. Puis, les cellules ont été traitées avec l'ANP  $10^{-7}$ M, A71915  $10^{-6}$ M et A71915+ANP à différents temps (15, 30 et 60 min). Enfin, le milieu cellulaire (fraction extracellulaire) a été récolté aux différents temps indiqués précédemment et les cellules ont été lysées (fraction intracellulaire) avec un tampon de lyse froid contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Les différences statistiquement significatives ( $P < 0,05$ ) sont désignées comme "\*" en comparaison au groupe contrôle (CTRL). Les différences statistiquement significatives ( $P < 0,01$ ) sont désignées comme "\*\*" en comparaison au groupe contrôle (CTRL). Les différences statistiquement significatives ( $P < 0,001$ ) sont désignées comme "\*\*\*" en comparaison au groupe contrôle (CTRL). Les différences statistiquement significatives ( $P < 0,05$ ) sont désignées comme "+" en comparaison au groupe A71915. Les différences statistiquement significatives ( $P < 0,01$ ) sont désignées comme "++" en comparaison au groupe A71915. Les différences statistiquement significatives ( $P < 0,001$ ) sont désignées comme "+++" en comparaison au groupe A71915. Les valeurs représentées constituent les moyennes de chaque groupe  $\pm$  SEM (n=3).

## **CHAPITRE IV : DISCUSSION**

Le présent travail est à notre connaissance le premier à explorer les effets de l'ANP ainsi que la voie de signalisation impliquant ANP/GCp/GMPc, dans la différenciation cardiaque des cellules souches embryonnaires carcinomateuses de souris P19.

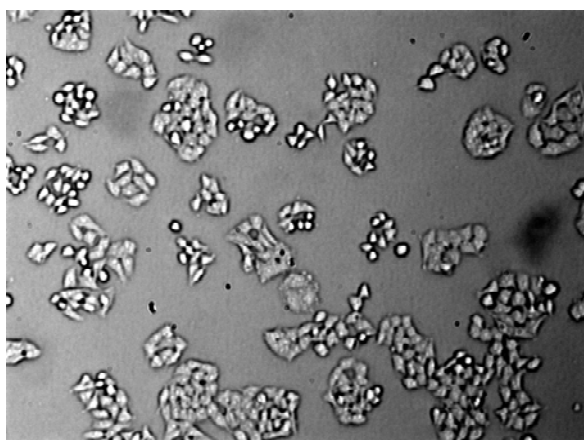
L'ensemble des travaux du mémoire ont permis de démontrer que :

- L'ANP diminue la viabilité des cellules P19 cultivées en monocouche et augmente la viabilité des cellules cultivées à l'état de sphéroïde.
- L'ANP induit la cardiomyogenèse dans les SP de cellules souches embryonnaires carcinomateuses de souris P19.
- L'ANP interfère dans la cardiomyogenèse stimulée par l'OT dans les cellules P19.
- L'antagoniste du guanylate cyclase particulé, A71915, semble avoir une activité cardiomyogénique dans les SP de cellules souches embryonnaires carcinomateuses de souris P19.
- A71915 potentialise les effets de la différenciation cellulaire vers le phénotype cardiaque lorsque celui-ci est combiné à l'ANP ou l'OT.
- Le blocage du guanylate cyclase particulé via l'antagoniste A71915 n'abolit pas les effets de l'ANP et en revanche A71915 semble avoir une activité agoniste partielle dans sa capacité à induire la production du GMPc.

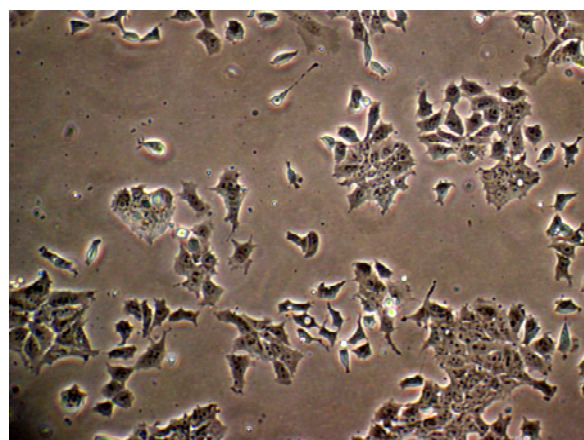
## **IV.1 LES CELLULES SP COMME UNE DES CIBLES NATURELLES DANS LA CARDIOMYOGÈNESE**

Dans ce projet, nous avons utilisé la lignée de CEC de souris P19 qui est un excellent modèle de différenciation cellulaire mimant très bien les stades précoces de la cardiomyogénèse. Plus exactement, nous avons utilisé des cellules SP issues de cellules P19, puisque cette sous-population cellulaire, ressemblant beaucoup aux cellules SP issues du cœur, sont stimulées localement dans le cœur lésé, et ont la capacité de se différencier en CM, en cellules endothéliales et en cellules musculaires lisses [64]. Les cellules SP ont pu être isolées des CSEs par FACS comme une population de cellules non marquées par le colorant fluorescent Ho et qui affiche une sensibilité à l'inhibiteur de la famille des transporteurs ATP-binding cassette ABC, VP. Nous avons en premier lieu essayé de déterminer si les cellules P19 présentaient des cellules SP, puis de vérifier si celles-ci avaient un plus grand potentiel de différenciation vers le phénotype cardiaque. En effet, nous avons identifié et isolé les cellules SP issues des cellules P19, bien que leur nombre soit très restreint (aux environs de 0,3 à 1,6% de la population générale). De plus, nous avons remarqué qu'en induisant la différenciation cellulaire avec les cellules SP P19, l'apparition des cellules contractiles était plus précoce comparativement aux cellules P19 classiques. De plus, les tailles des colonies de cellules battantes observées étaient beaucoup plus grandes dans les cellules SP P19 différenciées que dans les cellules P19 classiques. Il est possible d'expliquer ces observations par le simple fait que les cellules P19 obtenues de la compagnie ATCC ne sont pas homogènes. En effet, les cellules P19 classiques sont très hétérogènes puisqu'on peut observer différentes tailles et différentes formes de cellules suggérant que la différenciation cellulaire induite dans ces cellules peut aboutir à un engagement de la lignée cellulaire vers différentes couches germinatives et empêcher la population de cellules mésodermiques de maturer en CM fonctionnels. Or, dans le cas des cellules SP P19, on peut observer une homogénéité tant par la taille des cellules que par la forme de celles-ci. Ainsi, on peut supposer que la lignée cellulaire SP P19 a un potentiel plus grand de se diriger vers la même couche germinative et d'augmenter à cette occasion la

probabilité de donner des cellules mésodermiques capables de maturer plus facilement en CM fonctionnels.



**Cellules SP P19**



**Cellules P19 d'ATCC**

**Schéma 10 - Différences morphologiques des cellules SP P19 comparativement aux cellules P19 classique provenant de la compagnie ATCC.**

#### **IV.2 STIMULATION DE LA CARDIOMYOGÉNÈSE DANS LES CELLULES SP P19**

Pour fournir la base de l'hypothèse selon laquelle l'ANP a un potentiel cardiomyogénique, nous avons d'abord identifié la présence des récepteurs en lien avec l'ANP et son action physiologique. Ainsi, par immunofluorescence (IF) et par réaction en chaîne par polymérase en temps-réel (RT-PCR) nous avons identifié, dans les cellules SP P19, les transcrits des ARNm des NPRs, NPR-A, NPR-B et NPR-C ainsi que leurs protéines respectives. Puisque notre hypothèse est que la différenciation cardiaque est médiée par le second messager GMPc, nous avons décidé de focaliser nos efforts sur les mécanismes impliquant uniquement les récepteurs à activité GC, soit GC-A et GC-B, respectivement NPR-A et NPR-B. En outre, ces deux récepteurs stimulent la production du GMPc par l'intermédiaire du GCp. L'induction de colonies de cellules battantes dans les cellules stimulées avec l'ANP suggère que ce peptide induit la différenciation cardiaque. Afin de vérifier que cette observation n'était pas due à une apparition spontanée de colonies de cellules battantes mais

bien à l'effet de l'ANP lui-même, nous avons aussi stimulé la différenciation des cellules SP P19 avec l'OT, notre contrôle positif. Ayant obtenu des cellules contractiles sous la stimulation de l'ANP et de l'OT mais pas dans le cas des cellules non induites, nous avons émis l'hypothèse que l'ANP stimulait réellement la différenciation cellulaire vers un phénotype cellulaire capable de se contracter comme les CM. C'est à la suite de ces observations que nous avons décidé d'utiliser un antagoniste spécifique capable de bloquer l'activité physiologique de l'ANP.

### **IV.3 LES MARQUEURS DE LA CARDIOMYOGÈNESE SONT DÉTECTÉS DANS LES CELLULES SP P19 STIMULÉES PAR LE PEPTIDE NATRIURÉTIQUE AURICULAIRE**

Dans le cadre de nos expériences, nous avons utilisé plusieurs marqueurs dans le but d'analyser le phénotype des cellules souches indifférenciées et différenciées en cardiomyocytes.

#### ***IV.3.1 LES MARQUEURS DE CELLULES SOUCHES***

Avant d'induire la différenciation cellulaire, nous avons au préalable confirmé le phénotype indifférencié et pluripotent de nos cellules SP P19 à l'aide de deux marqueurs de cellules souches, Oct-4 et SSEA-1. En effet, Octamer-binding transcription factor 4 ou Oct-4 (également appelé Oct-3 ou Oct-3/4) a été initialement identifié comme une protéine, liant l'ADN, qui active la transcription du gène via un élément en position -cis contenant un motif octamère [197]. Oct-4 a été le premier gène identifié comme étant un régulateur principal de l'état pluripotent [198] et il a aussi été identifié comme un facteur de transcription précoce au cours du développement embryonnaire. L'expression d'Oct4 est spécifique aux cellules pluripotentes de l'ICM, des cellules germinales et des CSEs, où il joue un rôle indispensable dans le maintien de l'état pluripotent [199-201]. En effet, il a été prouvé que cette protéine



était impliquée de façon cruciale dans l'auto-renouvellement des CSEs indifférenciées et qu'elle intervenait aussi dans la maintenance de la pluripotence cellulaire : l'inhibition de l'expression d'Oct-4 entraînait la perte de la pluripotence des CSEs, puis leur différenciation vers le trophoctoderme [198]. Bien que les mécanismes régulant l'expression d'Oct-4 ne soient pas encore élucidés, Oct-4 est fréquemment utilisée comme marqueur de cellules indifférenciées. Puisque comme les cellules immunitaires, les CSEs sont aussi caractérisées par la présence de certains marqueurs de surface, nous avons choisi d'utiliser un membre de la famille des antigènes embryonnaires de stade spécifique (SSEA), plus précisément SSEA-1, afin de confirmer le phénotype indifférencié de nos cellules. En outre, il a été montré que SSEA-1 était présent sur la surface des embryons de souris au stade de pré-implantation (soit au stade de huit cellules), ainsi que sur la surface des CECs, mais pas sur leurs dérivés différenciés [202, 203]. Les CSEs indifférenciées issues des souris expriment SSEA-1, mais pas SSEA-3 ou SSEA-4 [204, 205]. Bien que le rôle de ces protéines dans le maintien de l'état indifférencié ne soit toujours pas déterminé, les protéines de la famille des SSEAs procurent un bon outil pour caractériser les CSEs et pour suivre les débuts de la différenciation.

#### ***IV.3.2 LES MARQUEURS DE LA CARDIOMYOGÈNESE***

Pour l'analyse de la différenciation cellulaire vers le phénotype cardiaque, nous avons analysé dans les cellules recueillies, les facteurs de transcription suivants : GATA-4 et Nkx2-5. En effet, GATA-4 fait partie de la famille des facteurs de transcription GATA qui se compose de six protéines (GATA-1 à -6). GATA-1, -2 et -3 sont d'importants régulateurs des cellules souches hématopoïétiques et de leurs dérivés [206-209], tandis que les gènes GATA-4, -5 et -6 sont exprimés dans différents dérivés tissulaires mésodermiques et endodermiques [210-212]. GATA-4 est l'un des premiers facteurs de transcription exprimé dans le développement des cellules cardiaques d'origine murine [213]. Après que de nombreuses études aient identifiées GATA-4 comme un facteur de transcription essentiel dans le cœur en développement, son rôle lors du développement a émergé. En effet, il a été démontré, à l'aide de la lignée de CECs P19, que la surexpression de GATA-4 dans ce

modèle cellulaire augmente la différenciation des cellules P19 en CM contractiles, tandis que l'inhibition de GATA-4 par stratégie anti-sens empêche la différenciation des cellules P19 en CM et déclenche en plus une apoptose extensive [214, 215]. Les CSEs déficientes en GATA-4 possèdent un potentiel, bien que réduit, à se différencier en CM *in vitro* [216], et sont partiellement inaptes à générer un bon endoderme viscéral ainsi qu'un endoderme définitif de l'intestin antérieur [217, 218]. Notamment, il a été démontré que des souris transgéniques présentant une inactivation du gène GATA-4 mourraient au cours du développement embryonnaire en raison de l'échec à former une bonne morphogénèse ventrale et une bonne formation du tube cardiaque entre les 8<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> jours post-coïtum [219, 220]. En ce qui concerne Nkx2.5, celui-ci est un facteur de transcription à homéoboîte conservé indispensable pour le développement cardiaque normal et les mutations du gène sont associées à des maladies cardiaques humaines congénitales (CHD), l'anomalie congénitale la plus fréquente de l'homme [221]. Nkx2.5 est le premier marqueur des cellules précurseurs cardiaques à être exprimé chez tous les vertébrés examinés jusqu'ici et est essentiel pour un cloisonnement cardiaque adéquate et une formation / maturation du système de conduction électrique [221]. Le gène Nkx2.5 code pour un facteur de transcription à homéodomaine jouant un rôle essentiel dans la formation du cœur. Il est fortement exprimé par les cellules cardiogéniques immatures et son expression diminue fortement puis disparaît dans les CM différenciés à partir du 12,5<sup>ème</sup> jour de l'embryogenèse chez la souris. Nkx2.5 est aussi le marqueur le plus précoce des lignées cardiaques [222].

Sachant que les CM ont un très grand besoin énergétique pour se contracter, il a été évident pour nous de déterminer si la proportion de mitochondries était plus importante sous la stimulation de l'ANP, ainsi que d'autres inducteurs utilisés dans cette étude, que sans la présence d'inducteur. Ainsi, l'évidence selon laquelle l'ANP aurait stimulé la différenciation cellulaire vers le phénotype cardiaque a été confirmée par la présence de nombreuses mitochondries, caractérisée par la forte présence du marqueur mitochondrial spécifique Tom22, comparativement à ce qui a été observé dans les sphéroïdes non induits. En outre, la translocase de la membrane externe (TOM) est un complexe de protéines qui se trouvent exclusivement au niveau de la membrane mitochondriale externe de la mitochondrie. Sa fonction est de permettre le mouvement des protéines à travers cette barrière et dans l'espace

intermembranaire de la mitochondrie. Tom22 est ancrée à la membrane externe par un segment central transmembranaire. Ainsi Tom22 est une protéine conservée et spécifique de la mitochondrie et est utilisé comme marqueur mitochondrial.

En outre, nous avons identifié dans les cellules stimulées par l'ANP une plus grande proportion de cellules positives pour l'isoforme cardiaque de la troponine T, une protéine impliquée dans la contractilité faisant partie d'un complexe protéique, le complexe des troponines. Structurellement, ce complexe est associé à l'actine par l'intermédiaire d'une autre protéine, la tropomyosine, et est composé de 3 protéines : la troponine I (masse moléculaire de 25 kDa), la troponine C (de structure similaire dans le myocyte et le CM ; masse moléculaire de 18 kDa) et la troponine T (masse moléculaire de 37 kDa). Trois isoformes différents existent pour la troponine T, chaque isoforme étant spécifique d'un type de fibre [223]: un premier isoforme est spécifiquement exprimée dans les fibres lentes du muscle strié squelettique, un deuxième dans les fibres rapides du muscle strié squelettique et un troisième dans les fibres du muscle cardiaque. Sachant que la contractilité est un élément clé de la différenciation cardiaque, nous avons voulu identifier une autre protéine impliquée dans la contraction des cellules musculaires cardiaques. Pour cela, nous avons identifié un plus grand taux de cellules positives pour l'isoforme cardiaque ventriculaire de la chaîne légère de myosine (MLC-2v) dans les cellules induites par l'ANP que dans les cellules non induites. En effet, notre choix s'est porté vers la myosine car c'est une protéine qui joue un rôle fondamental dans les mécanismes de la contraction musculaire. C'est une protéine intracytoplasmique qui se rencontre donc dans les cellules à activité contractile des vertébrés, telles que les cellules musculaires. Elle est composée de deux chaînes lourdes associées à deux paires de chaînes légères. Il existe différents isoformes de chaînes lourdes et de chaînes légères. En ce qui concerne les chaînes légères, 5 isoformes majeurs ont été identifiés chez les mammifères. Parmi eux, on retrouve les MLC-1 $\alpha$  et MLC-1 $\beta$  aussi appelés MLC-1 lentes ventriculaires qui sont exprimés dans les muscles lents mais aussi respectivement dans les muscles lisses et les ventricules du muscle strié cardiaque. Pour compléter les résultats obtenus avec nos marqueurs de la contractilité, nous avons voulu mettre en évidence la présence de protéines impliquées dans la transmission de l'excitabilité, plus exactement les connexines (Cx).

Étant donné que le projet de recherche traite de la différenciation cardiaque, nous avons tenté d'identifier uniquement les Cx 40 et 43. De façon similaire aux observations précédentes, la proportion de cellules positives pour les Cx 40 et 43 était plus grande dans les cellules différenciées via l'ANP que celles sans inducteurs. De manière descriptive, le couplage électrique entre deux myocytes qui permet l'activation syncytiale de l'ensemble du myocarde auriculaire est assurée par les jonctions communicantes localisées au niveau des disques intercalaires. Ces jonctions sont constituées du regroupement de canaux jonctionnels, assemblage de connexons provenant de 2 cellules contiguës. Un connexon se compose de 6 Cx. La Cx 43 serait le principal déterminant de la conduction intercellulaire dans les ventricules et la Cx 40 serait le principal déterminant de la conduction dans les oreillettes, mais l'absence de ces deux Cx serait compensée par d'autres Cx cardiaques comme la Cx 45 [224-227].

#### **IV.4 COMBINAISON DE L'ANP ET DE L'OT DANS L'INDUCTION DE LA CARDIOMYOGÈNESE**

De façon intéressante, la combinaison de l'ANP et de l'OT n'a pas induit de colonies de cellules battantes suggérant un effet antagonisant. Étant donné que plusieurs types cellulaires sont capables de se contracter, nous avons, par immunofluorescence, identifié plusieurs marqueurs typiquement exprimés par les cardiomyocytes. Qui plus est, les cellules différenciées issues de la combinaison de l'ANP et de l'OT exprimaient moins la présence de tous ces marqueurs phénotypiques comparativement à l'OT et l'ANP mais la cardiomyogénèse était tout de même significativement augmentée comparé aux cellules non induites. Cet effet négatif sur la contractilité et cette induction partielle de la cardiomyogénèse suggèrent que les mécanismes impliquant la différenciation cardiaque médiée par l'OT antagonisent les mécanismes impliquant la différenciation cardiaque médiée par l'ANP et vis et versa. En effet, une étude a démontré que l'ANP avait une action inhibitrice sur la voie de signalisation des MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinase) par l'intermédiaire de son récepteur NPR-C [228]. Étant donné que le système OT/OTR médie ses effets sur la différenciation cardiaque par l'intermédiaire des voies de signalisation

impliquant les MAPKs, il serait possible que cette voie soit court-circuitée par les effets de l'ANP (voir section IV-6). Il est aussi connu que les MAPKs activent les facteurs de transcription cardiaque tels que GATA4, Nkx2.5 et MEF2c. De plus, une étude a démontré que l'inhibition ou l'absence du facteur de transcription cardiaque GATA4 dans les cellules P19 empêchait l'apparition de cellules musculaires cardiaques contractiles et interférait avec l'expression des marqueurs cardiaques [214]. Bien que ces évidences puissent expliquer pourquoi les cellules différenciées sous la stimulation d'OT+ANP peuvent exprimer les marqueurs cardiaques tels que Troponine T cardiaque et la chaîne légère de la myosine mais que celles-ci ne peuvent pas se contracter, cela reste encore de l'ordre de l'hypothèse. En outre, notre laboratoire est présentement le premier groupe à démontrer les effets de l'ANP sur la différenciation cardiaque dans un modèle de CSE de souris. Étant donné que les mécanismes impliqués dans la différenciation cardiaque ne sont pas encore clairement compris, d'autres expériences sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

#### **IV.5 IMPLICATION DE L'ANP DANS LA CARDIOMYOGÉNÈSE DES CELLULES SP P19**

Il avait déjà été démontré que la différenciation cardiaque était médiée par la voie de signalisation NO/GCs/GMPc et aussi que l'OT stimulait la différenciation cardiaque par l'intermédiaire du NO. Or personne n'a encore investigué la voie de signalisation impliquant le GCp dans la différenciation cardiaque. Soupçonnant un rôle clé du GCp dans la différenciation cardiaque médiée par l'action de l'ANP sur les récepteurs NPR-A ou NPR-B, nous avons décidé d'utiliser un antagoniste spécifique de la production du GMPc médiée par le GCp. Suite à cela, nous avons différencié les cellules SP P19 sous la stimulation de l'ANP, l'antagoniste du GCp A71915, l'OT notre contrôle positif, la combinaison de l'OT et l'antagoniste ainsi que l'ANP et l'antagoniste. À notre grande surprise, nous avons observé que l'antagoniste du GCp, A71915, stimulait aussi la différenciation des cellules SP P19 en cellules contractiles. De plus, comparativement à l'OT et à l'ANP qui ont induit que très peu de colonies de cellules battantes aux jours précoces de différenciation cardiaque, A71915 a induit une plus grande proportion de colonies de cellules battantes (voir vidéos des colonies

de cellules battantes en Annexes). De même, nous avons observé que la proportion de colonies de cellules battantes générées par les cellules SP P19 différenciées sous la stimulation de l'antagoniste A71915, la combinaison A71915+OT et la combinaison A71915+ANP, était beaucoup plus importante que dans les cellules SP P19 stimulées par l'OT ou l'ANP, à un stade précoce de différenciation cardiaque (jour 7). En effet, il semblerait que l'antagoniste A71915 ait provoqué une maturation plus prononcée des cellules cardiaques, puisque la proportion de colonies de cellules battantes retrouvée dans les cellules induites avec A71915 ainsi que ses combinaisons avec OT et ANP, correspondait à ce qu'on peut observer à un stade avancé de la différenciation cardiaque (stade de maturation des cardiomyocytes – jour 14). De façon intéressante, A71915 a aussi potentialisé les effets de l'ANP ainsi que de l'OT rendant encore meilleur leur potentiel de différenciation cellulaire. Afin de confirmer le phénotype des cellules obtenues, nous avons tenté comme précédemment d'utiliser certains marqueurs cardiaques. Ayant cet objectif en tête, nous avons observé une surexpression de GATA4 et NKx2.5 dans les cellules différenciées avec l'antagoniste seul ou en combinaison avec l'ANP ou l'OT. Étant donné que l'OT était un meilleur inducteur de la différenciation cardiaque que l'ANP, tout au long de nos expériences, nous avons focalisé le reste de nos efforts sur l'OT et l'A71915, afin de déterminer quel mécanisme cellulaire induit une plus grande cardiomyogenèse, dans le but de mettre au point l'inducteur ayant le plus grand potentiel de régénérer le cœur ischémique et lésé. Suite à cela, nous avons déterminé, par immunofluorescence, une plus grande présence de cellules positives pour la troponine T cardiaque lorsque les cellules étaient différenciées avec A71915 et la combinaison A71915+OT que lorsque les cellules n'étaient pas induites. Dans le but de confirmer l'effet antagonisant d'A71915 sur la production de GMPc par les cellules SP P19, nous avons procédé à un essai radioimmunologique. Pour cela, nous avons utilisé l'ANP comme contrôle positif de la production de GMPc par les cellules, l'antagoniste A71915 ainsi que la combinaison A71915+ANP. Dans cette expérience, bien que l'ANP ait stimulé fortement la production de GMPc, l'antagoniste n'a pas bloqué significativement ses effets même si on peut observer une tendance à 15 min de stimulation. Or de façon extraordinaire, l'antagoniste A71915 a stimulé la production du GMPc comparé aux cellules contrôles suggérant un effet partiel agoniste. Étant donné que le

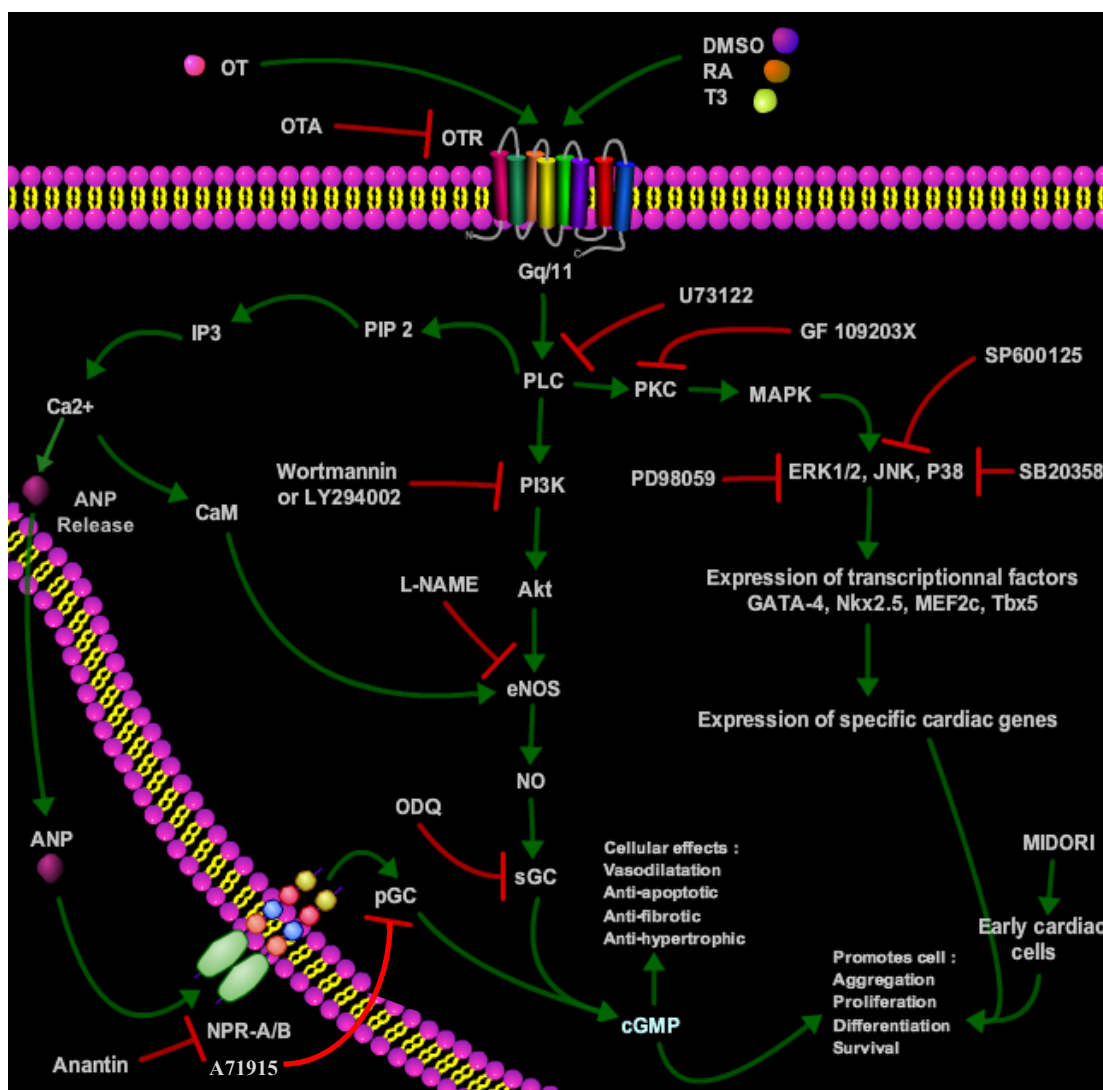
blocage de la voie OT/NO/GCs/GMPc via le L-NAME a presque bloqué totalement la différenciation cardiaque mais a tout de même stimulé l'apparition de faibles colonies de cellules battantes et que la combinaison de l'OT avec l'antagoniste A71915 a stimulé très fortement la cardiomyogenèse, il est possible de suggérer une implication importante de la voie GCp/GMPc dans la différenciation cardiaque. Il est possible de spéculer qu'il existerait un mécanisme cellulaire compensatoire provenant du NO/GCs/GMPc qui viendrait stimuler encore plus la cardiomyogenèse.

#### **IV.6 RÉSUMÉ DES MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LA DIFFÉRENCIATION CARDIAQUE :**

Il a été démontré que plusieurs facteurs de croissance et morphogènes sécrétés surtout par des cellules dérivées des autres feuilletts embryonnaires jouaient un rôle très important dans les mécanismes de la différenciation cardiaque. [155]. Par ailleurs, il a aussi été démontré que plusieurs molécules étaient capables d'induire la différenciation cellulaire vers le phénotype cardiaque. En effet, l'OT, une hormone hypothalamique impliquée dans la contraction des cellules musculaires lisses lors des contractions utérines et de la lactation, induit également la différenciation cardiaque et permet même une différenciation plus rapide, car les CM obtenus commencent à se contracter après 8 jours de différenciation au lieu de 12 [24]. De manière similaire, l'hormone thyroïdienne triiodothyronine (T3) est aussi capable de suppléer à l'effet du DMSO [229]. Effectivement, plusieurs études ont démontré que la différenciation cardiaque pouvait être induite dans les cellules P19 par l'agrégation cellulaire combinée avec l'ajout, dans le milieu de culture, de concentrations faibles de DMSO [24, 43-47], d'AR uniquement à certaines concentrations puisque celui-ci est majoritairement impliqué dans la différenciation neuronale [42, 48, 49] ou d'OT [24]. Qui plus est, il a été démontré que la mobilisation du calcium intracellulaire médiée par le récepteur OTR a été nécessaire pour réguler l'augmentation du NO dans les cellules endothéliales [165]. Danalache et al [28] ont constaté que le L-NAME et l'ODQ, des inhibiteurs de la voie de signalisation NO/GCs/GMPc, avaient initié de façon modeste la cardiomyogenèse dans les CECs de souris P19 et que l'inhibition de la voie de signalisation

NO/GCs/GMPc au cours de ce processus réduisait le rendement des CM. D'autres facteurs tels que les protéines morphogénétiques osseuses (BMPs) ont montré leur implication dans les mécanismes de différenciation cardiaque. En effet, en utilisant une lignée cellulaire P19CL6 surexprimant noggin, un antagoniste des BMPs, cette lignée était incapable de se différencier en CM [230]. Ces résultats ont démontré le rôle des BMPs dans l'induction cardiaque et ont mis en évidence l'implication de la voie de signalisation p38/Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) dans la cardiomyogenèse. Ce dernier fait a été confirmé par d'autres études [231, 232]. Il a aussi démontré que la cardiomyogenèse était également activée par le BMP-2 dans les P19CL6 via un mécanisme dépendant de la Phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3-kinase) [233]. En outre, Naito et al. [234] ont montré que l'inhibition de la PI-3-kinase par de la Wortmannin ou du LY294002 pouvait abolir la différenciation cardiaque. Plusieurs études effectuées avec des CECs ont montré que l'activation de la voie non-canonique par Wnt11 jouait aussi un rôle dans la cardiomyogenèse [235]. En effet, du milieu de culture conditionné avec Wnt11 peut déclencher la différenciation cardiaque en absence de DMSO. De plus, il a aussi été démontré que les MAPKs jouaient un rôle clé dans la différenciation cardiaque [236]. Ainsi, différentes lignées cellulaires ont été utilisées afin d'identifier de nouveaux régulateurs de la cardiomyogenèse, ainsi que leurs gènes cibles. Par exemple, un facteur de transcription précoce, nommé Myocytic Induction/Differentiation ORIGINATOR (MIDORI) fut identifié en utilisant la technique de « differential display » des ARNm [237]. Cette protéine est exprimée *in vivo* au jour 7,5 dans le mésoderme cardiaque de l'embryon de souris et la surexpression de MIDORI dans des cellules P19 augmente le nombre de cellules exprimant de la myosine. Des études plus fines de l'expression génique au moyen de « cDNA microarrays » sur les cellules P19CL6 ont confirmé une expression augmentée de plusieurs gènes connus pour leur rôle dans la différenciation cardiaque *in vivo*, comme eHAND, le facteur amplificateur spécifique des Myocytes-2C (MEF2C) et *mlc*, mais aussi montré des changements d'expression d'un grand nombre d'« Expressed Sequence Tags » ou ESTs dont la fonction reste à déterminer et qui pourraient donc être des régulateurs précoces de la cardiomyogenèse [238].





**Schéma 11 - Voies de signalisation potentiellement empruntées par le récepteur de l'OT (OTR) et par les récepteurs peptidiques natriurétiques NPR-A et NPR-B au cours du processus de différenciation cardiaque.**

AKT, serine/threonine protein kinase Akt; ANP, atrial natriuretic peptide; CaM, calmodulin; ERK, extracellular signal-regulated kinases; IP3, inositol 1,4,5-trisphosphate; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; PIP2, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C; PI3K, phosphatidyl-3 kinase; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; pGC, particulate guanylate cyclase; sGC, soluble guanylate cyclase; MIDORI, myocytic induction/differentiation originator; NO, nitric oxide; RA, retinoic acid; OT, oxytocin; OTR, oxytocin receptor; DMSO, dimethyl-sulfoxide; T3, triiodothyronine; MAPK, mitogen activated protein kinase.

## **CHAPITRE V : CONCLUSION**

- L'ANP stimule la différenciation des CECs de souris P19 en cardiomyocytes fonctionnels.
- L'antagoniste de la voie NPR-A-B/GCp/GMPc, A71915, stimule aussi la différenciation des CECs de souris P19 en CM fonctionnels.
- A71915 potentialise les effets cardiomyogéniques de l'ANP et de l'OT.

Cela suggère que l'effet thérapeutique des PN observé dans la défaillance cardiaque ainsi que les propriétés vasodilatatrices de certains antagonistes des NPRs incluent la stimulation de la différenciation des cellules souches en CM. Cela laisse donc à penser que les PN ou les antagonistes des NPRs pourraient être une alternative très intéressante dans la thérapie cellulaire visant à induire la régénération cardiovasculaire.

## **CHAPITRE VI : PERSPECTIVES**

Dans le but d'élucider les mécanismes impliquant la voie de signalisation NPR/GCp/GMPc sur la différenciation cardiaque, il serait intéressant :

- D'induire la différenciation des CEC de souris P19 avec l'antagoniste A71915 en présence de l'inhibiteur de la PDE-5 (Sildénafil), et/ou du eNOS (L-NAME) et/ou du GCs (ODQ) dans le but de dissocier la voie GMPc impliquée dans la cardiomyogénèse.
- D'utiliser des donneurs de NO (SNAP) en présence de l'antagoniste A71915 pour observer une possible potentialisation de la différenciation cardiaque.
- De mesurer par essais radioimmunologiques le GMPc intracellulaire et extracellulaire libéré par les cellules stimulées avec les antagonistes/inhibiteurs A71915, L-NAME, ODQ, sildénafil seuls ou en combinaison afin de déterminer quelle combinaison permet d'abolir totalement la production du GMPc. Une fois cela déterminé, il serait intéressant d'en établir la concentration optimale afin que cela induise le minimum d'effets cytotoxiques dans les cellules. Et enfin pour terminer, il serait intéressant de confirmer l'hypothèse selon laquelle

la production de GMPc médiée soit par le NO ou le récepteur NPR-A/B stimule la différenciation cardiaque. Pour se faire, on pourrait induire la différenciation cellulaire avec l'ajout de l'OT à la combinaison d'antagonistes abolissant totalement la production du GMPc et observer si la différenciation cardiaque est stimulée ou inhibée.

- De déterminer si les récepteurs de l'ANP, soit NPR-A/B, sont essentiels à la différenciation cardiaque, étant donné que l'OT stimule la libération d'ANP par le biais de son récepteur OTR. Pour cela, on pourrait utiliser des ARN interférents (siRNA) dirigés contre le NPR-A/B et observer suite à la stimulation des cellules avec l'OT si la différenciation cardiaque a lieu. Étant donné que l'A71915 potentialise les effets de l'OT alors on peut supposer que les NPRs jouent un rôle important dans les mécanismes de la différenciation cardiaque.

- Étant donné que l'OT est une hormone pléiotropique, et que l'antagoniste A71915, un antagoniste compétitif du GCp ayant déjà été utilisé chez l'humain dans le cadre de la régulation du tonus vasculaire [140] et des voies de signalisation impliquées dans la lipolyse [239], potentialise les effets de l'OT dans le contexte de la différenciation cellulaire ainsi que récemment dans la cardioprotection (résultats préliminaires observés dans les travaux récents de ma collègue Araceli Gonzalez-Reyes), il serait intéressant de traiter des animaux ayant subi des dommages ischémiques avec l'OT combinée à l'antagoniste A71915 afin de déterminer in vivo si les effets protecteurs, déjà observés, de l'OT dans le traitement de l'infarctus du myocarde peuvent être amplifiés lorsque combiné à l'antagoniste du GCp, A71915.

## ANNEXES :

Afin de prouver que mes cellules différenciées en cardiomyocytes sont bien fonctionnelles, je mets à votre disposition les vidéos des colonies de cellules battantes observées sous la stimulation des différents inducteurs utilisés dans ce travail (support CD/DVD).

## BIBLIOGRAPHIES :

1. Gutkowska, J. and M. Jankowski, *Oxytocin revisited: its role in cardiovascular regulation*. J Neuroendocrinol, 2012. **24**(4): p. 599-608.
2. Andersson, B. and S.M. McCann, *The effect of hypothalamic lesions on the water intake of the dog*. Acta Physiol Scand, 1956. **35**(3-4): p. 312-20.
3. Andersson, B., M. Jobin, and K. Olsson, *Stimulation of urinary salt excretion following injections of hypertonic NaCl-solution into the 3rd brain ventricle*. Acta Physiol Scand, 1966. **67**(1): p. 127-8.
4. de Bold, A.J., et al., *A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats*. Life Sci, 1981. **28**(1): p. 89-94.
5. de Wardener, H.E. and E.M. Clarkson, *Concept of natriuretic hormone*. Physiol Rev, 1985. **65**(3): p. 658-759.
6. Davis, J.O. and R.H. Freeman, *Mechanisms regulating renin release*. Physiol Rev, 1976. **56**(1): p. 1-56.
7. Cort JH, L.B., Pliska V, Barth T, Uhrin V, Rudinger J. In:Margoulies J,, *Protein and polypeptide hormones*. Amsterdam : Excerpta Medica, 1969. **939**.
8. Morris, M., S.M. McCann, and R. Orias, *Evidence for hormonal participation in the natriuretic and kaliuretic responses to intraventricular hypertonic saline and norepinephrine*. Proc Soc Exp Biol Med, 1976. **152**(1): p. 95-8.
9. Gauer, O.H. and J.P. Henry, *Circulatory basis of fluid volume control*. Physiol Rev, 1963. **43**: p. 423-81.
10. Palkovits, M., R.L. Eskay, and F.A. Antoni, *Atrial natriuretic peptide in the median eminence is of paraventricular nucleus origin*. Neuroendocrinology, 1987. **46**(6): p. 542-4.
11. Baldissera, S., et al., *Role of the hypothalamus in the control of atrial natriuretic peptide release*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(23): p. 9621-5.
12. Antunes-Rodrigues, J., et al., *Lesions of the hypothalamus and pituitary inhibit volume-expansion-induced release of atrial natriuretic peptide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(7): p. 2956-60.
13. Antunes-Rodrigues, J., et al., *Carotid-aortic and renal baroreceptors mediate the atrial natriuretic peptide release induced by blood volume expansion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(15): p. 6828-31.
14. Antunes-Rodrigues, J., et al., *Essential role of hypothalamic muscarinic and alpha-adrenergic receptors in atrial natriuretic peptide release induced by blood volume expansion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 10240-4.

15. Reis, L.C., et al., *Participation of the ascending serotonergic system in the stimulation of atrial natriuretic peptide release*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(25): p. 12022-6.
16. Haanwinckel, M.A., et al., *Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(17): p. 7902-6.
17. Soares, T.J., et al., *Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(1): p. 278-83.
18. Gutkowska, J., et al., *Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(21): p. 11704-9.
19. Jankowski, M., et al., *Rat heart: a site of oxytocin production and action*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(24): p. 14558-63.
20. Jankowski, M., et al., *Oxytocin and its receptors are synthesized in the rat vasculature*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 6207-11.
21. Favaretto, A.L., et al., *Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria in vitro that exerts negative inotropic and chronotropic action*. Peptides, 1997. **18**(9): p. 1377-81.
22. Du Vigneaud, V., *Trail of sulfur research: from insulin to oxytocin*. Science, 1956. **123**(3205): p. 967-74.
23. Ott, I. and J.C. Scott, *The Action of Glandular Extracts Upon the Contractions of the Uterus*. J Exp Med, 1909. **11**(2): p. 326-30.
24. Paquin, J., et al., *Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(14): p. 9550-5.
25. Gutkowska, J., et al., *Oxytocin is a cardiovascular hormone*. Braz J Med Biol Res, 2000. **33**(6): p. 625-33.
26. Gutkowska, J. and M. Jankowski, *Oxytocin revisited: It is also a cardiovascular hormone*. J Am Soc Hypertens, 2008. **2**(5): p. 318-25.
27. McCann, S.M., et al., *Oxytocin, vasopressin and atrial natriuretic peptide control body fluid homeostasis by action on their receptors in brain, cardiovascular system and kidney*. Prog Brain Res, 2002. **139**: p. 309-28.
28. Danalache, B.A., et al., *Nitric oxide signaling in oxytocin-mediated cardiomyogenesis*. Stem Cells, 2007. **25**(3): p. 679-88.
29. Gassanov, N., et al., *Functional activity of the carboxyl-terminally extended oxytocin precursor Peptide during cardiac differentiation of embryonic stem cells*. Stem Cells, 2008. **26**(1): p. 45-54.
30. Jankowski, M., et al., *Oxytocin in cardiac ontogeny*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(35): p. 13074-9.
31. Fathi, F., et al., *Cardiac differentiation of P19CL6 cells by oxytocin*. Int J Cardiol, 2009. **134**(1): p. 75-81.
32. Stefanidis, K., et al., *Embryoid bodies from mouse stem cells express oxytocin receptor, Oct-4 and DAZL*. Biosystems, 2009. **98**(2): p. 122-6.
33. Uchida, S., S. Fuke, and T. Tsukahara, *Upregulations of Gata4 and oxytocin receptor are important in cardiomyocyte differentiation processes of P19CL6 cells*. J Cell Biochem, 2007. **100**(3): p. 629-41.
34. Hatami, L., M.R. Valojerdi, and S.J. Mowla, *Effects of oxytocin on cardiomyocyte differentiation from mouse embryonic stem cells*. Int J Cardiol, 2007. **117**(1): p. 80-9.
35. Breton, C., et al., *Presence of functional oxytocin receptors in cultured human myoblasts*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(3): p. 1415-8.

36. Thompson, D.R., *Improving the organisation and delivery of cardiac rehabilitation*. Eur J Cardiovasc Nurs, 2003. **2**(4): p. 245-6.
37. Breton, C., D. Di Scala-Guenot, and H.H. Zingg, *Oxytocin receptor gene expression in rat mammary gland: structural characterization and regulation*. J Mol Endocrinol, 2001. **27**(2): p. 175-89.
38. Martin, G.R. and M.J. Evans, *Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(4): p. 1441-5.
39. McBurney, M.W. and B.J. Rogers, *Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns*. Dev Biol, 1982. **89**(2): p. 503-8.
40. van der Heyden, M.A. and L.H. Defize, *Twenty one years of P19 cells: what an embryonal carcinoma cell line taught us about cardiomyocyte differentiation*. Cardiovasc Res, 2003. **58**(2): p. 292-302.
41. McBurney, M.W., *P19 embryonal carcinoma cells*. Int J Dev Biol, 1993. **37**(1): p. 135-40.
42. Jones-Villeneuve, E.M., et al., *Retinoic acid-induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells*. Mol Cell Biol, 1983. **3**(12): p. 2271-9.
43. Edwards, M.K., J.F. Harris, and M.W. McBurney, *Induced muscle differentiation in an embryonal carcinoma cell line*. Mol Cell Biol, 1983. **3**(12): p. 2280-6.
44. McBurney, M.W., et al., *Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line*. Nature, 1982. **299**(5879): p. 165-7.
45. Smith, S.C., et al., *The role of aggregation in embryonal carcinoma cell differentiation*. J Cell Physiol, 1987. **131**(1): p. 74-84.
46. Rudnicki, M.A., et al., *Actin and myosin expression during development of cardiac muscle from cultured embryonal carcinoma cells*. Dev Biol, 1990. **138**(2): p. 348-58.
47. Sun, J.J., et al., *[Influence of cell-cell interaction upon differentiation of murine embryonal carcinoma cells]*. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 1987. **9**(1): p. 2-5.
48. Jones-Villeneuve, E.M., et al., *Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells*. J Cell Biol, 1982. **94**(2): p. 253-62.
49. Edwards, M.K. and M.W. McBurney, *The concentration of retinoic acid determines the differentiated cell types formed by a teratocarcinoma cell line*. Dev Biol, 1983. **98**(1): p. 187-91.
50. Gassanov, N., et al., *Arginine vasopressin-mediated cardiac differentiation: insights into the role of its receptors and nitric oxide signaling*. J Biol Chem, 2007. **282**(15): p. 11255-65.
51. Habara-Ohkubo, A., *Differentiation of beating cardiac muscle cells from a derivative of P19 embryonal carcinoma cells*. Cell Struct Funct, 1996. **21**(2): p. 101-10.
52. Maltsev, V.A., et al., *Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types*. Mech Dev, 1993. **44**(1): p. 41-50.
53. Skerjanc, I.S., et al., *Myocyte enhancer factor 2C and Nkx2-5 up-regulate each other's expression and initiate cardiomyogenesis in P19 cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(52): p. 34904-10.
54. Yamada, T. and Y. Nakajima, *Derivation and characterization of gut-like structures from embryonic stem cells*. Methods Mol Biol, 2006. **330**: p. 263-78.
55. Goodell, M.A., et al., *Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo*. J Exp Med, 1996. **183**(4): p. 1797-806.
56. Goodell, M.A., et al., *Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species*. Nat Med, 1997. **3**(12): p. 1337-45.

57. Asakura, A. and M.A. Rudnicki, *Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation*. Exp Hematol, 2002. **30**(11): p. 1339-45.
58. Montanaro, F., et al., *Skeletal muscle engraftment potential of adult mouse skin side population cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(16): p. 9336-41.
59. Zhou, S., et al., *The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype*. Nat Med, 2001. **7**(9): p. 1028-34.
60. Jackson, K.A., et al., *Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells*. J Clin Invest, 2001. **107**(11): p. 1395-402.
61. Hierlihy, A.M., et al., *The post-natal heart contains a myocardial stem cell population*. FEBS Lett, 2002. **530**(1-3): p. 239-43.
62. Martin, C.M., et al., *Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, Abcg2, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart*. Dev Biol, 2004. **265**(1): p. 262-75.
63. Pfister, O., et al., *CD31- but Not CD31+ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation*. Circ Res, 2005. **97**(1): p. 52-61.
64. Oyama, T., et al., *Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo*. J Cell Biol, 2007. **176**(3): p. 329-41.
65. Furusawa, T., et al., *Embryonic stem cells expressing both platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and stage-specific embryonic antigen-1 differentiate predominantly into epiblast cells in a chimeric embryo*. Biol Reprod, 2004. **70**(5): p. 1452-7.
66. Hayashi, K., et al., *Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(4): p. 391-401.
67. Uchida, N., et al., *Transplantable hematopoietic stem cells in human fetal liver have a CD34(+) side population (SP)phenotype*. J Clin Invest, 2001. **108**(7): p. 1071-7.
68. Welm, B.E., et al., *Sca-1(pos) cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population*. Dev Biol, 2002. **245**(1): p. 42-56.
69. Wulf, G.G., et al., *Cells of the hepatic side population contribute to liver regeneration and can be replenished with bone marrow stem cells*. Haematologica, 2003. **88**(4): p. 368-78.
70. Nadin, B.M., M.A. Goodell, and K.K. Hirschi, *Phenotype and hematopoietic potential of side population cells throughout embryonic development*. Blood, 2003. **102**(7): p. 2436-43.
71. Wulf, G.G., et al., *A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia*. Blood, 2001. **98**(4): p. 1166-73.
72. de Bold, A.J., *Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart*. Science, 1985. **230**(4727): p. 767-70.
73. de Bold, A.J., *Tissue fractionation studies on the relationship between an atrial natriuretic factor and specific atrial granules*. Can J Physiol Pharmacol, 1982. **60**(3): p. 324-30.
74. Flynn, T.G., M.L. de Bold, and A.J. de Bold, *The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties*. Biochem Biophys Res Commun, 1983. **117**(3): p. 859-65.
75. Nishikimi, T., N. Maeda, and H. Matsuoka, *The role of natriuretic peptides in cardioprotection*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(2): p. 318-28.
76. Nakao, K., *[Natriuretic peptide family]*. Nihon Naibunpi Gakkai Zasshi, 1992. **68**(3): p. 134-42.
77. Rosenzweig, A., et al., *Proximal regulatory domains of rat atrial natriuretic factor gene*. Circulation, 1991. **84**(3): p. 1256-65.

78. Vuolteenaho, O., O. Arjamaa, and N. Ling, *Atrial natriuretic polypeptides (ANP): rat atria store high molecular weight precursor but secrete processed peptides of 25-35 amino acids*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985. **129**(1): p. 82-8.
79. Dickey, D.M., A.R. Yoder, and L.R. Potter, *A familial mutation renders atrial natriuretic Peptide resistant to proteolytic degradation*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(29): p. 19196-202.
80. Yan, W., et al., *Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(15): p. 8525-9.
81. Wu, Q., et al., *Corin: new insights into the natriuretic peptide system*. *Kidney Int*, 2009. **75**(2): p. 142-6.
82. Misono, K.S., et al., *Rat atrial natriuretic factor: isolation, structure and biological activities of four major peptides*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984. **123**(2): p. 444-51.
83. Rosenzweig, A. and C.E. Seidman, *Atrial natriuretic factor and related peptide hormones*. *Annu Rev Biochem*, 1991. **60**: p. 229-55.
84. Garcia, R., et al., *Structure-activity relationships of atrial natriuretic factor (ANF). II. Effect of chain-length modifications on vascular reactivity*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985. **126**(1): p. 178-84.
85. De Lean, A., et al., *Structure-activity relationships of atrial natriuretic factor (ANF). III. Correlation of receptor affinity with relative potency on aldosterone production in zona glomerulosa cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985. **132**(1): p. 360-7.
86. Argentin, S., et al., *Developmental stage-specific regulation of atrial natriuretic factor gene transcription in cardiac cells*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(1): p. 777-90.
87. Cameron, V.A., et al., *Atrial (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) expression after myocardial infarction in sheep: ANP is synthesized by fibroblasts infiltrating the infarct*. *Endocrinology*, 2000. **141**(12): p. 4690-7.
88. Ogawa, T., et al., *Characterization of natriuretic peptide production by adult heart atria*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(6 Pt 2): p. H1977-86.
89. Ruskoaho, H., et al., *Regulation of ventricular atrial natriuretic peptide release in hypertrophied rat myocardium. Effects of exercise*. *Circulation*, 1989. **80**(2): p. 390-400.
90. Iida, H. and Y. Shibata, *Phasic secretion of newly synthesized atrial natriuretic factor from unstimulated atrial myocytes in culture*. *Circ Res*, 1994. **74**(4): p. 659-68.
91. Ruskoaho, H., H. Tholken, and R.E. Lang, *Increase in atrial pressure releases atrial natriuretic peptide from isolated perfused rat hearts*. *Pflugers Arch*, 1986. **407**(2): p. 170-4.
92. Lang, R.E., et al., *Atrial natriuretic factor--a circulating hormone stimulated by volume loading*. *Nature*, 1985. **314**(6008): p. 264-6.
93. Edwards, B.S., et al., *Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor*. *Circ Res*, 1988. **62**(2): p. 191-5.
94. Ogawa, T., et al., *Evidence for load-dependent and load-independent determinants of cardiac natriuretic peptide production*. *Circulation*, 1996. **93**(11): p. 2059-67.
95. Stasch, J.P., et al., *Endothelin stimulates release of atrial natriuretic peptides in vitro and in vivo*. *Life Sci*, 1989. **45**(10): p. 869-75.
96. Soualmia, H., et al., *Angiotensin II-induced phosphoinositide production and atrial natriuretic peptide release in rat atrial tissue*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1997. **29**(5): p. 605-11.
97. Lachance, D., et al., *Mechanisms of release of atrial natriuretic factor. I. Effect of several agonists and steroids on its release by atrial minces*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986. **135**(3): p. 1090-8.



98. Ruskoaho, H., *Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism*. Pharmacol Rev, 1992. **44**(4): p. 479-602.
99. Suo, M., *THE ROLE AND MECHANISMS OF ANGIOTENSIN II IN REGULATING THE NATRIURETIC PEPTIDE GENE EXPRESSION IN RESPONSE TO CARDIAC OVERLOAD*, in *Department of Pharmacology and Toxicology* 2002, University of Oulu: Oulu.
100. Nakao, K., et al., *Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I: Natriuretic peptides*. J Hypertens, 1992. **10**(9): p. 907-12.
101. von Haehling, S., et al., *Comparison of Midregional Pro-Atrial Natriuretic Peptide With N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide in Predicting Survival in Patients With Chronic Heart Failure*. Journal of the American College of Cardiology, 2007. **50**(20): p. 1973-1980.
102. Xu-Cai, Y.O. and Q. Wu, *Molecular forms of natriuretic peptides in heart failure and their implications*. Heart, 2010. **96**(6): p. 419-24.
103. Koller, K.J., et al., *Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP)*. Science, 1991. **252**(5002): p. 120-3.
104. Hamet, P., et al., *Effect of native and synthetic atrial natriuretic factor on cyclic GMP*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **123**(2): p. 515-27.
105. Hamet P, T.J., Thibault G, Garcia R, Cantin M, Genest J, *Effect of atrial natriuretic factor on metabolism of cGMP*. Endocrinology, 1983. **112**(289).
106. Waldman, S.A., R.M. Rapoport, and F. Murad, *Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues*. J Biol Chem, 1984. **259**(23): p. 14332-4.
107. Winquist, R.J., et al., *Atrial natriuretic factor elicits an endothelium-independent relaxation and activates particulate guanylate cyclase in vascular smooth muscle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(23): p. 7661-4.
108. Tremblay, J., et al., *The increase of cGMP by atrial natriuretic factor correlates with the distribution of particulate guanylate cyclase*. FEBS Lett, 1985. **181**(1): p. 17-22.
109. Liang, F., et al., *Evidence for functional heterogeneity of circulating B-type natriuretic peptide*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(10): p. 1071-8.
110. Cameron, V.A., et al., *The sites of gene expression of atrial, brain, and C-type natriuretic peptides in mouse fetal development: temporal changes in embryos and placenta*. Endocrinology, 1996. **137**(3): p. 817-24.
111. Zeller, R., et al., *Localized expression of the atrial natriuretic factor gene during cardiac embryogenesis*. Genes Dev, 1987. **1**(7): p. 693-8.
112. Wei, Y.F., et al., *Developmental changes in the rat atriopeptin hormonal system*. J Clin Invest, 1987. **79**(5): p. 1325-9.
113. Johnson, D.D., T.A. Tetzke, and C.Y. Cheung, *Gene expression of atrial natriuretic factor in ovine fetal heart during development*. J Soc Gynecol Investig, 1994. **1**(1): p. 14-8.
114. Takahashi, T., P.D. Allen, and S. Izumo, *Expression of A-, B-, and C-type natriuretic peptide genes in failing and developing human ventricles. Correlation with expression of the Ca(2+)-ATPase gene*. Circ Res, 1992. **71**(1): p. 9-17.
115. Gardner, D.G., et al., *Expression of the atrial natriuretic peptide gene in human fetal heart*. J Clin Endocrinol Metab, 1989. **69**(4): p. 729-37.
116. Hersey, R.M., et al., *Atrial natriuretic peptide in heart and specific binding in organs from fetal and newborn rats*. Cell Biochem Funct, 1989. **7**(1): p. 35-41.
117. Scott, J.N. and L. Jennes, *Distribution of atrial natriuretic factor in fetal rat atria and ventricles*. Cell Tissue Res, 1987. **248**(2): p. 479-81.

118. Irons, C.E., C.A. Sei, and C.C. Glembotski, *Regulated secretion of atrial natriuretic factor from cultured ventricular myocytes*. Am J Physiol, 1993. **264**(1 Pt 2): p. H282-5.
119. Day, M.L., et al., *Ventricular atriopeptin. Unmasking of messenger RNA and peptide synthesis by hypertrophy or dexamethasone*. Hypertension, 1987. **9**(5): p. 485-91.
120. Swynghedauw, B., *Myocardial remodelling: pharmacological targets*. Expert Opin Investig Drugs, 2002. **11**(5): p. 661-74.
121. Luchner, A., et al., *Differential atrial and ventricular expression of myocardial BNP during evolution of heart failure*. Am J Physiol, 1998. **274**(5 Pt 2): p. H1684-9.
122. Perrella, M.A., et al., *Cardiac atrial natriuretic factor during evolution of congestive heart failure*. Am J Physiol, 1992. **262**(4 Pt 2): p. H1248-55.
123. Kawakami, H., et al., *Alteration of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide gene expression associated with progression and regression of cardiac hypertrophy in renovascular hypertensive rats*. Clin Sci (Lond), 1996. **90**(3): p. 197-204.
124. Hosoda, K., et al., *Expression of brain natriuretic peptide gene in human heart. Production in the ventricle*. Hypertension, 1991. **17**(6 Pt 2): p. 1152-5.
125. Saito, Y., et al., *Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricle of human failing heart*. J Clin Invest, 1989. **83**(1): p. 298-305.
126. Davidson, D., et al., *The mouse atlas and graphical gene-expression database*. Semin Cell Dev Biol, 1997. **8**(5): p. 509-17.
127. Baxter, G.F., *The natriuretic peptides*. Basic Res Cardiol, 2004. **99**(2): p. 71-5.
128. Tremblay, J., et al., *Biochemistry and physiology of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases*. Mol Cell Biochem, 2002. **230**(1-2): p. 31-47.
129. Garbers, D.L., et al., *Membrane guanylyl cyclase receptors: an update*. Trends Endocrinol Metab, 2006. **17**(6): p. 251-8.
130. Kuhn, M., et al., *The natriuretic peptide/guanylyl cyclase--a system functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(7): p. 2019-30.
131. Wilcox, J.N., et al., *Differential regional expression of three natriuretic peptide receptor genes within primate tissues*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(7): p. 3454-62.
132. Potter, L.R., S. Abbey-Hosch, and D.M. Dickey, *Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions*. Endocr Rev, 2006. **27**(1): p. 47-72.
133. Parat, M., *Mécanismes moléculaires d'activation du récepteur A des peptides natriurétiques in Département de Pharmacologie*2009, Université de Montréal: Montréal.
134. Poirier, H., et al., *Allotopic antagonism of the non-peptide atrial natriuretic peptide (ANP) antagonist HS-142-1 on natriuretic peptide receptor NPR-A*. Biochem J, 2002. **362**(Pt 1): p. 231-7.
135. Morishita, Y., et al., *Microbial polysaccharide, HS-142-1, competitively and selectively inhibits ANP binding to its guanylyl cyclase-containing receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **176**(3): p. 949-57.
136. Weber, W., et al., *Anantin--a peptide antagonist of the atrial natriuretic factor (ANF). I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity*. J Antibiot (Tokyo), 1991. **44**(2): p. 164-71.
137. Delporte, C., et al., *Discovery of a potent atrial natriuretic peptide antagonist for ANPA receptors in the human neuroblastoma NB-OK-1 cell line*. Eur J Pharmacol, 1992. **224**(2-3): p. 183-8.

138. von Geldern, T.W., et al., *Atrial natriuretic peptide antagonists: biological evaluation and structural correlations*. Mol Pharmacol, 1990. **38**(6): p. 771-8.
139. Brunner, F. and G. Wolkart, *Endothelial NO/cGMP system contributes to natriuretic peptide-mediated coronary and peripheral vasodilation*. Microvasc Res, 2001. **61**(1): p. 102-10.
140. Schmitt, M., et al., *Atrial natriuretic peptide regulates regional vascular volume and venous tone in humans*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(10): p. 1833-8.
141. Beckman, J.S. and W.H. Koppenol, *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly*. Am J Physiol, 1996. **271**(5 Pt 1): p. C1424-37.
142. Bryan, N.S., K. Bian, and F. Murad, *Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development*. Front Biosci, 2009. **14**: p. 1-18.
143. Murad, F., *Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development*. N Engl J Med, 2006. **355**(19): p. 2003-11.
144. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharmacol Rev, 1991. **43**(2): p. 109-42.
145. Xia, H. and D.S. Bredt, *Cloned and expressed nitric oxide synthase proteins*. Methods Enzymol, 1996. **268**: p. 427-36.
146. White, K.A. and M.A. Marletta, *Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein*. Biochemistry, 1992. **31**(29): p. 6627-31.
147. Abu-Soud, H.M. and D.J. Stuehr, *Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(22): p. 10769-72.
148. Liu, Q. and S.S. Gross, *Binding sites of nitric oxide synthases*. Methods Enzymol, 1996. **268**: p. 311-24.
149. Tranguch, S. and Y. Huet-Hudson, *Decreased viability of nitric oxide synthase double knockout mice*. Mol Reprod Dev, 2003. **65**(2): p. 175-9.
150. Lee, T.C., et al., *Abnormal aortic valve development in mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. Circulation, 2000. **101**(20): p. 2345-8.
151. Feng, Q., et al., *Development of heart failure and congenital septal defects in mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. Circulation, 2002. **106**(7): p. 873-9.
152. Tsutsui, M., et al., *Development of genetically engineered mice lacking all three nitric oxide synthases*. J Pharmacol Sci, 2006. **102**(2): p. 147-54.
153. Krumenacker, J.S., et al., *Differential expression of genes involved in cGMP-dependent nitric oxide signaling in murine embryonic stem (ES) cells and ES cell-derived cardiomyocytes*. Nitric Oxide, 2006. **14**(1): p. 1-11.
154. Mujoo, K., et al., *Differential expression of nitric oxide signaling components in undifferentiated and differentiated human embryonic stem cells*. Stem Cells Dev, 2006. **15**(6): p. 779-87.
155. Mujoo, K., et al., *Role of nitric oxide signaling components in differentiation of embryonic stem cells into myocardial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(48): p. 18924-9.
156. Sharin, V.G., et al., *Nitric oxide receptor soluble guanylyl cyclase undergoes splicing regulation in differentiating human embryonic cells*. Stem Cells Dev, 2011. **20**(7): p. 1287-93.
157. Madhusoodanan, K.S. and F. Murad, *NO-cGMP signaling and regenerative medicine involving stem cells*. Neurochem Res, 2007. **32**(4-5): p. 681-94.
158. Shami, P.J. and J.B. Weinberg, *Differential effects of nitric oxide on erythroid and myeloid colony growth from CD34+ human bone marrow cells*. Blood, 1996. **87**(3): p. 977-82.

159. Boyum, A., et al., *Specific antibodies to mouse Sca-1- (Ly-6A/E) or Thy-1-positive haematopoietic progenitor cells induce formation of nitric oxide which inhibits subsequent colony formation.* Eur J Haematol, 2004. **73**(6): p. 427-30.
160. Michurina, T., et al., *Nitric oxide is a regulator of hematopoietic stem cell activity.* Mol Ther, 2004. **10**(2): p. 241-8.
161. Aicher, A., et al., *Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells.* Nat Med, 2003. **9**(11): p. 1370-6.
162. Guthrie, S.M., et al., *The nitric oxide pathway modulates hemangioblast activity of adult hematopoietic stem cells.* Blood, 2005. **105**(5): p. 1916-22.
163. Bloch, W., et al., *Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis.* Cardiovasc Res, 1999. **43**(3): p. 675-84.
164. Kanno, S., et al., *Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(33): p. 12277-81.
165. Thibonnier, M., et al., *Human vascular endothelial cells express oxytocin receptors.* Endocrinology, 1999. **140**(3): p. 1301-9.
166. Berg, R.W. and M.W. McBurney, *Cell density and cell cycle effects on retinoic acid-induced embryonal carcinoma cell differentiation.* Dev Biol, 1990. **138**(1): p. 123-35.
167. Wedel, B.J. and D.L. Garbers, *Guanylyl cyclases: approaching year thirty.* Trends Endocrinol Metab, 1998. **9**(6): p. 213-9.
168. Chinkers, M., et al., *A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor.* Nature, 1989. **338**(6210): p. 78-83.
169. Drewett, J.G. and D.L. Garbers, *The family of guanylyl cyclase receptors and their ligands.* Endocr Rev, 1994. **15**(2): p. 135-62.
170. Gerbes, A.L., et al., *The guanylate cyclase-coupled natriuretic peptide receptor: a new target for prevention of cold ischemia-reperfusion damage of the rat liver.* Hepatology, 1998. **28**(5): p. 1309-17.
171. Chen, H.H. and J.C. Burnett, Jr., *C-type natriuretic peptide: the endothelial component of the natriuretic peptide system.* J Cardiovasc Pharmacol, 1998. **32 Suppl 3**: p. S22-8.
172. O'Dorisio, M.S., et al., *Characterization of cyclic nucleotide metabolism during human monocyte differentiation.* J Leukoc Biol, 1984. **35**(6): p. 617-30.
173. Drewett, J.G., et al., *Natriuretic peptide receptor-B (guanylyl cyclase-B) mediates C-type natriuretic peptide relaxation of precontracted rat aorta.* J Biol Chem, 1995. **270**(9): p. 4668-74.
174. Bakre, M.M., Y. Ghanekar, and S.S. Visweswariah, *Homologous desensitization of the human guanylate cyclase C receptor. Cell-specific regulation of catalytic activity.* Eur J Biochem, 2000. **267**(1): p. 179-87.
175. Khare, S., et al., *Guanylin activates rat colonic particulate guanylate cyclase.* Biochem Biophys Res Commun, 1994. **203**(3): p. 1432-7.
176. Krause, G., et al., *Transcripts encoding three types of guanylyl-cyclase-coupled transmembrane receptors in inner ear tissues of guinea pigs.* Hear Res, 1997. **110**(1-2): p. 95-106.
177. Schulz, S., et al., *Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor.* Cell, 1990. **63**(5): p. 941-8.
178. Fulle, H.J., et al., *A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(8): p. 3571-5.
179. Goraczniak, R.M., et al., *Structural and functional characterization of the rod outer segment membrane guanylate cyclase.* Biochem J, 1994. **302 ( Pt 2)**: p. 455-61.

180. Koutalos, Y., et al., *Characterization of guanylate cyclase activity in single retinal rod outer segments*. J Gen Physiol, 1995. **106**(5): p. 863-90.
181. Lowe, D.G., et al., *Cloning and expression of a second photoreceptor-specific membrane retina guanylyl cyclase (RetGC), RetGC-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5535-9.
182. Shyjan, A.W., et al., *Molecular cloning of a retina-specific membrane guanylyl cyclase*. Neuron, 1992. **9**(4): p. 727-37.
183. Yang, R.B., et al., *Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(2): p. 602-6.
184. Yang, R.B. and D.L. Garbers, *Two eye guanylyl cyclases are expressed in the same photoreceptor cells and form homomers in preference to heteromers*. J Biol Chem, 1997. **272**(21): p. 13738-42.
185. Goraczniak, R., T. Duda, and R.K. Sharma, *Structural and functional characterization of a second subfamily member of the calcium-modulated bovine rod outer segment membrane guanylate cyclase, ROS-GC2*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **234**(3): p. 666-70.
186. Venkataraman, V., T. Duda, and R.K. Sharma, *The alpha(2D/A)-adrenergic receptor-linked membrane guanylate cyclase: a new signal transduction system in the pineal gland*. FEBS Lett, 1998. **427**(1): p. 69-73.
187. Venkataraman, V., et al., *Rod outer segment membrane guanylate cyclase type 1-linked stimulatory and inhibitory calcium signaling systems in the pineal gland: biochemical, molecular, and immunohistochemical evidence*. Biochemistry, 2000. **39**(20): p. 6042-52.
188. Semple-Rowland, S.L., et al., *Characterization of the chicken GCAP gene array and analyses of GCAP1, GCAP2, and GC1 gene expression in normal and rd chicken pineal*. Mol Vis, 1999. **5**: p. 14.
189. Schulz, S., et al., *The cloning and expression of a new guanylyl cyclase orphan receptor*. J Biol Chem, 1998. **273**(2): p. 1032-7.
190. Hobbs, A.J., *Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling*. Trends Pharmacol Sci, 1997. **18**(12): p. 484-91.
191. Hussain, M.B., A.J. Hobbs, and R.J. MacAllister, *Autoregulation of nitric oxide-soluble guanylate cyclase-cyclic GMP signalling in mouse thoracic aorta*. Br J Pharmacol, 1999. **128**(5): p. 1082-8.
192. Gyurko, R., et al., *Modulation of mouse cardiac function in vivo by eNOS and ANP*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(3): p. H971-81.
193. Hussain, M.B., R.J. MacAllister, and A.J. Hobbs, *Reciprocal regulation of cGMP-mediated vasorelaxation by soluble and particulate guanylate cyclases*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(3): p. H1151-9.
194. Madhani, M., et al., *Vascular natriuretic peptide receptor-linked particulate guanylate cyclases are modulated by nitric oxide-cyclic GMP signalling*. Br J Pharmacol, 2003. **139**(7): p. 1289-96.
195. Rudnicki, M.A., McBurney M. W., *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach*. IRL Press ed, ed. E.J. Robertson 1987, Oxford.
196. Sodek, K.L., M.J. Ringuette, and T.J. Brown, *Compact spheroid formation by ovarian cancer cells is associated with contractile behavior and an invasive phenotype*. Int J Cancer, 2009. **124**(9): p. 2060-70.
197. Scholer, H.R., et al., *New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4*. Nature, 1990. **344**(6265): p. 435-9.

198. Nichols, J., et al., *Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4*. Cell, 1998. **95**(3): p. 379-91.
199. Zuccotti, M., et al., *Oct-4 regulates the expression of Stella and Foxj2 at the Nanog locus: implications for the developmental competence of mouse oocytes*. Hum Reprod, 2009. **24**(9): p. 2225-37.
200. Zuccotti, M., et al., *Role of Oct-4 during acquisition of developmental competence in mouse oocyte*. Reprod Biomed Online, 2009. **19 Suppl 3**: p. 57-62.
201. Kellner, S. and N. Kikyo, *Transcriptional regulation of the Oct4 gene, a master gene for pluripotency*. Histol Histopathol, 2010. **25**(3): p. 405-12.
202. Solter, D. and B.B. Knowles, *Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(11): p. 5565-9.
203. Knowles, B.B., D.P. Aden, and D. Solter, *Monoclonal antibody detecting a stage-specific embryonic antigen (SSEA-1) on preimplantation mouse embryos and teratocarcinoma cells*. Curr Top Microbiol Immunol, 1978. **81**: p. 51-3.
204. Thomson, J.A. and V.S. Marshall, *Primate embryonic stem cells*. Curr Top Dev Biol, 1998. **38**: p. 133-65.
205. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
206. Patient, R.K. and J.D. McGhee, *The GATA family (vertebrates and invertebrates)*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(4): p. 416-22.
207. Ohneda, K. and M. Yamamoto, *Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage*. Acta Haematol, 2002. **108**(4): p. 237-45.
208. Cantor, A.B. and S.H. Orkin, *Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners*. Oncogene, 2002. **21**(21): p. 3368-76.
209. Rothenberg, E.V., *T-lineage specification and commitment: a gene regulation perspective*. Semin Immunol, 2002. **14**(6): p. 431-40.
210. Arceci, R.J., et al., *Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(4): p. 2235-46.
211. Laverriere, A.C., et al., *GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut*. J Biol Chem, 1994. **269**(37): p. 23177-84.
212. Morrisey, E.E., et al., *GATA-5: a transcriptional activator expressed in a novel temporally and spatially-restricted pattern during embryonic development*. Dev Biol, 1997. **183**(1): p. 21-36.
213. Heikinheimo, M., J.M. Scandrett, and D.B. Wilson, *Localization of transcription factor GATA-4 to regions of the mouse embryo involved in cardiac development*. Dev Biol, 1994. **164**(2): p. 361-73.
214. Grepin, C., et al., *Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks in vitro cardiac muscle differentiation*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(8): p. 4095-102.
215. Grepin, C., G. Nemer, and M. Nemer, *Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor*. Development, 1997. **124**(12): p. 2387-95.
216. Narita, N., M. Bielinska, and D.B. Wilson, *Cardiomyocyte differentiation by GATA-4-deficient embryonic stem cells*. Development, 1997. **124**(19): p. 3755-64.

217. Narita, N., M. Bielinska, and D.B. Wilson, *Wild-type endoderm abrogates the ventral developmental defects associated with GATA-4 deficiency in the mouse*. Dev Biol, 1997. **189**(2): p. 270-4.
218. Soudais, C., et al., *Targeted mutagenesis of the transcription factor GATA-4 gene in mouse embryonic stem cells disrupts visceral endoderm differentiation in vitro*. Development, 1995. **121**(11): p. 3877-88.
219. Kuo, C.T., et al., *GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation*. Genes Dev, 1997. **11**(8): p. 1048-60.
220. Molkenstin, J.D., et al., *Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis*. Genes Dev, 1997. **11**(8): p. 1061-72.
221. Akazawa, H. and I. Komuro, *Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: Its role in cardiac development and diseases*. Pharmacol Ther, 2005. **107**(2): p. 252-68.
222. Harvey, R.P., *NK-2 homeobox genes and heart development*. Dev Biol, 1996. **178**(2): p. 203-16.
223. Apple, F.S., *Tissue specificity of cardiac troponin I, cardiac troponin T and creatine kinase-MB*. Clin Chim Acta, 1999. **284**(2): p. 151-9.
224. Thomas, S.A., R.B. Schuessler, and J.E. Saffitz, *Connexins, conduction, and atrial fibrillation*. J Cardiovasc Electrophysiol, 1998. **9**(6): p. 608-11.
225. Thomas, S.A., et al., *Disparate effects of deficient expression of connexin43 on atrial and ventricular conduction: evidence for chamber-specific molecular determinants of conduction*. Circulation, 1998. **97**(7): p. 686-91.
226. Simon, A.M. and D.A. Goodenough, *Diverse functions of vertebrate gap junctions*. Trends Cell Biol, 1998. **8**(12): p. 477-83.
227. Simon, A.M., D.A. Goodenough, and D.L. Paul, *Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block*. Curr Biol, 1998. **8**(5): p. 295-8.
228. Prins, B.A., et al., *Atrial natriuretic peptide inhibits mitogen-activated protein kinase through the clearance receptor. Potential role in the inhibition of astrocyte proliferation*. J Biol Chem, 1996. **271**(24): p. 14156-62.
229. Rodriguez, E.R., et al., *Cardiac myocyte differentiation induced by 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T3) in P19 teratocarcinoma cells is accompanied by preferential binding of RGG(T/A)CA direct repeats spaced by 4 base pairs in the DNA*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **205**(3): p. 1899-906.
230. Monzen, K., et al., *Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): p. 7096-105.
231. Davidson, S.M. and M. Morange, *Hsp25 and the p38 MAPK pathway are involved in differentiation of cardiomyocytes*. Dev Biol, 2000. **218**(2): p. 146-60.
232. Eriksson, M. and S. Leppa, *Mitogen-activated protein kinases and activator protein 1 are required for proliferation and cardiomyocyte differentiation of P19 embryonal carcinoma cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(18): p. 15992-6001.
233. Ghosh-Choudhury, N., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase regulates bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)-induced myocyte enhancer factor 2A-dependent transcription of BMP-2 gene in cardiomyocyte precursor cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(24): p. 21998-2005.

234. Naito, A.T., et al., *Early stage-specific inhibitions of cardiomyocyte differentiation and expression of Csx/Nkx-2.5 and GATA-4 by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002.* Exp Cell Res, 2003. **291**(1): p. 56-69.
235. Pandur, P., et al., *Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis.* Nature, 2002. **418**(6898): p. 636-41.
236. Chen, M., et al., *Mitogen-activated protein kinase in endothelin-1-induced cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells.* J Cell Biochem, 2010. **111**(6): p. 1619-28.
237. Hosoda, T., et al., *A novel myocyte-specific gene Midori promotes the differentiation of P19CL6 cells into cardiomyocytes.* J Biol Chem, 2001. **276**(38): p. 35978-89.
238. Peng, C.F., et al., *Microarray analysis of global changes in gene expression during cardiac myocyte differentiation.* Physiol Genomics, 2002. **9**(3): p. 145-55.
239. Moro, C., et al., *Functional and pharmacological characterization of the natriuretic peptide-dependent lipolytic pathway in human fat cells.* J Pharmacol Exp Ther, 2004. **308**(3): p. 984-92.



