

L004

NEW INSIGHTS INTO THE MECHANISMS OF THE CARDIAC ELECTROPHYSIOLOGICAL CHANGES WITH AGING IN MICE

P. NAUD¹, A. COURBOULIN¹, J. MORISSARD¹, Y. FRELIN¹, S. DEMOLOMBE¹

¹ *Inserm UMR915-L'institut du thorax, Nantes, France*

Introduction – Age is the single biggest risk factor for the developing heart failure and other cardiac problems. With a large increase in the elderly population across Europe, and an associated large increase in elderly patients with chronic cardiac problems, the need to develop our understanding of the ageing process is more pressing than ever. By examining the ageing effect on the ion channel (IC) and transcriptional regulators (TR) expression of the heart, we gleaned novel information regarding the signalling potentially responsible for generating the electrophysiological remodelling with age.

Methods – By using a high-throughput quantitative approach, we investigated at a genome-scale the expression of 78 genes encoding IC, transporter subunits and Ca²⁺-homeostasis molecules in ventricles from embryonic days E15.5, E18.5 and postnatal day 1, day 7, day 20 and adult C57BL6 mice. We have also mapped 158 TR transcripts in the same samples, combined with bioinformatic predictions of sites recognized by the TR and their targets.

Results – Among transcripts involved in electrical signalling and Ca²⁺-homeostasis, 26/78 exhibited up-regulated expression, while 24 showed down-regulated expression. Using one-way hierarchical clustering analysis, we identified the TRs similarly up- and down-regulated than the ion channel genes. We hypothesized that those clustered IC and TR genes are co-regulated and that they share cis-regulatory elements. By *in silico* investigations, we predicted over-representation of: 1/ *Essrα* on *Nav1.5*, *Kv2.1*, *HCN2*, *RYR2*, *KChIP2* and *Cavα2δ1* promoters; 2/ *GATA5* and *GATA6* on *Cav3.2*, *Cav1.3*, *Cavα2δ2*, *NCX1*, *RIP3-2*, *Nedd4-2*, *Cx40* and *Cx45* promoters, suggesting that these TRs are involved in the expression of these key ion channel for the cardiac electrical activity. These results were strengthened by inter-species conservation.

Conclusions – Our results provide novel molecular correlates in the ageing heart. The biological validations of these data will give significant potential implications for understanding the mechanisms underlying the foetal program gene re-expression in cardiac diseases.

L005

IDENTIFICATION OF GENES INVOLVED IN AORTIC ELASTIC ANOMALIES IN THE RAT

M. OSBORNE-PELLEGRIN¹, S. FALAK², H. SCHULZ², N. HUBNER²

¹ *Inserm U698, Hôpital Bichat, Paris 18, France*

² *Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin 13125, Germany*

The inbred Brown Norway (BN) rat presents several rare arterial phenotypes, including an aortic elastin deficit, a high incidence of PDA and the spontaneous formation of ruptures in the internal elastic lamina (RIEL) of the abdominal aorta (AA) and iliac arteries. Our previously performed genetic linkage study, using microsatellite markers, showed that these 3 arterial phenotypes do not correlate in the backcross population and so are independent, and are controlled by distinct genetic loci (Kota et al. *Physiol.*

Genomics, 2007). The RIEL phenotype is of particular interest as it probably reflects a structural anomaly of the elastic network of the AA and the contiguous common iliac arteries. Since the human AA is highly susceptible to pathological alterations with aging, i.e. atherosclerosis and aneurysm formation, for reasons not entirely understood, the discovery of a gene influencing AA elastic network structure would be of interest. In the BN rat, RIEL is strongly linked to a locus on chromosome 5 (peak LOD score 27.4) but in this locus candidate genes are sparse and sequencing them gave negative results. We thus produced congenic rats, introgressing the chrom5 segment containing the RIEL locus from BN rats on a LOU (control) genetic background. These rats express the phenotype sufficiently (30% of parental BN values) to permit further studies on recombinant offspring to try and locate the gene(s) responsible. We have analysed genotype-phenotype correlations in a large cohort of recombinants, obtained by crossing the congenic rat LOU.BN.D5Rat59-D5Rat131 with parental LOU and subsequent intercrossing, in order to further define the position of the gene(s) responsible. We also performed high-density SNP mapping on chosen, informative recombinants, using >5000 SNPs discriminative between BN and LOU, and demonstrated the purity of the LOU genetic background (>99.9% outside the chr.5 congenic region). Further generations of recombinants produced from informative genitors and use of SNP genotyping in the congenic region has enabled us to locate the gene(s) responsible for a moderate RIEL phenotype in the first 6Mb region of chrom5. However, BN homozygosity down to 35 Mb causes increased severity of the phenotype.

L006

ROLE OF SERUM RESPONSE FACTOR (SRF) ON MICRORNA EXPRESSION IN THE CARDIOVASCULAR SYSTEM

E. TRITSCH¹, W. CARPENTIER², Z. LI¹, M. MERICKSKAY¹

¹ *UPMC UR4 Physiologie, Physiopathologie et Vieillessement, Paris, France*

² *UPMC Plate-forme Post-Génomique (P3S), Faculté de Médecine Site Pitié-Salpêtrière, Paris, France*

Serum response factor (SRF) is a transcription factor of the MADS box family that regulates essential structural and metabolic genes in many tissues. Using a mouse Cre-Lox model, we have shown previously that SRF inactivation can result in severe cardiac and intestinal failure as well as angiogenic defects.

We have performed transcriptomic analyses of gene expression alteration in the cardiac and vascular system following SRF inactivation (see other abstracts) and we found a large number of down-regulated genes but an even larger number that are up-regulated after SRF inactivation. This latter result was partly unexpected since SRF is mainly known as a positive regulator of transcription. While various hypotheses can account for this up-regulation, we chose to focus on the potential role of SRF in the control of miRNAs, which are endogenous small RNAs that can inhibit the expression of other mRNAs. Indeed, recent bioinformatic analyses revealed that more than 40 microRNAs contain SRF target sequences in their promoter region, suggesting a possible broad regulatory role of SRF for these microRNAs. It has already been shown by others that SRF regulates miR-1 and miR-133 expression during heart development, those miRs being essential for correct cardiogenesis and the control of cardiac

hypertrophy. The aims of this project are: 1) To analyse the role of SRF in the regulation of microRNAs in the adult heart and vessels of mice by a transcriptomic approach and ChIP on Chip approach; 2) To study the biological role of microRNAs regulated by SRF and their implications in development of cardiovascular disease.

To analyse the role of SRF in microRNA regulation, we have started to extract total RNA from hearts of SRF conditional knockout mice at different stages and in basal and hypertrophic settings. Preliminary analysis of global microRNA expression profile of these samples using Illumina V2 microRNA beadarrays and characterization of the expression of putative SRF MiR targets by quantitative RT PCR will be presented.

L007

ALTÉRATIONS DU TRANSCRIPTOME ET DU PROTÉOME CARDIAQUE RÉSULTANT DE L'INACTIVATION DU FACTEUR DE RÉPONSE AU SÉRUM (SRF)

N. DIGUET¹, M. MERICKSKAY¹, Z. LI¹

¹ UPMC/UR4, Physiologie, physiopathologie et vieillissement, Paris, France

SRF, un facteur de transcription qui coordonne l'expression d'un grand nombre de gènes musculaires est régulé par la voie des MAPK, des Kinases calcium-dépendantes, des Rho GTPases. Il est également stimulé par les signaux biomécaniques et directement régulé par le taux de polymérisation de l'actine. SRF est également un partenaire de facteurs de transcription impliqués dans l'hypertrophie cardiaque comme Gata4.

Notre modèle de souris Cre-lox permettant l'inactivation ciblée de SRF dans le cœur de souris adulte par une recombinase Cre inducible au tamoxifène (TAM) développe une cardiomyopathie dilatée. Nous menons une analyse parallèle du transcriptome et du protéome cardiaque chez le mutant SRF à différents temps au cours de la mise en place de la pathologie. Nos résultats montrent un chute précoce du taux de transcript d'actine cardiaque (dès 8 jours post-TAM) mais un maintien du taux de protéine sur une longue période avec une chute de 50% à 45 jours post-TAM. En revanche nous observons une altération précoce du taux de polymérisation de l'actine suggérant que des protéines impliquées dans la polymérisation et/ou le maintien du filament fin d'actine sont altérées. Nos analyses protéomique montrent que l'état de phosphorylation l' α B-crystalline, une chaperone du cytosquelette et notamment de l'actine, est altéré. Il existe également chez ces mutants une altération du réseau de desmine, partenaire de l'actine et de l' α B-crystalline.

Notre étude du transcriptome à différents temps après l'inactivation de SRF en condition normale ou hypertrophique a permis d'identifier plusieurs centaines de gènes dérégulés et plus spécifiquement 21 gènes impliqués dans l'hypertrophie cardiaque qui sont dépendants de SRF. L'expression de deux protéines connues pour interagir avec à l'intégrine β 1 : la mélusine et MIBP est particulièrement altérée chez les mutants SRF. Par différentes stratégies d'inactivation ou de surexpression de ces cibles, nous recherchons l'implication de ces protéines dans l'adhésion cellulaire des cardiomyocytes à la matrice extracellulaire et le remodelage. Cette étude devrait permettre de mieux comprendre le lien entre SRF et la voie de signalisation des intégrines, la contractilité cardiaque et la réponse hypertrophique.

L008

DÉFAUT DE DIFFÉRENCIATION VEINO-LYMPHATIQUE EMBRYONNAIRE PAR MODULATION DE L'ARN INTERFÉRENCE

S. GAUVRIT¹, J. PHILIPPE¹, A. PATEL², E. HONORE², N. DEBILI³, I. GODIN³, S. GERMAIN^{1,4}

¹ Inserm U833 – Collège de France, Paris, France

² IPMC-CNRS, Valbonne, France

³ Inserm U790, Institut Gustave Roussy-PR1, Villejuif, France

⁴ Service d'Hématologie Biologique A, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, France

L'ARN interférence, mécanisme de régulation de l'expression des gènes, est médiée par les siARNs et les microARNs, ARN non-codants de 20 à 22 nucléotides affectant la régulation post-transcriptionnelle d'ARNm cibles avec lesquels ils s'apparient.

La RNase DICER est une enzyme centrale de la biosynthèse des siARNs et microARNs. Les souris dont le gène dicer est invalidé ont un phénotype complexe, et meurent très tôt pendant le développement, notamment à cause d'un défaut d'angiogenèse.

Afin d'étudier l'ARN interférence au cours de l'angiogenèse embryonnaire, des souris dont le gène dicer est floxé (mutant conditionnel) sont croisées avec des souris exprimant la recombinase Cre, de manière constitutive, sous le contrôle du promoteur du gène tie2, dirigeant ainsi son expression dans les cellules endothéliales (CE) et les cellules hématopoïétiques.

Nos résultats montrent que l'inactivation de dicer sous le contrôle du promoteur du gène tie2 entraîne une mortalité embryonnaire suite à un œdème et des hémorragies au treizième jour du développement (E13,5). L'analyse histologique montre des vaisseaux lymphatiques remplis de sang, suggérant une mauvaise séparation du réseau sanguin et lymphatique. Cette hypothèse est étudiée par marquage des vaisseaux lymphatiques (LYVE-1) et des vaisseaux sanguins (PECAM) sur embryon entier et peaux isolées à différents stades précédant la mort.

Ces embryons présentent également un problème de développement du foie, probablement dû à l'activité du promoteur tie2 dans les lignées hématopoïétiques. La mise en culture de ces foies fœtaux à E13,5 révèle une atteinte des précurseurs hématopoïétiques.

L'étude de ces précurseurs à des stades plus précoces (E8,5) est en cours au laboratoire.

Nos résultats démontrent donc un rôle important de l'ARN interférence dans le contrôle épigénétique de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse embryonnaire mais également dans le développement de l'hématopoïèse, suggérant son implication dans la différenciation veino-lymphangiogenèse, dont les mécanismes moléculaires seront discutés.

L009

CHANGES IN CARDIAC TRANSCRIPTOME INDUCED BY ALTERED CORTICOSTEROID RECEPTOR SIGNALING IN THE HEART

C. LATOUCHE¹, Y. SAINTE-MARIE¹, M. STEENMAN², J. LÉGER², A. FEJES-TOTH³, N. FARMAN¹, F. JAISSE¹

¹ Inserm U872, Paris, France

² Inserm UMR915, Nantes, France

³ Dartmouth Medical School, Lebanon, USA