

D026

CATECHOLAMINES REGULATE VASCULAR PROGENITOR CELLS MOBILIZATION FROM BONE MARROW

A. RÉCALDE¹, C. COCHAIN¹, Y. ZOUGGARI¹, C. LOINARD¹, A. RICHART¹, J. VILAR¹, M. DURIEZ¹, B. LEVY¹, J.-S. SILVESTRE¹
¹ Inserm U970, Paris, France

Endogenous catecholamine stimulation of adrenergic receptors contributes to artery growth and remodeling in pathological and adaptive physiological settings. Recently, it has been shown that enforced stem/progenitor cells egress from bone marrow (BM) niches depends critically on the nervous system. In particular, pharmacological or genetic ablation of adrenergic neurotransmission indicates that noradrenalin (NA) signaling controls bone SDF-1 downregulation, and hematopoietic stem cells mobilization. We hypothesized that catecholamines may control vascular progenitor cells mobilization from bone marrow and subsequently trigger post-ischemic neovascularization.

Ischemia was induced by right femoral artery ligation in C57Bl6 mice (n=7 per group) treated with or without 6-hydroxydopamin (6-OHDA, 100 mg/kg, i.p., 2 days), clenbuterol (2 mg/kg, i.p., 5 days), dopamine (DA, 50 mg/kg, i.p., 5 days), NA (2.5 mg/kg, i.p., 5 days) and eticlopride (10 mg/kg, i.p., 5 days). Sympathectomy induced by 6-OHDA led to a decrease in foot perfusion, angiographic score and capillary density by 41.4% (p<0.001), 20.2% (p<0.01) and 21.6% (p<0.05) respectively, compared to controls, 21 days after ischemia. In contrast, administration of DA and NA increased angiographic score by 57.4% (p=0.05) and 80.3% (p<0.05), respectively and raised capillary density by around 15% (p<0.01). Treatment with the β_2 -receptor agonist, clenbuterol, increased vessel and capillary densities by 30% and 13%, respectively (p<0.01 versus untreated control). Injection of eticlopride, a specific DA D2 receptor antagonist, also raised vessel density compared to controls. We next assessed the mobilization of stem/progenitor cells from bone marrow and their recruitment to ischemic tissue using chimeric mice lethally irradiated and transplanted with BM mononuclear cells isolated from GFP mice. Three days after ischemia, the number of GFP/BS-1 lectin positive cells was reduced by 53.7% (p<0.05) in the ischemic muscle of mice treated with 6-OHDA compared with controls. In contrast, clenbuterol increased by 46.4% (p<0.05) the number of double positive cells suggesting that β_2 -receptor activation mediates BM stem cells mobilization and incorporation into vascular structure.

Therefore, activation of the β_2 -receptor promotes postnatal vessel growth in response to ischemia. This effect is likely mediated by activation of stem/progenitor cells migration out of the bone marrow.

D027

ROLE DE LA VOIE DE TRANSDUCTION P38MAPK (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE) DANS LES DIFFERENCIATIONS ENDOTHELIALES ET MYOGENIQUES DES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES

E. BARRUET¹, F. PEIRETTI¹, O. HADADEH¹, I. JUHAN-VAGUE¹, M.-C. ALESSI¹, B. BINETRUY¹

¹ Inserm UMR626, Marseille, France

In vivo, les cellules souches embryonnaires (ES) donnent naissance aux trois feuillets embryonnaires (mésoderme, endoderme et ectoderme), et in vitro se différencient en une large variété de lignages cellulaires, ce qui ouvre de larges perspectives en médecine régénératrice.

In vitro, la différenciation des cellules ES de souris est contrôlée par un puissant morphogène, l'acide rétinoïque (AR) : ajouté entre le 3^e et le 5^e jour du protocole de différenciation, il induit la différenciation des cellules ES en neurones et inhibe la cardiomyogénèse, la myogénèse et la différenciation endothéliale. La voie de transduction p38MAPK présente une activité précoce spontanée entre les jours 3 et 5, complètement inhibée par l'AR. Comparées aux cellules ES sauvages, les cellules ES déficientes en p38alpha se différencient spontanément, sans AR, en neurones et, à l'inverse ne sont plus capables de former des cardiomyocytes, des myotubes ou des cellules endothéliales. Des résultats similaires sont obtenus lorsque les cellules ES sauvages sont traitées, entre le jour 3 et le jour 5, par un inhibiteur chimique spécifique de p38 (augmentation de la neurogénèse et forte inhibition de la cardiomyogénèse, myogénèse et de la différenciation en cellules endothéliales).

Grâce à ces approches biochimique et génétique où nous bloquons la voie de transduction p38MAPK, nous montrons que l'activité de cette voie constitue un rôle régulateur précoce dans l'engagement des cellules ES vers, soit la neurogénèse -p38 «off»-, soit des lignages spécifiques du mésoderme -p38 «on».

Cet effet semble cibler des précurseurs communs aux lignages cardiomyocytaire, endothélial et du muscle squelettique, exprimant le marqueur membranaire Flk-1.

Dans le but d'étudier les conséquences d'une activation constitutive de cette voie de transduction, nous réalisons des expériences de transfection stable d'un vecteur d'expression inductible nous permettant d'exprimer une forme activée de p38alpha dans les cellules ES sauvage et p38^{-/-}. L'analyse des capacités de différenciation de ces cellules sera présentée.

D028

L'EXPRESSION DES GÈNES PAI-1, TPA ET UPA EST FORTEMENT RÉGULÉE PENDANT LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES EN MYOCYTES ET ADIPOCYTES

O. HADADEH¹, E. BARRUET¹, F. PEIRETTI¹, M. VERDIER¹, I. JUHAN-VAGUE¹, M.-C. ALESSI¹, B. BINETRUY¹

¹ Inserm UMR626, Marseille, France

PAI-1 est l'inhibiteur physiologique des activateurs du plasminogène uPA et tPA et inhibe le complexe formé entre uPA et son récepteur, et par voie de conséquence, entre la vitronectine et l'intégrine alphav beta3. PAI-1 est impliqué dans l'adhésion et la migration des cellules endothéliales, dans la différenciation adipocytaire et dans la réponse à l'insuline; in vivo, il facilite la thrombose, la fibrose et le remodelage tissulaire. Des taux élevés circulants de PAI-1 représentent un biomarqueur de l'obésité centrale et sont un facteur pronostic du diabète de type 2. Les propriétés biologiques de PAI-1 ont conduit à l'hypothèse que PAI-1 serait impliqué directement dans le développement du tissu adipeux. Notre objectif est d'évaluer les rôles spécifiques des gènes PAI-1, uPA et tPA dans les mécanismes moléculaires de la différenciation

des cellules souches embryonnaires (cellules ES) de souris dans différents lignages.

Indétectables à l'état indifférencié, les expressions de PAI-1, uPA et tPA et les activités enzymatiques uPA et tPA sont fortement régulées durant la différenciation des cellules ES. Les activités uPA et tPA sont rapidement augmentées durant la phase précoce de détermination du processus, sans expression détectable de PAI-1. Puis, l'expression de PAI-1 augmente progressivement dans les surnageants de culture des cellules bien différenciées, corrélant avec une inhibition concomitante des activités uPA et tPA. Des expériences d'immunohistochimie montrent que PAI-1 est exprimé à la fois dans les myotubes et dans les adipocytes matures.

Le rôle potentiel de ces régulations successives est analysé par la construction de lignées de cellules ES surexprimant le cDNA de PAI-1 dès l'état indifférencié. Les effets d'une surexpression ectopique de PAI-1 à différent temps pendant la différenciation des cellules ES sont recherchés.

De plus, le traitement précoce des cellules ES en différenciation par l'amiloride, inhibiteur spécifique d'uPA, provoque une diminution de la myogénèse et une augmentation de la différenciation adipocytaire. Par contre ces effets ne sont pas retrouvés en traitant les cellules par l'EACA, inhibiteur de la plasmine ou le DMA, un dérivé inactif de l'amiloride.

D029

INFLUENCE OF CANDESARTAN IN TUMOR GROWTH IN A MOUSE MODEL OF HYPERTENSION INDUCED BY ENDOTHELIN-1

S. FAURE¹, N. CLÈRE¹, E. VESSIERES¹, I. CORRE², F. PARIS², D. HENRION¹

¹ UMR CNRS 6214 – Inserm U771, Angers, France

² CRCNA – Inserm U892, Nantes, France

Originally known for its vasoactive properties, angiotensin II is involved particularly in the regulation of blood pressure and cardiovascular homeostasis. Powerful mitogen, it is also involved in DNA damages inducing cellular and phenotypic changes occur in the initiation and tumor development, especially through its receptor AT1R.

Thus, the aim of this study was to evaluate the influence of a variation of blood pressure on tumor growth.

High blood pressure was induced in C57/BL6 mice by a chronic infusion of endothelin-1 (ET-1) in osmotic minipumps and one week later, mice were treated daily with the angiotensin receptor blocker candesartan or solvent. Tumor cells lung carcinoma (LL/2, 250000/mouse) were injected two weeks later and tumor growth was measured for 4 weeks.

The ET-1 induced hypertension (mean blood pressure 95 mm Hg) induced a significant increase in tumor growth compared to NaCl treated mice (80 mm Hg) while treatment by candesartan (70 mm Hg) restored tumor volume to the level observed in normotensive animals. Antihypertensive treatment used had no effect on LL/2 cell proliferation in vitro but reduced tumor angiogenesis. Indeed, treatment with candesartan highlighted a significant decrease in the expression of PECAM-1 in murine tumors. Moreover, candesartan decreased the sprout formation in an ex vivo mouse aortic ring model in culture. Finally, candesartan reduced the migration and survival of endothelial cells (EaHY.926) in culture.

Thus, candesartan could reduce tumor growth induced by hypertension ET-1-dependent, mainly by reducing angiogenesis. These results have to be confirmed by a non hypotensive dose of candesartan and the influence of the AT2R, induced by ARB treatments has to be explored.

Jeudi 2 avril 2009, de 10h00 à 11h30

E – PROLIFERATION, APOPTOSE, MICROPARTICULES

E001

MOLECULAR IMAGING OF CARDIOVASCULAR APOPTOSIS WITH NEW FLUORESCENT PROBE DIRECTED AGAINST CLEAVED CASPASE-3

M. DEBUNNE¹, C. PORTAL², S. RENET¹, P. NOACK², M. MASSONNEAU², C. THUILLEZ¹, V. RICHARD¹

¹ Unité Inserm U644, Rouen, France

² Quidd, Rouen, France

Apoptosis plays a central role in cardiovascular diseases, and thus constitutes an attractive target for molecular imaging of the severity of these diseases. We developed and characterized non nuclear molecular probes, specifically targeting Caspase –3, one of the key regulatory enzyme of apoptosis. For this purpose, we generated quenched near-infrared fluorescent probes which become fluorescent after being cleaved by caspase –3 and freely penetrate in cells. In this study we evaluated the selectivity/specificity of one of these probes, CP220, to detect myocardial caspase –3 activity in vitro and ex vivo.

For in vitro evaluation, we induced apoptosis/caspase-3 activation by incubating cultured heart microvascular endothelial cells with 1µm staurosporine (STAU) for 6 hours. No fluorescent signal of cleaved CP220 was observed in the absence of STAU. In contrast, STAU-treated cells displayed an increased fluorescent signal for cleaved CP220, which colocalized with the immunofluorescent (IF) signal obtained with an anti caspase –3 antibody, and was reduced by a caspase –3 inhibitor. Figure 1 shows FACS analysis and demonstrates a similar profile between cleaved CP220 and Annexin V (% of positive cells: Annexin V: control 11±2, STAU 34±2; STAU + caspase inhibitor 11±2 – CP220: control 9±1; STAU 26±4; STAU + inhibitor 9±3)

