

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE 2
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE – SANTE DE LILLE

**THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE
en Sciences de le Vie et de la Santé**

**Etude des voies de signalisation impliquées dans la
phosphorylation des protéines du myofilament
dans l'insuffisance cardiaque**

Présentée et soutenue publiquement le 16 Décembre 2015 par

Marion Bouvet

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Philippe AMOUYEL
Monsieur le Docteur Mathias MERICKSKAY
Monsieur le Docteur Frank LEZOUALC'H
Monsieur le Docteur Vincent RICHARD
Madame le Docteur Florence PINET
Monsieur le Professeur Nicolas LAMBLIN

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Directeur de thèse



Remerciements

Je dédie mon travail de thèse,

A Monsieur le Président de mon jury de thèse et directeur du laboratoire,

Monsieur le Professeur Philippe AMOUYEL,

Je souhaite aujourd'hui vous exprimer toute ma gratitude pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire « Facteurs de risques et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement » depuis mars 2011 et m'avoir permis d'y réaliser ma thèse. Merci de m'avoir accordé votre confiance. Soyez assuré de mon plus profond respect. Je suis très honorée que vous présidiez ce jury.

A mon directeur de thèse,

Monsieur le Professeur Nicolas LAMBLIN,

Je vous remercie d'avoir accepté d'encadrer mon travail de thèse mais aussi pour la confiance que vous m'avez accordé ces trois dernières années. J'ai beaucoup apprécié votre capacité à replacer nos données dans le contexte physiopathologique général de l'insuffisance cardiaque ce qui m'a permis de voir à chaque fois plus loin dans le projet. Un grand merci également pour le temps consacré à la relecture de ce manuscrit. Je tenais à vous dire que j'ai été extrêmement sensible à vos qualités d'écoute et vos conseils aussi bien sur le plan professionnel que personnel.

Aux membres de mon jury de thèse,

En particulier à Madame le Docteur Florence PINET,

Je tiens tout d'abord à vous remercier de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer votre équipe de recherche suite à mon passage dans le laboratoire entre mars et juillet 2011. Je vous suis également très reconnaissante d'avoir décelé cette petite étincelle et fait naître en moi la passion pour la recherche. J'ai réellement apprécié votre grande disponibilité mais également l'énergie et le temps que vous avez consacré à la relecture de ce travail mais aussi de tous les autres documents que j'ai pu vous adresser. Enfin, merci de m'avoir permis de participer à de nombreux congrès en France et en Europe. J'ai été heureuse de travailler à vos côtés ces quatre dernières années et j'espère que nous aurons à nouveau l'occasion de travailler ensemble.

Monsieur le Docteur Vincent RICHARD,

Je vous remercie très sincèrement d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. J'ai été très touchée par votre implication dans mon projet de recherche aussi bien lors de la rédaction de mon article, de mes abstracts pour les congrès que lors de mes comités de suivi de thèse. Merci également de m'avoir invitée à la 2^{ème} journée de l'IRIB en 2012 pour y présenter mes résultats.

Monsieur le Docteur Mathias MERICKSKAY,

Je tiens tout d'abord à vous remercier pour tous vos conseils, plus pertinents les uns que les autres, sur les différentes façons d'étudier la Desmine (par approches biochimiques et en culture primaire). J'ai été sincèrement ravie que vous fassiez partie de mon comité de suivi de thèse et je suis également très honorée que vous ayez accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je vous en remercie.

Monsieur le Docteur Frank LEZOUALC'H

Je souhaite aujourd'hui vous exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir permis d'obtenir une bourse de fin de thèse auprès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire. Je vous remercie également pour nos échanges notamment sur la CaMK II. C'est pour moi un grand plaisir et un honneur que vous ayez accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je tiens également à remercier sincèrement

Le Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire et la Société Française de Cardiologie pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et pour avoir financé mes trois derniers mois de thèse.

L'ensemble de mes collaborateurs M^{elle} Meryem Tardivel, Dr Nicolas Barois, Mr Jean-Michel Saliou, Pr Paul Mulder et Dr Tchilabalo Dilezitoko Alayi pour leur gentillesse, leur soutien et l'énergie déployée pour l'avancée de ce travail.

Le Dr Ana-Maria Cuervo pour nous avoir confirmé que la Desmine est bien une cible potentielle de l'autophagie médiée par les chaperonnes en nous communiquant la position des motifs KFERQ sur sa séquence en acides aminés.

Tous les (ex-) membres de l'équipe Protéo,

Maggy, je ne pouvais que commencer par toi ! Tu as été d'un soutien sans faille ces quatre dernières années. Je ne te remercierai jamais assez pour ton aide et tes conseils aussi bien professionnels que personnels. J'ai réellement apprécié de partager tous ces moments (et surtout ces fou-rires) avec toi qui es devenue ma complice et ma grande Amie...

Olivia, j'ai vraiment apprécié de travailler à tes côtés ces quatre dernières années. Je te remercie pour ton aide précieuse dans les manips de protéomique. Ta sympathie, ta gentillesse et ta bienveillance à mon égard m'ont énormément touché.

Gilles et Ludovic, je vous remercie très sincèrement pour votre gentillesse, votre joie de vivre et votre bonne humeur au quotidien. J'ai été très touchée par l'aide que vous m'avez apporté chacun à votre façon.

Ludovic, Aude, Annie, Rafaëlle, Emilie, Hugo, Nicolas, Marine, Eleonore, Lionel, Marie F., Marie C. et Sina avec qui j'ai eu le plaisir de partager de très bons moments au laboratoire. J'ai beaucoup apprécié votre soutien et vos encouragements qui m'ont souvent remonté le moral et redonné le sourire dans les moments de doute.

Professeur Christophe Bauters et Docteur Pascal de Groot, je vous remercie pour votre soutien et l'intérêt que vous avez porté à mon projet de thèse.

Tous mes (ex-) collègues et amis de l'unité INSERM UMR 1167 de l'Institut Pasteur de Lille, en particulier,

Sophie, Florent, Amandine, Yoann, Florie, Fanny, Anne-Marie, Fancy et Anaïs pour tous les fou-rires et les moments passés en votre compagnie dans et en dehors du laboratoire. Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir acceptée telle que je suis avec mes qualités mais aussi tous mes défauts. Mention spéciale à ma petite So qui a rendu mes trajets quotidiens en train beaucoup plus agréables et qui a toujours été là pour moi quand j'en avais besoin mais également à Fanny qui m'a énormément soutenue dans la dernière ligne droite.

Jean, pour ta gentillesse, ta bonne humeur communicative et ton soutien ton au long de ma thèse. Ces derniers mois tu as été un vrai coach pour moi et je te remercie d'avoir pris du temps pour discuter avec moi, me conseiller et me rassurer.

Xavier, pour la relecture de mon manuscrit et la chasse aux coquilles et fautes d'orthographe. Je te remercie également pour ta gentillesse et ta bienveillance à mon égard depuis mon arrivée au laboratoire.

Aline, Jean-Charles, Louisa, Julie, Anne-Sophie, Nadine, Charlotte, Alexis, Pierre, Julien, Valérie, Nicolas, Claire ... (la place me manque pour tous les citer !) pour leur sympathie et leur soutien tout au long de mon travail de thèse.

Je remercie très sincèrement ma famille et mes amis,

Mes chers parents, pour m'avoir soutenue tout au long de mon travail de thèse mais aussi dans mes études et mes projets personnels. Merci, merci et encore merci... Je crois que je ne le dirai jamais assez. Et Maman, tu avais raison : « *La vie ne vaut rien, mais rien de vaut la vie* » ...

Mes sœurs adorées, pour votre soutien sans faille et votre sourire à toutes épreuves. Merci d'avoir toujours veillé sur moi de près ou de loin et de me protéger depuis le jour où je suis arrivée dans vos vies.

Ma filleule Emma et ma nièce Lilly-Rose, les deux rayons de soleil qui illuminent ma vie à chaque instant. Merci mes petites puces pour tout l'amour que vous m'apportez chaque jour et pour votre joie de vivre communicative.

Ma meilleure amie Mathilde, pour m'avoir accompagnée sur le chemin de la vie depuis le lycée ! Merci pour ta générosité, ton soutien et l'épaule solide que tu m'as offerte et qui m'a permis de nombreuses fois de me relever.

Mon ami et confident Nicolas B. a qui je dois énormément... Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir toujours soutenue dans tous mes projets. Je vous suis infiniment reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Mes beaux-frères Renaud, Grégory, Johann et Martial, mes beaux-parents, Marie-France et Jean-Marc ainsi que ma belle-sœur Virginie et mes nièces Lily, Margot et Charlotte pour votre sympathie et toutes nos franches parties de rigolade en famille. Vous avez tous été adorables et j'ai vraiment apprécié votre soutien et vos encouragements pour mon travail de thèse mais également concernant mes projets personnels.

Ma moitié, Jordan. Je pense que pour toi seul je peux écrire des pages et des pages de remerciements... Tu m'as apporté tellement de choses positives depuis que nous nous sommes rencontrés. Tu es la personne que j'ai toujours attendue et à qui je suis le plus redevable. Merci de m'avoir appris à croquer la vie à pleine dents et d'en savourer chaque

bouchée. Merci également de m'avoir encouragée à quitter mon cursus universitaire « *professionnel* » pour me diriger dans une filaire « *recherche* » malgré toutes les contraintes que ça impliquait et tous les sacrifices personnels et professionnels que tu as dû faire suite à ça. Tu savais pertinemment que j'aurais regretté d'avoir gâché cette chance que l'on m'avait offerte. Je te remercie infiniment d'avoir eu la patience pendant quatre ans de m'écouter raconter mes journées de labo, mes réussites et mes échecs, mes joies et mes frustrations et d'avoir partagé avec moi chaque petite victoire concernant mon projet de thèse. Je te suis vraiment reconnaissante d'avoir accepté de sacrifier nos weekends pour que je puisse avancer mon travail mais aussi de m'avoir écouté répéter mes présentations pour les congrès et de m'avoir rassurée aussi souvent que nécessaire concernant mon avenir et mes projets.

- Résumé -

Avec plus de 3,5 millions de nouveaux cas diagnostiqués chaque année, l'insuffisance cardiaque (IC) touche actuellement plus de 15 millions d'euro-péens et représente ainsi la première cause de mortalité cardiovasculaire en Europe. Malgré les avancées de la recherche cardiovasculaire, l'IC reste une maladie grave et de mauvais pronostic. En effet, plus de 50% des patients meurent dans les 5 années suivant le diagnostic. La compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents, encore largement inconnus, permettrait de développer des thérapeutiques visant à soigner les causes de l'IC plutôt que les conséquences et ainsi d'améliorer la prise en charge des patients. La contribution majeure des modifications post-traductionnelles (MPTs) dans la régulation de l'expression génique, de l'activité enzymatique ainsi que dans la régulation fonctionnelle des protéines font des MPTs les intégrateurs de l'adaptation dynamique du phénotype. C'est pourquoi l'équipe a réalisé des analyses phosphoprotéomiques dans un modèle expérimental d'IC chez le rat à 2 mois post-infarctus du myocarde (IDM). Ces analyses ont permis de mettre en évidence d'une augmentation du niveau de phosphorylation en sérine de la Desmine dans les ventricules gauches (VG) de rats IC par rapport aux témoins.

Notre étude vise à identifier d'une part les kinases impliquées dans la phosphorylation de la Desmine et d'autre part à déterminer l'impact de l'augmentation de la forme phosphorylée de la Desmine sur son devenir dans le modèle *in vivo*.

Par analyse bioinformatique, nous avons sélectionné les kinases potentiellement impliquées dans la phosphorylation de la Desmine. L'étude de la régulation de ces kinases dans le modèle d'IC chez le rat a permis de mettre en évidence la présence d'une plus grande quantité d'unités actives de PKC ζ et de GSK3 β dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM. *In vitro*, l'inhibition de PKC ζ entraîne à la fois une diminution de l'activité GSK3 β ainsi qu'une modulation du profil de phosphorylation de la Desmine. L'ensemble de ces données suggère l'implication de PKC ζ et de GSK3 β dans l'augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine dans le modèle d'IC chez le rat. Néanmoins, leur action directe sur la Desmine, en cascade ou encore indirecte via d'autres partenaires reste encore à définir.

Par immunofluorescence, nous avons mis en évidence la présence d'agrégats de Desmine dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM possiblement formés suite à son hyperphosphorylation. Nous avons émis l'hypothèse que ces agrégats de Desmine, comme toute protéine agrégée, seraient toxiques pour le cardiomyocyte et nécessiteraient l'intervention des systèmes protéolytiques pour être éliminés afin d'assurer la survie cellulaire. L'étude du système ubiquitine protéasome, de la macroautophagie et de l'autophagie médiée par le chaperonnes (CMA) dans le modèle d'IC chez le rat à 7 jours, 1 et 2 mois post-IDM suggère que l'inefficacité de la macroautophagie à 7 jours post-IDM et la diminution de son activité au cours du temps entraînerait une accumulation cytosolique de Desmine phosphorylée mais également l'induction de la CMA afin d'assurer la clairance de cette dernière. *In vitro*, nous avons

montré que l'induction pharmacologique de la CMA entraîne une diminution du niveau de Desmine ainsi qu'une modulation de son profil de phosphorylation.

L'augmentation de phosphorylation en sérine de la Desmine dans les VG de rats IC à 2 mois, dépendante de la PKC ζ et/ou GSK3 β , semble entraîner l'accumulation cytosolique de Desmine ainsi que la formation d'agrégats dans les VG de rat IC qui pourraient participer à la dysfonction contractile observée au cours de l'IC. En réponse à l'inefficacité de la macroautophagie, la CMA serait activée afin d'assurer l'élimination de la Desmine phosphorylée et ainsi la survie du cardiomyocyte au cours de l'IC.

- Abstract -

With over 3,5 million new cases each year, heart failure (HF) currently affects more than 15 million of European individuals and thus represents the leading cause of cardiovascular mortality in Europe. Despite advances in cardiovascular research, HF remains a serious disease with poor prognosis. Indeed, more than 50 per cent of patients die within 5 years after diagnosis. Understanding the underlying physiopathological mechanisms would allow the development of therapeutics to treat the causes of HF rather than the consequences of the disease, thereby improving the medical care of patients. The major contribution of post-translational modifications (PTMs) in the regulation of gene expression, enzyme activity as well as in the functional regulation of proteins, turns PTMs into integrators of the dynamic adaptation of the phenotype. For this reason, the team performed phosphoproteomic analyses in an experimental rat model of HF at 2 months following myocardial infarction (MI). These analyses revealed an increase of the phosphorylation levels of Desmin at serine residues in left ventricles (LV) of HF rats compared to sham rats.

The aim of our study is to identify the kinases which are implicated in Desmin phosphorylation on one hand, and the impact and behavior of increased phosphorylated Desmin in cardiomyocyte on the other hand.

By bioinformatic analysis, we first selected the kinases which are potentially implicated in Desmin phosphorylation. Then, we studied the enzymatic regulation of selected kinases in an experimental rat model of HF, which allowed the identification of active PKC ζ and GSK3 β in the LV of HF rats at 2 months. In vitro, pharmacological inhibition of PKC ζ leads to a decreased of GSK3 β activity as well as a modulation of the phosphorylated Desmin profiles. Taken together, these data suggest an implication of PKC ζ and GSK3 β in the increase of Desmin phosphorylation levels in the LV of HF rats. However, their direct, consecutive or indirect implication on Desmin phosphorylation remains to be evaluated.

By immunofluorescence, we observed the presence of aggregated Desmin in LV of HF rats at 2 months post-MI that suggest that these could be the result of Desmin hyperphosphorylation. We hypothesized that these Desmin aggregates, like other aggregated proteins, could be toxic for cardiomyocytes and need to be cleared by proteolytic systems to ensure cell survival.

The study of proteolytic systems in the in vivo model showed that while the UPS is not modulated all along LV remodeling, macroautophagy decreases with time and could thus drive cytosolic accumulation of phosphorylated Desmin in LV of HF rats. At the same time, CMA seems to be activated thereby ensure phosphorylated Desmin clearance. In vitro, we have shown that pharmacological induction of CMA results in lower phosphorylated Desmin levels.

In conclusion, increased Desmin phosphorylation levels seems to be dependent of PKC ζ and/or GSK3 β activation in LV of HF rats at 2 months after MI. This elevation could drive the cytosolic accumulation and aggregation of Desmin, which could be involved in the contractile dysfunction

observed during HF. Finally, as a result of decreased macroautophagy, CMA could be activated in LV of HF rats to ensure phosphorylated Desmin clearance and thus cardiomyocyte survival.



Liste des publications et communications

- Publications -

- Bouvet M, Dubois-Deruy E, Alayi TD, Mulder P, El Amranii M, Beseme O, Amouyel P, Richard V, Tomavo S, Pinet F. Increased level of phosphorylated desmin and its degradation products in heart failure (soumis)
- Dubois-Deruy E, Belliard A, Mulder P, Bouvet M, Smet-Nocca C, Janel S, F, Beseme O, Amouyel P, Richard V, Pinet F. Interplay between troponin T phosphorylation and O-N-Acetylglucosamylation in ischaemic heart failure, *Cardiovasc Res.* 2015 Apr 26. pii: Cvv136. [Epub Ahead Of Print]
- Watez J-S, Delmont A, Bouvet M, Beseme O, Goers S, Delahaye F, Laborie C, Lesage J, Foligne B, Breton C, Metges C, Vieau D, Pinet F. Maternal perinatal undernutrition modifies lactose and serotransferin in milk: relevance to the programming of metabolic diseases, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* 2015 Mar 1;308(5):e393-401. doi: 10.1152/ajpendo.00452.2014. Epub 2014 Dec 3
- Bouvet M, Turkieh A, Acosta-Martin A, Chwastyniak M, Beseme O, Amouyel P, Pinet F. Proteomic profiling of macrophages by 2D-electrophoresis, *J. Vis. Exp.* 2014 Nov 4;(93):e52219. doi: 10.3791/52219

- Communications orales -

- Bouvet M, Belliard A, Mulder P, Turkieh A, Beseme O, Chwastyniak M, Amouyel P, Richard V, Pinet F. Augmentation de la phosphorylation de la desmine dans l'insuffisance cardiaque post-infarctus chez le rat.
⇒ Printemps de la Cardiologie, Marseille (France), 18 et 19 Avril 2013
- Bouvet M, Mulder P, Dubois-Deruy E, Beseme O, Chwastyniak M, Amouyel P, Lamblin N, Richard V, Pinet F. Rôle de l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) dans la clairance de la desmine phosphorylée dans l'insuffisance cardiaque post-infarctus.
⇒ Printemps de la Cardiologie, Toulouse (France), 2 et 3 Avril 2015

- Bouvet M, Mulder P, Dubois-Deruy E, Beseme O, Amouyel P, Lamblin N, Richard V, Pinet F. Chaperone-mediated autophagy implication in phosphorylated desmin clearance during heart failure.
 - ⇒ Printemps de la Cardiologie, Toulouse (France), 2 et 3 Avril 2015

- Communications affichées -

- Bouvet M, Belliard A, Mulder P, Turkieh A, Beseme O, Chwastyniak M, Amouyel P, Richard V, Pinet F. Augmentation de la phosphorylation de la desmine dans l'insuffisance cardiaque post-infarctus chez le rat.
 - ⇒ Printemps de la Cardiologie, Marseille (France), 18 et 19 Avril 2013
 - ⇒ Deuxième journée de l'IRIB (The Institute for Research and Innovation in Biomedicine), Rouen (France), 21 Juin 2013
- Bouvet M, Belliard A, Mulder P, Dubois-Deruy E, Turkieh A, Beseme O, Chwastyniak M, Amouyel P, Lamblin N, Richard V, Pinet F. Role of phosphorylated desmin and its autophagy clearance in heart failure.
 - ⇒ Gordon research seminar, Lucques (Italie), 15 et 16 Mars 2014
 - ⇒ Gordon research conference, Lucques (Italie), du 16 au 21 Mars 2014
 - ⇒ Printemps de la cardiologie, Strasbourg (France), du 24 et 25 Avril 2014
- Bouvet M, Mulder P, Beseme O, Amouyel P, Lamblin N, Richard V, Pinet F. Role of phosphorylated desmin and its autophagy clearance in heart failure.
 - ⇒ Journée André Verbert, Lille (France), 11 Septembre 2014
 - ⇒ International Autophagy Conferences, Toulouse (France), du 15 au 18 Septembre 2014
- Bouvet M, Mulder P, Dubois-Deruy E, Beseme O, Chwastyniak M, Amouyel P, Lamblin N, Richard V, Pinet F. Rôle de l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) dans la clairance de la desmine phosphorylée dans l'insuffisance cardiaque post-infarctus.
 - ⇒ Printemps de la Cardiologie, Toulouse (France), 2 et 3 Avril 2015



Sommaire

- Table des matières -

Liste des abréviations.....	27
Introduction	33
I. Le cœur.....	35
A. Anatomie du cœur	35
B. Histologie du cœur	37
C. La révolution cardiaque	38
D. Contraction du muscle cardiaque.....	39
E. Régulation fonctionnelle.....	41
1. Régulation intrinsèque	41
2. Régulation extrinsèque	43
a) Le système nerveux parasympathique.....	43
b) Le système nerveux sympathique	43
II. Insuffisance cardiaque.....	43
A. Définition	43
B. Etiologie de l'Insuffisance cardiaque	44
1. Insuffisance cardiaque systolique.....	44
2. Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée	44
C. Classification	45
D. Epidémiologie de l'insuffisance cardiaque.....	45
E. Biomarqueurs d'IC	47
III. Infarctus du myocarde	47
A. Définition	47
B. Classification	48
C. Epidémiologie	49
D. Facteurs de risque.....	49
E. Biomarqueurs d'IDM	50
IV. Remodelage ventriculaire gauche	51
A. Définition	51
B. Mécanismes physiopathologiques	52
1. Flux calciques	52
2. Réexpression des gènes fœtaux.....	54
3. Métabolisme énergétique	54
4. Stress oxydant	55
5. Inflammation, fibrose et remodelage de la matrice extracellulaire	56
a) Inflammation	56
b) Fibrose et remodelage de la matrice extracellulaire.....	57

6.	Mort cellulaire	57
7.	Protéines sarcomériques	58
8.	Principales voies de signalisation	58
V.	Desmine	59
A.	Structure	60
1.	Structure primaire	60
2.	Structure secondaire.....	60
3.	Structure tertiaire	61
B.	Fonction au sein de la cellule cardiaque	62
C.	Régulation post-traductionnelle	63
1.	Phosphorylation	64
2.	Autres modifications post-traductionnelles	65
D.	Pathologies liées à la Desmine	66
1.	Définition	66
2.	Cause	66
3.	Phénotype.....	66
4.	Thérapeutiques.....	67
VI.	Contrôle qualité des protéines	67
A.	L'autophagie	67
1.	La macroautophagie	69
a)	Initiation de la formation de l'autophagosome	69
b)	Elongation.....	70
c)	Fusion et dégradation des protéines	71
2.	La microautophagie	72
a)	Autophagie non sélective	73
b)	Autophagie sélective.....	73
c)	Régulation.....	73
3.	L'autophagie médiée par les chaperonnes	74
a)	Sélectivité de la CMA.....	74
b)	Déroulement de la CMA	74
1)	Reconnaissance des cibles de la CMA	74
2)	Acheminement vers le lysosome.....	75
3)	Translocation lysosomale et dégradation	75
c)	Fonction de la CMA	75
d)	Régulation.....	76
1)	Régulation endogène de la CMA.....	76
2)	Régulation exogène de la CMA.....	76
B.	Le système ubiquitine-protéasome	77

1. Ubiquitylation des protéines.....	78
2. Prise en charge et dégradation par le protéasome	79
a) Le cœur protéolytique.....	80
b) Les sous-unités régulatrices.....	80
C. La réponse UPR	80
1. Voie impliquant PERK	82
2. Voie impliquant IRE-1	82
3. Voie impliquant ATF6	82
D. Dialogue entre l'autophagie et l'UPS.....	82
Objectifs.....	89
Matériel et Méthodes	89
I. Modèles	91
A. Modèle animal	91
1. Déplétion en albumine et immunoglobulines.....	92
2. Equalisation	92
B. Modèles cellulaires.....	93
1. Lignée H9c2.....	93
2. Culture primaire de cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux.....	93
II. Traitements pharmacologiques	95
A. Inhibition pharmacologique de PKCζ.....	95
B. Induction de la CMA	95
C. Inhibition du protéasome et de la macroautophagie	95
III. Analyses biochimiques.....	96
A. Extraction des protéines.....	96
1. Protéines RIPA solubles.....	96
2. Protéines RIPA insolubles	96
3. Protéines membranaires	96
4. Dosage de la concentration en protéines	97
B. Immunoprécipitation et western blot.....	97
1. Immunoprécipitation	97
2. Western blot.....	97
a) Electrophorèse en conditions dénaturantes	98
b) Transfert des protéines sur membrane	99
c) Immunomarquage et révélation	99
d) Quantification du signal	101
IV. Analyses en microscopie	101
A. Microscopie électronique	101
1. Conditionnement des échantillons.....	101

2.	Contraste des échantillons	102
3.	Analyse au microscope électronique.....	102
B.	Microscopie confocale	102
1.	Fixation de l'échantillon	103
2.	Perméabilisation des cellules	103
3.	Incubation avec les anticorps primaires et secondaires.....	103
4.	Détection du signal/lecture des lames au microscope confocal.....	105
V.	Spectrométrie de masse	105
	Résultats	107
	Partie 1 : Etude de la balance phosphorylation/O-GlcNAcylation de la troponine T dans l'insuffisance cardiaque post-infarctus	109
I.	Objectifs de l'étude	111
II.	Résultats.....	111
III.	Discussion.....	113
	Partie 2 : Etude de la Desmine comme biomarqueur potentiel du RVG post-IDM et de l'IC	115
I.	Objectifs de l'étude	117
II.	Résultats.....	117
III.	Résultats complémentaires.....	119
IV.	Discussion.....	120
	Partie 3 : Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine au cours de l'IC	121
I.	Objectifs de l'étude	123
II.	Résultats.....	124
A.	Identification des Ser impliquées dans les modulations de phosphorylation de la Desmine.....	124
1.	Compartimentation cellulaire de la Desmine.....	124
2.	Identification des Ser phosphorylées de la Desmine dans le modèle <i>in vivo</i>	126
3.	Quantification.....	127
B.	Sélection <i>in silico</i> des kinases potentiellement impliquées	129
1.	Étude de la régulation de CaMK II, d'Aurora B, de PKC ζ et de GSK3 dans le modèle d'IC chez le rat	131
a)	CaMK II.....	131
b)	Aurora B.....	132
c)	PKC ζ	133
d)	GSK3	136
2.	Validation de l'implication de PKC ζ et/ou de GSK3 β dans la phosphorylation de la Desmine.....	137
a)	Inhibition pharmacologique de PKC ζ	137

b) Impact de l'inhibition de PKC ζ sur le niveau de phosphorylation de la Desmine.....	138
III. Discussion - Perspectives	140
A. Identification des Ser impliquées dans l'augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine <i>in vivo</i>.....	140
B. Identification des kinases impliquées dans l'augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine à 2 mois post-IDM.....	141
Partie 4 : Identification des mécanismes protéolytiques impliqués dans la clairance de la Desmine phosphorylée au cours de l'IC	147
I. Objectifs de l'étude	149
II. Résultats.....	150
A. Etude de la régulation des systèmes protéolytiques dans le modèle d'IC chez le rat	150
1. Système ubiquitine protéasome (UPS)	150
2. Macroautophagie	152
a) Mesure de l'expression des marqueurs de la macroautophagie.....	152
b) Étude de l'ultrastructure des VG de rats.....	154
c) Conclusion	156
3. Étude de la CMA.....	156
a) Recherche de motifs pentapeptidiques KFERQ dans la séquence de la Desmine	156
b) Mesure de l'expression des marqueurs de la CMA dans le modèle <i>in vivo</i>	158
c) Conclusion	159
B. Etude de l'implication de la CMA dans la clairance de la Desmine phosphorylée soluble	160
1. Mise au point de l'induction de la CMA par un sevrage en sérum	160
2. Induction de la CMA par la GA.....	161
a) Validation de l'activation de la CMA	161
b) Impact de l'induction de la CMA sur la Desmine et sa protéine chaperonne l' α B cristalline.....	162
c) Impact de l'activation pharmacologique de la CMA sur l'UPS et la macroautophagie	165
d) Conclusion	166
3. Développement d'un modèle d'induction de la CMA par inhibition du protéasome	166
a) Validation de l'inhibition du protéasome	167
b) Impact de l'inhibition du protéasome sur la macroautophagie et sur la CMA	167
c) Impact de l'inhibition du protéasome sur la Desmine.....	170
d) Conclusion	173
4. Impact de l'inhibition du protéasome et de la macroautophagie sur la CMA et la Desmine	174
a) Validation de l'inhibition du protéasome et de la macroautophagie	174
b) Impact sur la CMA	175
c) Impact sur la Desmine	176

d) Conclusion	176
III. Discussion- Perspectives	177
Conclusion.....	181
Références bibliographiques	189
Annexes	203

- Table des figures -

Figure 1. Représentation schématique de l'anatomie du cœur.....	35
Figure 2. Représentation schématique de la circulation du sang à travers l'organisme.....	36
Figure 3. Représentation schématique des 3 tuniques cardiaques	37
Figure 4. Représentation schématique des 3 phases du cycle cardiaque	38
Figure 5. Représentation schématique de la structure d'une fibre musculaire.	40
Figure 6. Représentation schématique de la structure et de la composition des sarcomères.....	40
Figure 7. Représentation schématique des processus moléculaires menant à la contraction des sarcomères.....	41
Figure 8. Représentation schématique des voies de conduction cardiaques	42
Figure 9. Prévalence de l'IC en fonction de l'âge et du sexe aux Etats-Unis entre 2003 et 2006	46
Figure 10. Probabilité de survie (en année) par sexe après le diagnostic d'IC	46
Figure 11. Classification de l'IDM en fonction de l'état des artères coronaires.....	48
Figure 12. Evolution du taux de décès par cardiopathie ischémique pour 100 000 habitants entre 1990 et 2008.....	49
Figure 13. Cinétique des biomarqueurs plasmatiques de l'IDM dans les 10 jours après l'infarctus	50
Figure 14. Représentation schématique du RVG : aspects morphologiques, biologiques et biochimiques.....	51
Figure 15. Représentation schématique de l'altération des flux calciques au cours du RVG.....	53
Figure 16. Représentation schématique des différentes sources d'énergie pour la cellule musculaire cardiaque.....	54
Figure 17. Principales sources de ROS au cours du RVG et de l'IC et déséquilibre entre leur ROS et la capacité du cœur à les éliminer.....	55
Figure 18. Représentation schématique de la réponse inflammatoire post-IDM	56
Figure 19. Implication du système rénine-angiotensine-aldostérone dans le développement du RVG et de l'IC.....	59
Figure 20. Représentation schématique du chromosome 2 humain et localisation du locus de la Desmine.....	60
Figure 21. Représentation schématique de la Desmine.	61
Figure 22. Représentation schématique de la formation des filaments de Desmine.	61
Figure 23. Représentation schématique de l'implication de la Desmine dans l'architecture du cardiomyocyte.....	62
Figure 24. Mécanismes de phosphorylation et déphosphorylation des protéines	64
Figure 25. Les différents types d'autophagie.....	68
Figure 26. Représentation schématique de la formation de l'autophagosome	70
Figure 27. Représentation schématique des processus cellulaires impliqués dans la lipitation du LC3 et dans son incorporation à la membrane de l'autophagosome naissant	71
Figure 28. Représentation schématique de la fusion de l'autophagosome avec le lysosome.....	72
Figure 29. Mécanisme d'action de la geldanamycine (GA) sur la Hsp90	77

Figure 30. Représentation schématique du processus d'ubiquitylation	78
Figure 31. Représentation schématique de la structure du protéasome.....	79
Figure 32. Représentation schématique des 3 voies de signalisation impliquées dans la réponse UPR	81
Figure 33. Représentation schématique des mécanismes compensatoires permettant d'assurer la protéolyse en cas d'inhibition de la macroautophagie, de la CMA et de l'UPS	83
Figure 34. Représentation schématique de la ligature de l'artère coronaire gauche du modèle expérimental d'IC chez le rat	91
Figure 35. Isolement des cardiomyocytes de rats néonataux à l'aide d'un gradient de percoll	94
Figure 36. Schéma récapitulatif des différentes conditions de traitement des NCM.....	95
Figure 37. Représentation schématique de la séparation des protéines dans le gel de résolution en fonction du pourcentage d'acrylamide.....	98
Figure 38. Schéma récapitulatif des différentes étapes d'un test PLA.....	105
Figure 39. Mise en évidence de l'existence de différentes formes phosphorylées de la Desmine dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM grâce à la technologie Phos-TAG	119
Figure 40. Immunolocalisation de la Desmine (vert) dans les VG de rats témoin (panel de gauche) et IC (panel de droite) du modèle expérimental à 2 mois post-IDM.....	124
Figure 41. Quantification du niveau d'expression de la Desmine dans les VG de rats témoins à 2 mois post-IDM	125
Figure 42. Représentation schématique de la démarche expérimentale ayant permis l'identification des Ser phosphorylées de la Desmine dans les VG de rats du modèle expérimental d'IC à 2 mois post-IDM.	126
Figure 43. Localisation sur la séquence de la Desmine de rat, de souris et d'homme des différentes Ser identifiées comme étant phosphorylées dans les VG de rats du modèle expérimental d'IC à 2 mois post-IDM	127
Figure 44. Quantification du niveau de phosphorylation en Ser60 de la Desmine dans la fraction protéique insoluble des VG de rats témoins à 2 mois post-IDM	128
Figure 45. Quantification par spectrométrie de masse du niveau d'expression de la Desmine dans la fraction protéique insoluble des VG de rats témoins à 2 mois post-IDM	128
Figure 46. Détection des mutants de Desmine par western blot après 48h de transfection des cellules H9c2.	129
Figure 47. Sélection in silico des kinases potentiellement impliquées dans la phosphorylation de la Desmine par analyse bioinformatique avec le logiciel GeneGo.	130
Figure 48. Quantification de l'expression des isoformes δ et γ de CaMK II, de leur activité enzymatique ainsi que de l'expression du PLB et de son niveau de phosphorylation en Thr17 dans les VG de rats témoins et IC à 2 mois post-IDM.....	131
Figure 49. Quantification de l'expression d'Aurora B dans les VG de rats témoins et IC à 2 mois post-IDM. Immunolocalisation d'Aurora B et de la Desmine dans les cellules H9c2	132
Figure 50. Quantification de l'expression de PKC ζ , de son activité enzymatique, de l'expression de son transporteur RACK1 (C) dans les VG de rats témoins et IC à 2 mois post-IDM.....	134
Figure 51. Immunolocalisation de la PKC ζ activée et de la Desmine, de PKC ζ totale et de la Desmine ainsi que de RACK1 et de la Desmine dans les VG de rats témoins et IC à 2 mois post-IDM.	135
Figure 52. Quantification de l'expression de GSK3 β et de son activité enzymatique dans les VG de rats témoins et IC à 2 mois post-IDM	136

Figure 53. Analyse morphologique des NCM traitées pendant 1h avec 10 μ M de myr PS en microscopie à contraste de phase au grossissement x200	137
Figure 54. Quantification de l'expression de la PKC ζ (Ac Millipore) dans les NCM traitées avec 10 μ M de myr PS pendant 1h et les cellules contrôles	138
Figure 55. Quantification de l'expression de la Desmine soluble dans les NCM traitées pendant 1h avec 10 μ M de myr PS et les NCM contrôles.....	139
Figure 56. Schéma récapitulatif des différents scénarios menant à la phosphorylation de la Desmine dans le modèle d'IC chez le rat	144
Figure 57. Evaluation de l'activité du protéasome dans le modèle d'IC chez le rat. Images représentatives du niveau d'ubiquitinylation des protéines dans la fraction protéique soluble des VG de rats à 7 jours, 1 et 2 mois post-IDM	150
Figure 58. Quantification du niveau d'ubiquitinylation de la Desmine dans la fraction protéique insoluble des VG de rats témoins et IC à 2 mois post-IDM et de l'expression de TRIM32 dans la fraction protéique soluble des VG de rats à 7 jours, 1 et 2 mois post-IDM. Immunolocalisation de la Desmine et de TRIM32 dans les VG de rats témoin et IC à 2 mois post-IDM.....	151
Figure 59. Mesure de l'expression des marqueurs de la macroautophagie dans le modèle d'IC chez le rat.....	153
Figure 60. Ultrastructure des VG de rats du modèle expérimental d'IC au cours du RVG post-IDM. Analyse en microscopie électronique de l'ultrastructure des VG de rats témoins et IC à 7 jours, 1 et 2 mois post-IDM.....	155
Figure 61. Localisation des motifs pentapeptidiques KFERQ dans la séquence en acides aminés de la Desmine de rat, de souris et d'homme.....	157
Figure 62. Mesure de l'expression des marqueurs de la CMA dans le modèle d'IC chez le rat.....	158
Figure 63. Effet d'un sevrage prolongé en sérum des NCM sur les marqueurs de la CMA	160
Figure 64. Impact d'un traitement des NCM avec la GA pendant 17h sur les marqueurs de la CMA	162
Figure 65. Recherche d'une colocalisation de la Desmine et de LAMP2a dans les NCM traitées avec la GA pendant 17h.....	163
Figure 66. Impact de l'induction pharmacologique de la CMA par la GA sur la Desmine et sa chaperonne l' α B cristalline	164
Figure 67. Impact de l'activation de la CMA sur l'UPS et la macroautophagie	165
Figure 68. Validation de l'inhibition du protéasome dans les NCM traitées avec le MG132.....	167
Figure 69. Impact de l'inhibition du protéasome sur la macroautophagie	168
Figure 70. Impact de l'inhibition du protéasome sur la CMA	169
Figure 71. Impact de l'inhibition du protéasome sur la structure de la Desmine.....	170
Figure 72. Impact de l'inhibition du protéasome sur la Desmine et sa chaperonne l' α B cristalline ..	171
Figure 73. Immunolocalisation de la Desmine et de l' α B cristalline dans les NCM traitées avec le MG132	172
Figure 74. Recherche d'une colocalisation entra la Desmine et les acteurs de la CMA dans les NCM traitées avec le MG132.....	173
Figure 75. Evaluation de l'activité du protéasome et de la macroautophagie dans les NCM co-traitées avec la 3MA et le MG132	174
Figure 76. Evaluation de la CMA dans les NCM co-traitées avec la 3MA et le MG132.....	175

Figure 77. Impact de l'inhibition du protéasome et de la macroautophagie sur la Desmine..... 176
Figure 78. Schéma présentant les différents systèmes protéolytiques impliqués dans la clairance de la Desmine phosphorylée en conditions physiologiques et physiopathologiques 186

- Table des tableaux -

Tableau 1. Classification de l'IC selon les critères de la *New York Heart Association* (NYHA)..... 45
Tableau 2. Sites de phosphorylation de la Desmine identifiés et kinases impliquées. 65
Tableau 3. Composition des gels de concentration et de résolution 98
Tableau 4. Conditions de western blot pour les différentes protéines d'intérêt étudiées. 100
Tableau 5. Conditions d'immunomarquage des différentes protéines d'intérêt étudiées. 104



Liste des abréviations

Ac	Anticorps
ACD	Artère coronaire droite
ACE	Angiotensin-Converting Enzyme
Acétyl-coa	Acétyl-coenzyme A
ACG	Artère coronaire gauche
ACN	Acétonytrile
ADP	Adénosine DiPhosphate
AG	Acide gras
AGEs	<i>Advanced Glycation End products</i> (produits avancés de glycation)
Ala (ou A)	Alanine
ALC-1	<i>Atrial light chain I</i> (Isoforme atriale de la chaîne légère de la myosine)
AMBRA1	Autophagy/Beclin-1 Regulator
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i> (protéine kinase activée par l'AMP)
AMP	Adénosine MonoPhosphate
Ang I	Angiotensine I
Ang II	Angiotensine II
ANP	Atrial Natriuretic Peptide
ARNm	ARN messenger
ART1	Angiotensin II receptor type 1 (récepteur à l'angiotensine I)
ATCC	American Type Culture Collection
ATF	Activating Transcription Factor
Atg	Autophagy-related genes
ATP	Adénosine TriPhosphate
Aurora B	Aurora kinase B
6-AN	6-aminonicotinamide
Baf	Bafilomycine A1
BICeL	BioImaging Center Lille-Nord de France
BNP	Brain Natriuretic Peptide
BSA	Bovin Serum Albumin
Ca²⁺	Calcium
CaMK II	<i>Calcium/calmodulin dependent protein kinase II</i> (protéine kinase II calcium/calmoduline dépendante)
CDK1	Cyclin-dependent kinase 1
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CK-MB	isoforme cardiaque de la créatine kinase
CMA	<i>Chaperone mediated autophagy</i> (autophagie médiée par les chaperonne)
CryAB	αB-Crystalline
Cys	cystéine
D	Acide aspartique
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DMAE	Diméthylaminoéthanol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DTT	Dithiothréitol
E	Acide glutamique
ECG	Electrocardiogramme
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i> (chemiluminescence améliorée)
EDTA	Éthylène Diamine Tétracétique
eIF2α	<i>Eukaryotic Initiation Factor 2</i> (facteur 2 d'initiation de la traduction)
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i> (oxyde nitrique synthase endothéliale)
ERAD	<i>Endoplasmic Reticulum Associated Degradation</i>
eRNA	ARN extracellulaire
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
F	Phénylalanine
FEVG	Fraction d'Ejection du Ventricule Gauche
FIP200	<i>Focal Adhesion Kinase (FAK) family kinase-interacting protein of 200 kDa</i>
GA	Geldanamycine
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GlcNA	Glucose-N-acétylé
GPCR	<i>G-Protein Coupled Receptor</i> (récepteurs couplés aux protéines G)
GSK3	Glycogen synthase kinase 3

H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HMGB1	<i>High-Mobility Group Box 1</i>
HRP	HorseRadish Peroxidase
Hsc70	<i>Heat Shock Cognate 70</i> (protéine de choc thermique)
Hsp	<i>Heat Shock Protein</i> (protéine de choc thermique)
HspB1	Heat Shock 27kDa Protein 1
I	Isoleucine
IC	Insuffisance Cardiaque
IDM	Infarctus Du Myocarde
IgG	Immunoglobuline de type G
IL	Interleukine
IP	Intrapéritonéal
IPG	Immobilized pH Gradient
IRE1	Inositol Requiring Enzyme 1
KFERQ	Lysine – Phenylalanine – Acide glutamique – Arginine -Glutamine
L	Leucine
LAMP2a	Lysosome-associated membrane protein type 2a
LC3	microtubule-associated protein 1 light chain 3
LD1	Lactate Déshydrogénase 1
Lys (ou K)	Lysine
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MEFED	Myocyte Enhance Factor 2D
Min	minute
mmHg	millimètre de mercure
MMP	métalloprotéinases matricielles
MPT	Modification Post-Traductionnelle
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
m/v	masse/volume
myr PS	myristoylated PKC ζ pseudosubstrate
3MA	3-méthyladénine
Na₃VO₄	Sodium orthovanadate
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
Nano LC-MS/MS	<i>Nano Liquid Chromatography coupled with tandem Mass Spectrometry</i> (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem)
NCM	Cardiomyocytes de rats nouveau-nés
NCX	Echangeur Na ²⁺ /Ca ²⁺
NF-κB	<i>Nuclear Factor-kappa</i>
NP40	Nonyl Phenoxy polyéthoxyéthanol
NT-proBNP	Fragment N-terminal du proBNP
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
O₂	Dioxygène
O₂⁻	Anion superoxyde
OCI⁻	Hypochlorite
OD	Oreille droite
OG	Oreille gauche
OGA	O-N-Acétyleglucosaminidase
O-GlcNAcylation	O-NAcetylglucosaminylation
OGT	O-N-Acétyleglucosaminyltransférase
OH[•]	Radical hydroxyle
PAK	p21-Activated Kinase
Pax2	Paired box gene 2
PBS	Phosphate Buffered Saline (tampon phosphate salin)
PE	Phosphatidyléthanolamine
PERK	<i>Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PI3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C

PLA	Proximity Ligation Assay
PLB	Phospholamban
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> (récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes)
P3M	Plateforme de Protéomique et Peptides Modifiés
R	Arginine
RACK1	Receptor for Activated C Kinase
RE	Réticulum Endoplasmique
REVE	REmodelage Ventriculaire
Rho-kinase	Rho-associated kinase
RIPA	Radiolmmunoprecipitation Assay Buffer
ROS	Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène)
Rpm	rotation par minute
Rpn	Regulatory particle non-ATPase
Rpt	Regulatory particle triple A
RVG	Remodelage Ventriculaire Gauche
RyR2	<i>Ryanodine receptor 2</i> (récepteur à la ryanodine de type 2)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (dodécylsulfate de sodium)
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
SEM	Standard Error of the Mean
Ser (ou S)	Sérine
SERCA	<i>Sarcoplasmic Réticulum Ca²⁺ ATPase</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor</i>
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TA	Température Ambiante
TBS	Tris-buffered saline (tampon salin Tris-HCl)
TEMED	Tetraméthyléthylènediamine
Thr (ou T)	Threonine
TIMPs	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i> (inhibiteur tissulaire des MMPs)
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TMB	Tetra-méthylbenzidine
TnC (ou cTnC)	Troponine C
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TnI (ou cTnI)	Troponine I
TnT (ou cTnT)	Troponine T
TRIM32	<i>Tripartite motif-containing protein 32</i>
Tubule T	Tubule transverse
Tyr	Tyrosine
U.A.	Unités Arbitraires
ULK	<i>Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
UPS	<i>Ubiquitin proteasome system</i> (système ubiquitine-protéasome)
UVRAG	<i>Ultraviolet irradiation Radiation Resistance-Associated Gene</i>
VD	Ventricule Droit
VG	Ventricule Gauche
VLC-1	<i>Ventricular Light Chain I</i> (isoforme ventriculaire de la chaîne légère de la myosine)
Vps	<i>Vacuolar protein sorting</i>
VSMC	<i>Vascular Smooth Muscle Cells</i>
VTC	<i>Vacuolar Transporter Chaperone</i>
v/v	volume/volume
WIPI	<i>WD repeat domain Phosphoinositide-Interacting</i>
XBP1	<i>X-box binding protein 1</i>



Introduction

I. Le cœur

Le cœur, moteur du système cardio-vasculaire, est un organe musculaire creux situé au milieu du thorax entre les poumons dont le rôle est d'approvisionner en oxygène et éléments nutritifs tous les tissus de l'organisme mais également d'éliminer les déchets métaboliques tels que le dioxyde de carbone en assurant la circulation du sang.

A. Anatomie du cœur

Le cœur est un muscle strié composé de 4 cavités : 2 cavités droites, l'oreillette droite (OD) et le ventricule droit (VD) formant le « cœur droit » et 2 cavités gauches, l'oreillette gauche (OG) et le ventricule gauche (VG) formant le « cœur gauche ». Les oreillettes (ou atriums) se situent vers la base du cœur alors que les ventricules sont situés au niveau de l'apex. Bien que le « cœur droit » et le « cœur gauche » soient accolés l'un à l'autre, ils sont totalement séparés par une paroi appelée septum afin que le sang oxygéné et non oxygéné ne se mélangent pas. On distingue le septum inter-auriculaire séparant les OD et OG et un septum inter-ventriculaire entre les VD et VG (Figure 1).

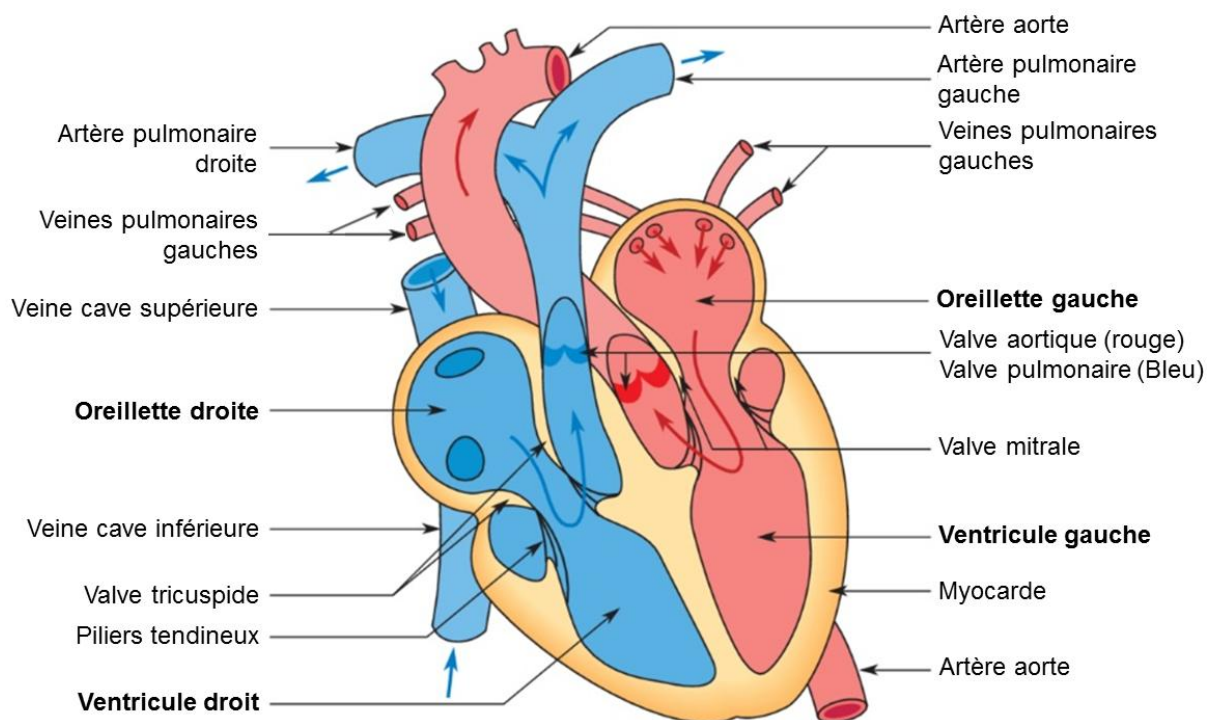


Figure 1. Représentation schématique de l'anatomie du cœur.

Au sein de chaque partie du cœur, l'OD communique avec le VD par l'intermédiaire de la valve tricuspide et l'OG communique avec le VG via la valve mitrale (Figure 1). Le « cœur droit » et le « cœur gauche » sont en tous points symétriques bien que le « cœur gauche » soit plus volumineux.

Introduction

Chaque cavité cardiaque est connectée à des vaisseaux permettant l'entrée du sang appauvri en oxygène (carbonisé) et la sortie du sang oxygéné. Le « cœur droit » assure la circulation du sang carbonisé qui entre dans l'OD via les veines caves inférieure et supérieure puis est éjecté dans le VD. A ce niveau, la valve tricuspide empêche le retour de sang du VD vers l'OD. Le sang carbonisé est ensuite envoyé via l'artère pulmonaire vers les poumons où il se réapprovisionne en oxygène et se décharge du dioxyde de carbone. La valve pulmonaire située entre le VD et l'artère pulmonaire empêche le reflux de sang vers le VD (Figure 1). Le « cœur gauche » quant à lui assure la circulation du sang oxygéné qui entre dans l'OG depuis les quatre veines pulmonaires et est ensuite envoyé dans le VG. Après son passage dans le VG, le sang oxygéné est éjecté dans tout l'organisme via l'artère aorte. A ce niveau, la valve aortique empêche le reflux de sang de l'artère aorte vers le VG (Figure 1).

Le circuit assurant la distribution du sang oxygéné à l'ensemble des organes du corps est beaucoup plus long que le circuit pulmonaire chargé de la réoxygénation du sang (Figure 2). De ce fait, le VG chargé de propulser le sang oxygéné dans tout l'organisme est nettement plus puissant que le VD. En effet, le muscle composant le VG est environ trois fois plus épais que celui composant le VD.

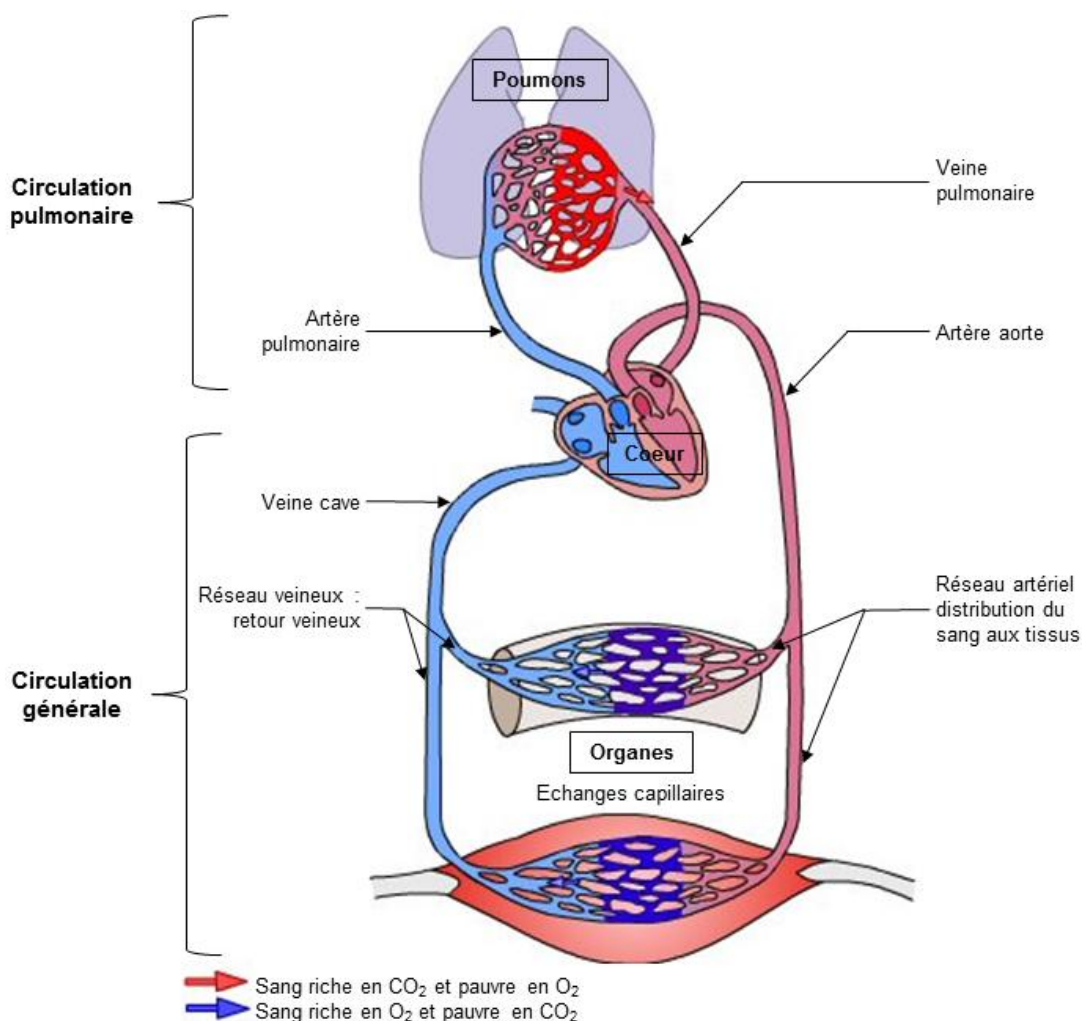


Figure 2. Représentation schématique de la circulation du sang à travers l'organisme.

B. Histologie du cœur

Le muscle cardiaque se compose de 3 tuniques : une enveloppe externe (le péricarde), une enveloppe interne (l'endocarde) entre lesquelles se trouve la paroi musculaire correspondant au myocarde (Figure 3).

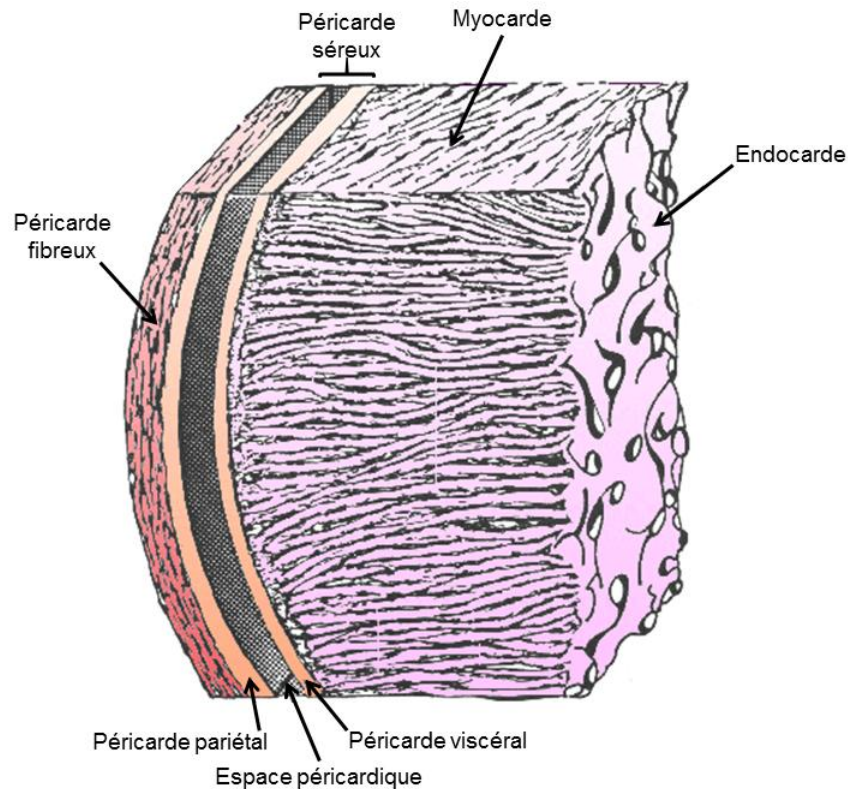


Figure 3. Représentation schématique des 3 tuniques cardiaques : le péricarde (enveloppe externe), l'endocarde (enveloppe interne) et myocarde situé entre les 2.

Le péricarde, tunique externe du cœur, est une membrane très mince entourant le cœur. Il est composé de 2 parties : une partie profonde, le péricarde séreux ; une partie superficielle, le péricarde fibreux. Le péricarde séreux est lui-même formé de 2 couches : un feuillet viscéral directement au contact du myocarde et un feuillet pariétal appelé épicarde. Le feuillet pariétal du péricarde séreux enveloppe le feuillet viscéral et constitue l'enveloppe externe du péricarde. L'espace péricardique présent entre les deux feuillets est rempli d'une faible quantité de liquide (50 à 75 mL) pour faciliter les mouvements du cœur. Le péricarde fibreux, composé de tissu conjonctif dense, englobe le péricarde séreux et sert à protéger le cœur et à le fixer dans la cage thoracique.

L'endocarde, tunique interne du cœur, tapisse la face interne des 4 cavités cardiaques et se prolonge par l'intima des gros vaisseaux. Cette membrane mince, composée de cellules endothéliales en contact avec le sang est séparé du myocarde par une couche sous-endocardique constituée de

tissu conjonctif, de cellules nodales et de cellules cardionectrices de Purkinje. Sa surface lisse permet au sang de s'écouler sans frottement et évite ainsi la formation de caillots.

Le myocarde est constitué de divers types cellulaires telles que des cellules musculaires lisses, des cellules endothéliales, des fibroblastes, des cellules immunitaires et d'environ 30% de cellules musculaires striées myocardiques appelées cardiomyocytes. Ces cellules mesurent en moyenne 120 μm de long et 20 à 30 μm de diamètre chez l'adulte et représentent à elles seules 70 à 80% de la masse globale du cœur (Brutsaert, 2003 ; Tham *et al.*, 2015). Le myocarde, partie musculaire du cœur de par son élasticité et sa contractilité assure la vidange et le remplissage des cavités cardiaques à l'origine de la circulation sanguine.

C. La révolution cardiaque

La révolution cardiaque correspond à l'ensemble des événements affectant le cœur entre 2 systoles atriales consécutives. Elle se décompose en 3 phases : la systole auriculaire, la systole ventriculaire et la diastole ventriculaire (Figure 4).

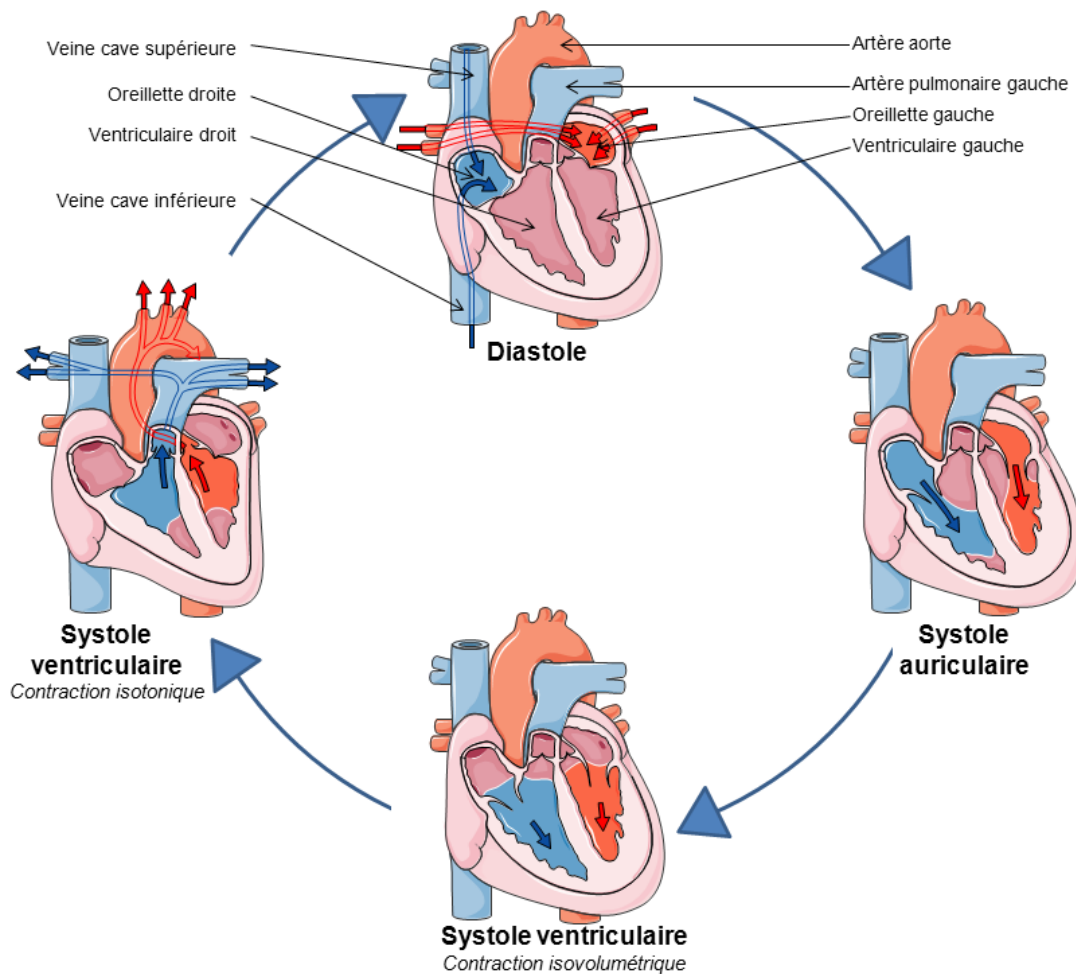


Figure 4. Représentation schématique des 3 phases du cycle cardiaque : la systole auriculaire, la systole ventriculaire et la diastole ventriculaire.

Introduction

La systole auriculaire correspond à la contraction des oreillettes. Elle permet l'éjection active du sang contenu dans les oreillettes vers les ventricules à travers les valves auriculo-ventriculaires (mitrale et tricuspide).

La systole ventriculaire correspond à la contraction des ventricules. Au cours de cet évènement, le sang contenu dans les ventricules est expulsé vers les poumons via l'artère pulmonaire et vers les tissus de l'organisme via l'artère aorte. La systole ventriculaire se décompose en 2 phases. La phase initiale correspond à la contraction isovolumétrique au cours de laquelle les valves auriculo-ventriculaires vont se fermer, la pression intra-ventriculaire va augmenter jusqu'à l'ouverture des valves sigmoïdes (aortiques et pulmonaires). A ce moment, ventricules et artères forment une chambre commune. La seconde phase correspond à la phase d'éjection (ou contraction isotonique) au cours de laquelle le sang est chassé des ventricules dans un premier temps rapidement puis de plus en plus lentement à mesure que la quantité de sang à éjecter diminue. Lorsqu'à la fin de l'éjection, la pression intra-ventriculaire devient inférieure à la pression artérielle, les valves sigmoïdes se referment empêchant alors le reflux du sang dans les ventricules.

La diastole correspondant à la phase de la relaxation du myocarde se déroule en 2 étapes. La première étape très courte correspond à la relaxation isométrique. Au cours de cette phase, la pression intra-ventriculaire, suite à la vidange des ventricules, diminue pour devenir inférieure à celle des oreillettes et entraîne l'ouverture des valves auriculo-ventriculaires. La seconde étape, qui représente la grande partie de la diastole, correspond au remplissage des ventricules. Elle se déroule en trois temps : un remplissage initial rapide suivi d'un remplissage lent dû à l'égalisation des pressions intra-ventriculaire et intra-auriculaire et enfin, un remplissage terminal rapide induit par le début d'une nouvelle systole auriculaire qui chasse le sang restant dans les oreillettes vers les ventricules et donne lieu à un nouveau cycle cardiaque.

La contraction des oreillettes et des ventricules du muscle cardiaque est assurée par les fibres myocardiques réunies en unités fonctionnelles, les sarcomères.

D. Contraction du muscle cardiaque

Les fibres myocardiques forment un réseau tridimensionnel complexe constitué d'un ensemble de cardiomyocytes connectés en série par l'intermédiaire des disques intercalaires situés au niveau de leur membrane. Ces disques intercalaires contiennent des jonctions adhérentes composées de N-cadhérine, de caténine et de vinculine ; des desmosomes composés notamment de desmine et de desmoplakine ; de jonctions communicantes constituées entre autres de connexines. La fibre myocardique est composée d'un ensemble de myofibrilles qui résultent elles-mêmes de l'alignement d'unités contractiles élémentaires : les sarcomères (Figure 5) (Fatkin *et al.*, 2002).

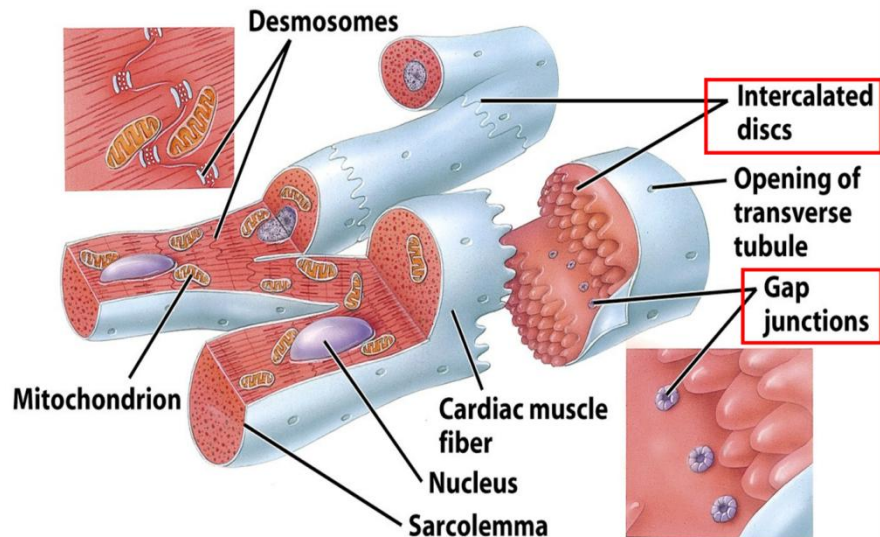


Figure 5. Représentation schématique de la structure d'une fibre musculaire (Wiley *et al.*, 2006).

Les sarcomères sont composés d'un agencement de filaments fins et de filaments épais. Les filaments fins sont formés de monomères d'actine cardiaque mais aussi d' α -tropomyosine, de troponine C (TnC), de TnI et de TnT. Les filaments épais quant à eux sont essentiellement composés de myosine.

Un sarcomère correspond au segment présent entre deux lignes-Z (ou disques Z) voisines. Les sarcomères sont responsables de l'apparence striée du muscle cardiaque. En effet chacun d'entre eux est composé d'une ligne M centrale correspondant au chevauchement des filaments épais, de 2 bandes I situés de part et d'autre de la ligne-Z et correspondant à l'empilement des filaments fins ainsi que d'une bande A qui elle correspond au chevauchement des filaments fins et épais (Fatkin *et al.*, 2002) (Figure 6).

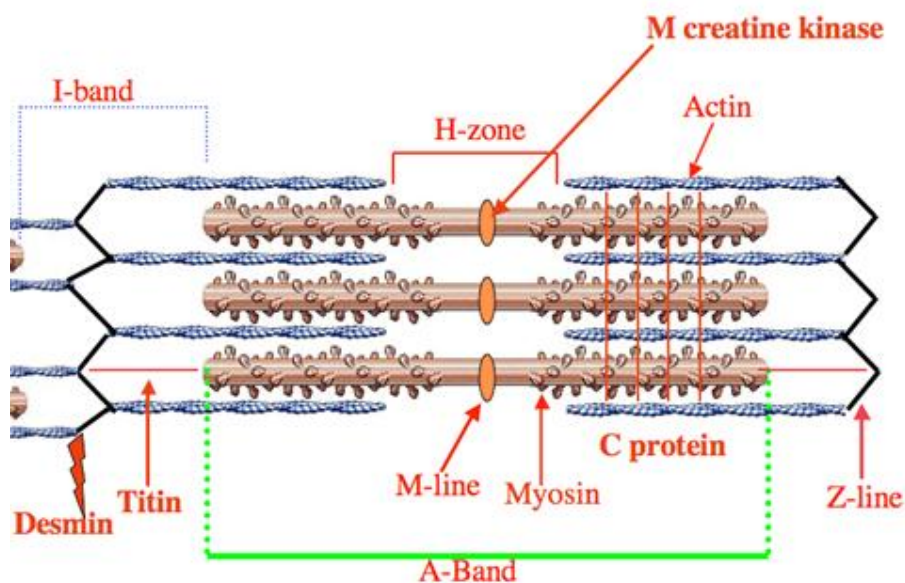


Figure 6. Représentation schématique de la structure et de la composition des sarcomères.

La contraction cardiaque résulte du raccourcissement des sarcomères. Le complexe des troponines cardiaques présent au niveau des filaments fins régule cette contraction en réponse au calcium (Ca^{2+}). Brièvement, la fixation du Ca^{2+} sur la TnC entraîne un changement conformationnel du complexe des troponines. La tropomyosine se déplace et libère au niveau de l'actine le site d'interaction avec la myosine. L'interaction entre l'actine et la myosine provoque un glissement des filaments fins et ainsi le raccourcissement des sarcomères (Ntelios *et al.*, 2015) (Figure 7).

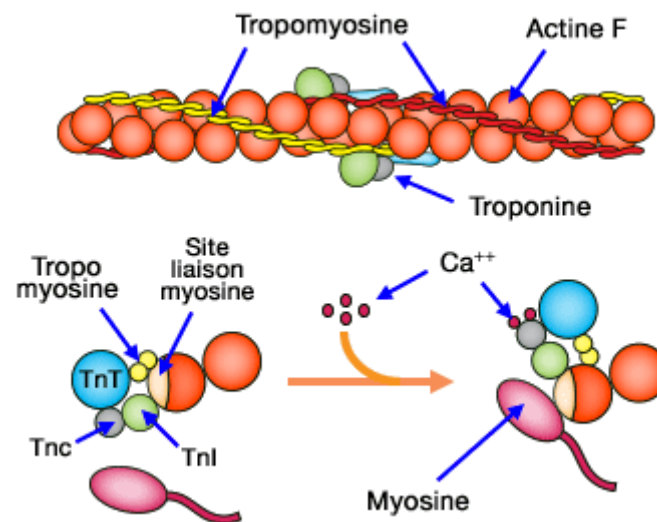


Figure 7. Représentation schématique des processus moléculaires menant à la contraction des sarcomères. Ca^{2+} : calcium ; TnC : troponine C ; TnT : troponine T ; TnI : troponine I.

Le raccourcissement simultané de l'ensemble des sarcomères est à l'origine du raccourcissement des fibres myocardiques et de la contraction cellulaire (Ntelios *et al.*, 2015). Les disques Z composés d' α -actinine, de filamine ou encore de téléthonine assurent le maintien de l'organisation des myofilaments en connectant les sarcomères adjacents et les stabilisent au moment de la contraction (Fatkin *et al.*, 2002).

E. Régulation fonctionnelle

Le cœur est un organe myogénique sous la dépendance d'un système nerveux intrinsèque qui assure le fonctionnement spontané du cœur. Néanmoins la contraction cardiaque peut également être modulée par le système nerveux extrinsèque.

1. Régulation intrinsèque

En dehors de l'organisme, lorsqu'il est maintenu dans des conditions physiologiques standards, le cœur continue de se contracter rythmiquement : on parle d'automatisme cardiaque. Cette particularité,

Introduction

spécifique au muscle cardiaque est inhérente à la présence du tissu nodal (ou cardionecteur) dans la paroi même du myocarde. Ce tissu nodal se compose de 2 nœuds connectés par un réseau internodal, le nœud sinusal (ou nœud de Keith et Flack) et le nœud auriculo-ventriculaire (ou nœud d'Aschoff-Tawara) ainsi que de voies de conduction (Figure 8).

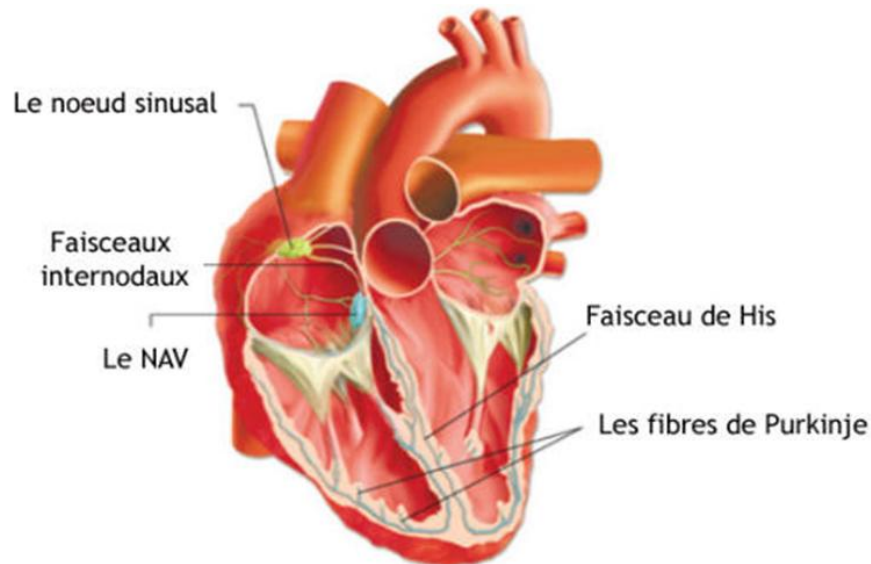


Figure 8. Représentation schématique des voies de conduction cardiaques : du nœud sinusal au réseau de Purkinje.

Le nœud sinusal situé dans la paroi de l'OD, à proximité de l'abouchement de la veine cave supérieure, est composé de cellules au potentiel de membrane très instable. Ces cellules orchestrent l'activité électrique du cœur en lui imposant leur rythme.

Le potentiel d'action naît au niveau du nœud sinusal puis se transmet de proche en proche à travers les voies de conduction, déclenchant au passage la contraction des oreillettes avant d'arriver au niveau du nœud auriculo-ventriculaire. Ce dernier, localisé au niveau du septum inter-ventriculaire, génère à partir des potentiels d'action un influx électrique homogène qu'il va ensuite transmettre à l'ensemble du myocarde via le faisceau de His. Ce faisceau, situé dans la partie haute du septum inter-ventriculaire, se divise en deux branches (droite et gauche) qui se ramifient ensuite pour former le réseau de Purkinje. Le réseau de Purkinje localisé dans les parois internes des ventricules va transmettre l'influx électrique aux cardiomyocytes et déclencher leur contraction.

La fréquence des potentiels d'action des cellules du nœud sinusal, peut être modulée par les signaux neurohormonaux provenant des systèmes sympathique et parasympathique innervant le nœud sinusal. L'équilibre entre ces deux systèmes régule la fréquence cardiaque.

2. Régulation extrinsèque

Les systèmes sympathique et parasympathique sont des systèmes antagonistes qui constituent à eux 2 le système nerveux végétatif (ou système autonome). Le système nerveux végétatif assure la régulation des fonctions automatiques de l'organisme telles que la digestion, la transpiration et la fréquence cardiaque. A l'état basal, le système parasympathique est prédominant. Il permet de maintenir la fréquence cardiaque à 70-75 battements par minute. Lors d'un stress ou d'un effort physique, le système sympathique est sollicité afin d'augmenter la fréquence et le débit cardiaque et permet ainsi au cœur de répondre aux besoins de l'organisme.

a) Le système nerveux parasympathique

Le système nerveux parasympathique est un système cardio-modérateur. En libérant de l'acétylcholine au niveau du nœud sinusal du cœur par l'intermédiaire des nerfs vagues droit et gauche le parasympathique entraîne un ralentissement de la fréquence cardiaque, de la conduction auriculo-ventriculaire et de la contractilité cardiaque. On parle d'effets chronotrope, dromotrope et inotrope négatifs respectivement.

b) Le système nerveux sympathique

Le système nerveux sympathique est quant à lui un système cardio-accélérateur. A l'inverse du système parasympathique, la libération de ses 2 médiateurs biochimiques, l'adrénaline et la noradrénaline, au niveau du cœur par l'intermédiaire des nerfs sympathiques cardiaques stimule les récepteurs α et β adrénergiques entraînant à la fois une accélération de la fréquence cardiaque, une augmentation de la force de contraction du cœur mais aussi une accélération de la vitesse de conduction. On parle d'effets chronotrope, inotrope et dromotrope positifs respectivement.

II. Insuffisance cardiaque

A. Définition

L'insuffisance cardiaque (IC) est une maladie cardiovasculaire qui peut se définir comme un état physiopathologique où une anomalie de la structure ou de la fonction cardiaque entraîne une incapacité du cœur à maintenir un taux d'oxygène suffisant pour couvrir les besoins métaboliques des tissus de l'organisme à l'effort mais aussi au repos (McMurray *et al.*, 2012).

En pratique clinique, le diagnostic de l'IC reste aujourd'hui difficile à établir puisque la plupart des symptômes d'IC sont non discriminants. En effet, beaucoup de signes résultent de la rétention de sodium et d'eau et peuvent se résoudre rapidement avec un traitement diurétique (McMurray *et al.*,

2012). Afin de poser un diagnostic l'IC, la mise en évidence d'une cause cardiaque sous-jacente est donc essentielle.

B. Etiologie de l'Insuffisance cardiaque

De manière générale, l'IC se développe lentement après une lésion cardiaque. Les étiologies à l'origine d'une insuffisance cardiaque sont multiples : un infarctus du myocarde (IDM), une cardiomyopathie dilatée, une cardiomyopathie hypertrophique, une cardiopathie congénitale, une myocardite, une valvulopathie, une hypertension artérielle, une endocardite ou encore un diabète. De telles atteintes cardiaques vont pousser le cœur à fournir plus d'efforts pour assurer la perfusion de l'ensemble des tissus de l'organisme ce qui à long terme peut entraîner des modifications physiologiques du cœur telles que son hypertrophie ou encore un épaississement de la paroi des ventricules. Ces modifications physiologiques vont par la suite diminuer les capacités du cœur à compenser (McMurray *et al.*, 2012).

Au moment du diagnostic, la mesure de la fraction d'éjection du VG (FEVG) permet de discriminer deux types d'IC. En cas de FEVG inférieure à 40-50% (en fonction des données de la littérature) on parle d'IC systolique. Si la FEVG est préservée, l'IC est dite à fraction d'éjection préservée (McMurray *et al.*, 2012).

1. Insuffisance cardiaque systolique

L'IC systolique correspond à l'IC de l'éjection. Ce type d'IC se caractérise par une diminution de la puissance du VG et par conséquent des difficultés à propulser le sang à travers l'aorte. Le cœur n'étant plus capable d'éjecter correctement le sang oxygéné vers l'organisme, ce dernier va refluer entraînant ainsi une augmentation de la pression ventriculaire qui passe de quelques millimètres de mercure (mmHg) à plus de 15 mmHg, une diminution du débit cardiaque ainsi qu'une accumulation de liquide au niveau de certains organes périphériques tels que les poumons et les reins (Cheng *et al.*, 2011).

L'IC systolique se développe dans deux tiers des cas consécutivement à une atteinte coronarienne mais peut également survenir suite une hypertension artérielle, une infection virale ou encore une consommation excessive et répétée d'alcool (McMurray *et al.*, 2012).

2. Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

L'IC à fraction d'éjection préservée correspond à l'IC de remplissage. Ce type d'IC est consécutif à un épaississement et/ou une rigidification du muscle cardiaque qui par conséquent ne parvient plus à se relâcher suffisamment. Le cœur n'est alors plus capable de se remplir et d'assurer l'oxygénation du sang.

La première cause d'IC à fraction d'éjection préservée est l'hypertension artérielle. La fibrillation atriale ou encore une maladie coronarienne peuvent également être à l'origine du développement de l'IC diastolique chez un patient (McMurray *et al.*, 2012).

C. Classification

L'IC est une pathologie qui évolue naturellement et progressivement d'un stade asymptomatique où l'IC est dite « compensée » vers un stade symptomatique où elle ne l'est plus. La *New York Heart Association* (NYHA) propose un classement de l'IC en différents stades en fonction de la sévérité de la maladie (Tableau 1) (McMurray *et al.*, 2012).

Tableau 1. Classification de l'IC selon les critères de la *New York Heart Association* (NYHA).

Stade NYHA	Caractéristiques
Stade I	<ul style="list-style-type: none">• Asymptomatique• Pas de limitation de l'activité physique ordinaire
Stade II	<ul style="list-style-type: none">• Limitation modeste de l'activité physique :<ul style="list-style-type: none">- patient à l'aise au repos- une activité ordinaire entraîne fatigue, palpitations et dyspnée (essoufflement)
Stade III	<ul style="list-style-type: none">• Réduction marquée de l'activité physique :<ul style="list-style-type: none">- patient à l'aise au repos- une activité physique moindre qu'à l'accoutumée entraîne des symptômes et des signes objectifs de dysfonction cardiaque (fatigue, palpitations et dyspnée)
Stade IV	<ul style="list-style-type: none">• Limitation sévère de l'activité physique (présence de symptômes même au repos)• Si l'activité physique n'est pas régulière, l'inconfort est grandissant

D. Epidémiologie de l'insuffisance cardiaque

L'IC est une maladie cardiovasculaire qui représente aujourd'hui un problème majeur de Santé Publique en raison de sa morbi-mortalité élevée ainsi que du coût de la prise en charge des patients (Mudd *et al.*, 2008). Dans les pays industrialisés, la prévalence de l'IC varie entre 1 et 2% dans la population adulte et atteint plus de 10% chez les patients âgés de plus de 70 ans (Figure 9) (McMurray *et al.*, 2012).

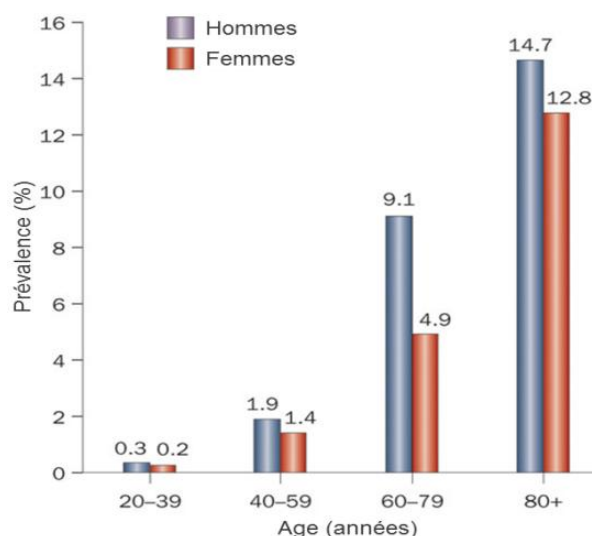


Figure 9. Prévalence de l'IC en fonction de l'âge et du sexe aux Etats-Unis entre 2003 et 2006 (Adapté de Bui *et al.*, 2011).

Le taux de mortalité associé à l'IC est élevé, en effet 30 à 40% des patients meurent dans l'année suivant le diagnostic et avant 1990 environ 60 à 70% des patients mourraient dans les 5 ans (Figure 10) (Roger *et al.*, 2004 ; McMurray *et al.*, 2005 ; McMurray *et al.*, 2012).

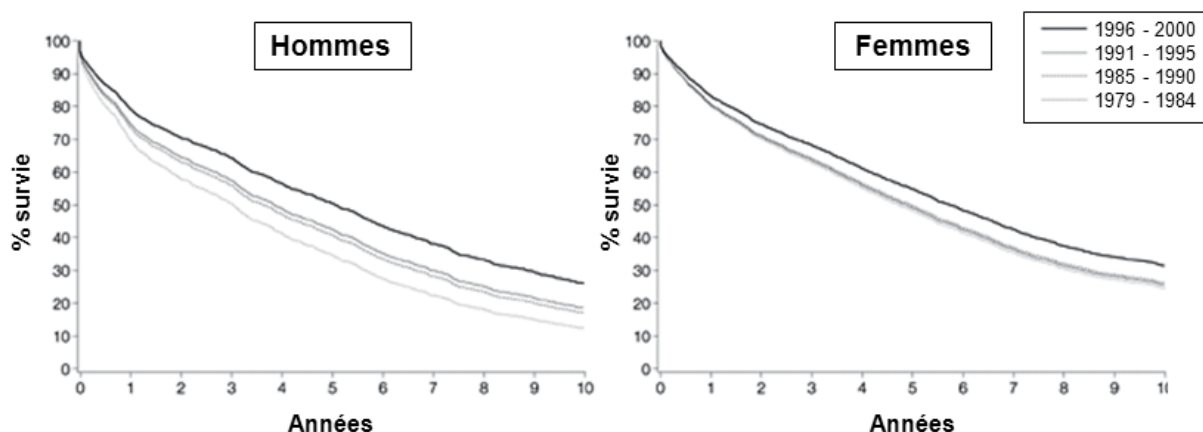


Figure 10. Probabilité de survie (en année) par sexe après le diagnostic d'IC (D'après Roger *et al.*, 2004).

L'IDM est le facteur de risque d'IC le plus important (Bui *et al.*, 2011). Il a été mis en évidence qu'environ 30% des patients développent une IC dans les 7 à 8 ans après un infarctus, en particulier les patients présentant une dysfonction VG au moment de l'IDM (Hellerman *et al.*, 2003). Ce défaut de contractilité myocardique va engendrer une augmentation de la charge de travail du cœur qui, pour maintenir le débit cardiaque, va s'hypertrophier. Il a été montré que le degré de dilatation du VG après un IDM permet une stratification du risque de développer une IC ou de mort (Sutton *et al.*, 1994). Deux études multicentriques menées en 2006 (REmodelage VEntriculaire [REVE]) et 2010 (REVE2), incluant plus de 200 patients ayant déjà eu un IDM antérieur ont mis en évidence qu'en dépit de l'amélioration de la prise en charge et du suivi des patients en post-infarctus, le risque de développer

un remodelage ventriculaire gauche (RVG) reste élevé (Savoye *et al.*, 2006 ; Fertin *et al.*, 2010). En effet, malgré l'administration d'une thérapeutique visant à lutter contre le RVG, environ 30% des patients présentent un RVG important à 1 an de suivi.

E. Biomarqueurs d'IC

En pratique clinique, les principaux biomarqueurs de l'IC sont le BNP (pour *Brain Natriuretic Peptide*) et le NT-proBNP (fragment N-terminal du proBNP pour *pro-brain natriuretic peptide*). Ces 2 biomarqueurs sont issus du clivage de leur précurseur le pré-proBNP. Ce dernier est synthétisé par les cardiomyocytes en réponse au stress mécanique lié à l'étirement. Le clivage du pré-pro-BNP donne lieu à un peptide de 108 acides aminés, proBNP qui sera clivé dans un deuxième temps, par une endopeptidase circulante (corin), en 2 peptides : le NT-proBNP de 76 acides aminés et le BNP de 32 acides aminés, seule forme biologiquement active (Braunwald, 2009). Il a été montré qu'une surcharge ventriculaire entraîne une augmentation de la production de BNP et de NT-proBNP ainsi que leur sécrétion dans le sang (Tang *et al.*, 2007).

Sur le plan physiologique, en se fixant au récepteur du facteur natriurétique auriculaire le BNP va inhiber le système rénine-angiotensine-aldostérone et le système nerveux sympathique et induire une vasodilatation artérielle périphérique mais aussi augmentation modeste de la diurèse. Cependant, les taux plasmatiques de BNP et le NT-proBNP pouvant être augmentés en cas d'hypertension, d'obésité abdominale ou encore en cas d'insuffisance rénale, ils ne sont pas des biomarqueurs parfaits d'IC (Braunwald, 2009).

III. Infarctus du myocarde

A. Définition

L'infarctus du myocarde (IDM), plus communément connu sous le terme « crise cardiaque », se définit comme une mort cellulaire induite par une ischémie myocardique prolongée provoquée par une diminution ou une interruption du débit coronaire. L'IDM peut avoir de graves répercussions sur la contractilité cardiaque en entraînant la nécrose d'une partie plus ou moins importante du muscle cardiaque. Néanmoins, cette définition n'a cessé d'évoluer. La troisième et dernière définition universelle de l'IDM en date, communiquée en 2012, regroupe à la fois des symptômes cliniques, des changements significatifs à l'électrocardiogramme (ECG) mais aussi des modulations du niveau des biomarqueurs cardiaques (Thygesen *et al.* 2012 ; Reddy *et al.*, 2015). Ainsi, le diagnostic définitif d'IDM ne peut être posé qu'en cas de mise en évidence de la nécrose d'une partie du myocarde dans un contexte clinique d'ischémie myocardique avec élévation et/ou baisse du niveau plasmatique d'un biomarqueur cardiaque telles que les troponines cardiaques (au-dessus du 99^{ème} percentile de la limite supérieure de référence) et présence de l'un des 5 événements suivants :

Introduction

- symptômes d'ischémie myocardique (douleur thoracique)
- visualisation à l'ECG de nouvelles (ou présumées nouvelles) modifications significatives du segment ST ou de l'onde T ou l'apparition d'un bloc de branche gauche
- apparition à l'ECG d'ondes Q pathologiques
- mise en évidence d'une nouvelle perte de myocarde viable ou d'une nouvelle anomalie de la contractilité régionale à l'imagerie
- identification par angiographie ou autopsie de la présence d'un thrombus intra-coronaire

B. Classification

Les IDM sont classiquement différenciés en deux catégories : l'IDM de type 1 et l'IDM de type 2 (Reddy *et al.*, 2015).

L'IDM de type 1 (ou IDM spontané) est associé à une occlusion coronaire aiguë suite à la formation d'un thrombus intra-luminal dans une ou plusieurs artères coronaires (Figure 11) (Reddy *et al.*, 2015). Ce thrombus survient généralement suite à la rupture d'une plaque d'athérome devenue instable.

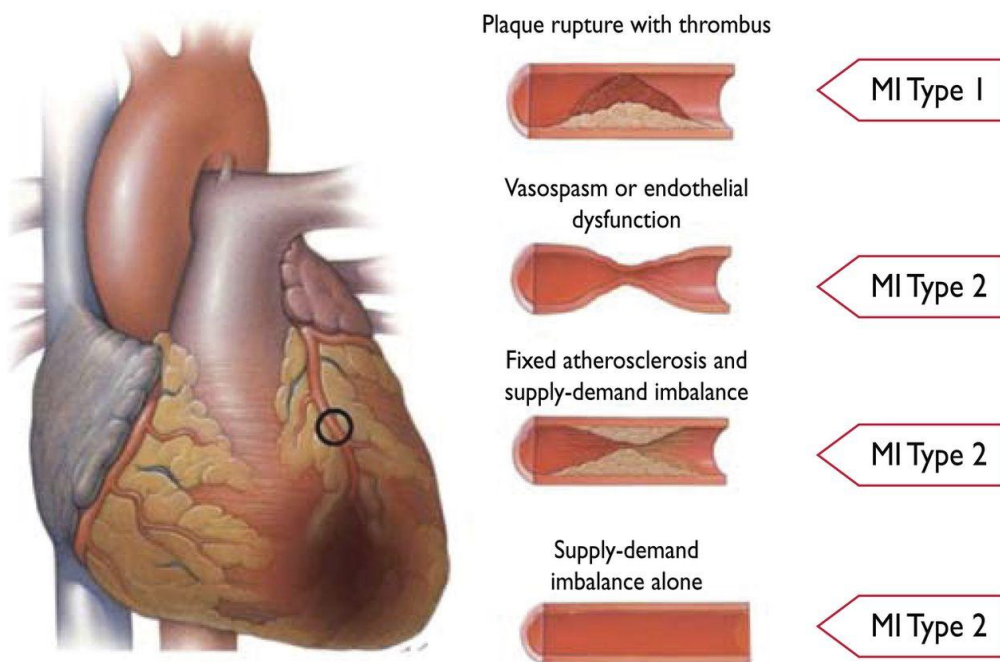


Figure 11. Classification de l'IDM en fonction de l'état des artères coronaires. D'après Thygesen *et al.*, 2012.

L'IDM de type 2 (ou IDM secondaire) est consécutif à un déséquilibre entre la demande et/ou l'apport en oxygène au niveau du cœur (Figure 11) (Reddy *et al.*, 2015). Une dysfonction endothéliale, une anémie, une insuffisance respiratoire, des troubles de la fréquence cardiaque ou encore de la pression artérielle (hypotension ou hypertension) peuvent être à l'origine de ce déséquilibre.

C. Epidémiologie

En 2012, l'Organisation Mondiale de la Santé estimait à 7,25 millions le nombre de décès imputables aux cardiopathies ischémiques, soit environ 12,8% de la mortalité mondiale. Ces chiffres font des cardiopathies ischémiques la première cause de mortalité mondiale.

En France en 2008, les maladies cardiovasculaires représentaient la deuxième cause de mortalité avec 27,5% des décès. Un quart de ces décès d'origine cardiovasculaire était dû à une cardiopathie ischémique et concernait majoritairement les personnes âgées de plus de 65 ans avec une proportion d'hommes légèrement plus élevée (51,1%). Entre 1990 et 2008, le nombre de décès dus à une cardiopathie ischémique a nettement baissé (environ 23%) (Figure 12) notamment grâce à une meilleure connaissance et une prévention des facteurs de risques mais aussi à l'amélioration de la prise en charge des patients (Aouba *et al.*, 2011).

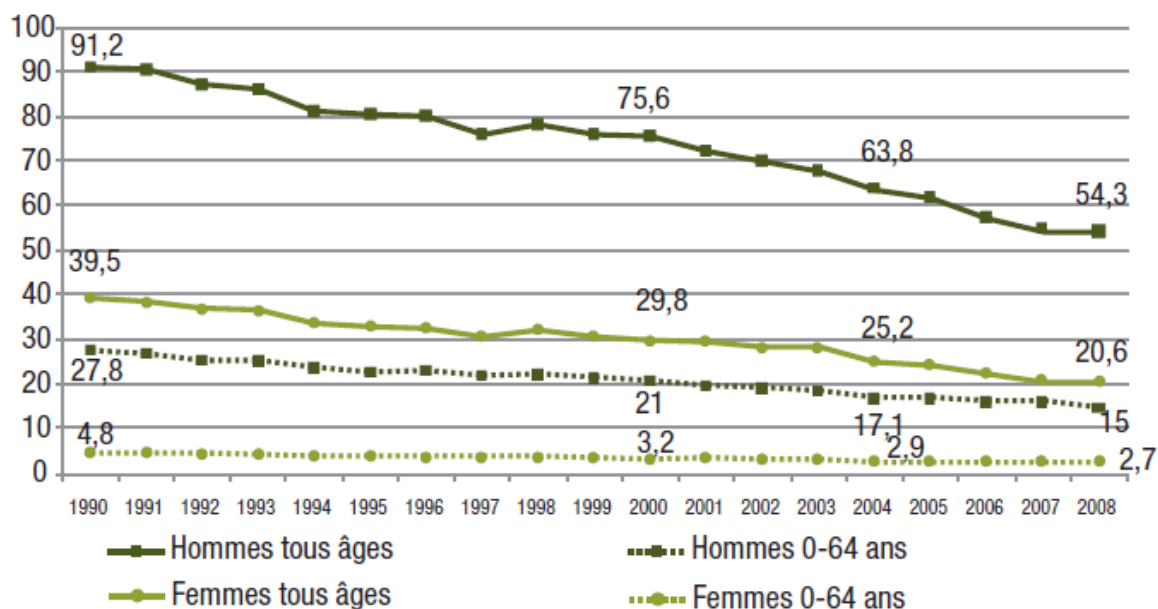


Figure 12. Evolution du taux de décès par cardiopathie ischémique pour 100 000 habitants entre 1990 et 2008. D'après Aouba *et al.*, 2011.

D. Facteurs de risque

Les facteurs de risque d'IDM, aussi bien génétiques qu'environnementaux, sont les mêmes que pour les principales pathologies cardiovasculaires liées à l'athérosclérose et sont regroupés en deux catégories : les facteurs de risques modifiables et les facteurs de risques non modifiables.

Parmi les facteurs de risque modifiables on recense le tabagisme, l'hypertension, l'hypercholestérolémie, l'obésité, le diabète ainsi que le stress et la sédentarité. Les facteurs de risque non modifiables sont : l'âge, le sexe et l'hérédité cardiovasculaire (Mendis *et al.*, 2011).

E. Biomarqueurs d'IDM

Les troponines cardiaques, et plus particulièrement la TnT et la TnI constituent des biomarqueurs spécifiques de la souffrance myocardique puisque ces troponines sont exprimées presque exclusivement dans le muscle cardiaque. Les troponines cardiaques existent sous deux formes au sein de la cellule cardiaque. Environ 10% des troponines sont libres dans le cytoplasme de la cellule alors que le reste, soit environ 90% des troponines, fait partie intégrante de l'appareil contractile avec le complexe actine-myosine-troponine (Reddy *et al.*, 2015).

En conditions physiologiques, les troponines libres peuvent être secrétées dans le sang suite au renouvellement des composants des cellules myocardiques. En cas de souffrance cardiaque comme lors d'une ischémie modérée, la sécrétion des troponines cardiaques libres va augmenter. En revanche en cas d'ischémie sévère entraînant la nécrose d'une partie du myocarde comme lors d'un IDM, le système contractile composé du complexe actine-myosine et des troponines se dissocie permettant aux troponines complexées d'être à leur tour secrétées. L'augmenter du niveau plasmatique des troponines permet de témoigner de cette souffrance cardiaque (Reddy *et al.*, 2015).

Les biomarqueurs de l'IDM ont nettement évolué ces dernières années. En pratique clinique, la myoglobine et l'isoforme cardiaque de la créatine kinase (CK-MB en particulier) ont laissé place aux dosages de la TnT et de la TnI plus spécifiques, plus sensibles et donc détectables plus précocement (Figure 13) (Bruins Slot *et al.*, 2013).

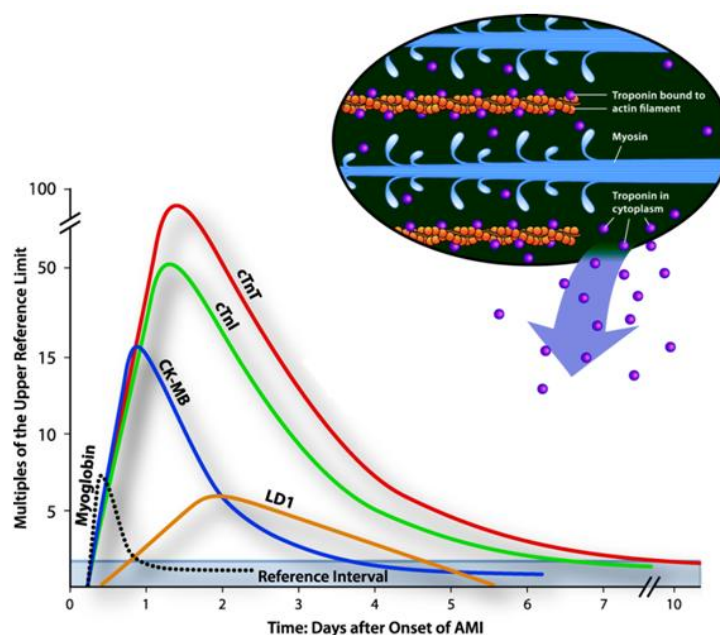


Figure 13. Cinétique des biomarqueurs plasmatiques de l'IDM dans les 10 jours après l'infarctus. CK-MB : isoforme cardiaque de la créatine kinase ; LD1 : lactate déshydrogénase 1, cTnI : troponine I cardiaque ; cTnT : troponine T cardiaque. D'après Archan *et al.*, 2010.

En dépit de sa bonne valeur prédictive d'IDM, le dosage de la myoglobine n'est absolument pas spécifique de la souffrance cardiaque et nécessite de plus d'être réalisé dans une fenêtre de temps

assez réduite (1 à 3h après l'évènement). Le dosage de l'isoforme cardiaque de la CK-MB quant à lui, bien qu'il permette d'évaluer spécifiquement la souffrance cardiaque, nécessite également d'être réalisé dans une fenêtre de temps assez réduite (3 à 4h après l'évènement) et apporte à l'heure actuelle peu d'informations complémentaires au dosage des troponines. En revanche, les troponines cardiaques T et I sécrétées en grande quantité en réponse à l'IDM sont détectables dans le sang, grâce à un dosage hypersensible, pendant environ 10 et 7 jours respectivement. Elles permettent ainsi de poser le diagnostic d'IDM plus aisément (Bruins Slot *et al.*, 2013).

IV. Remodelage ventriculaire gauche

A. Définition

Le RVG correspond à l'ensemble des modifications biochimiques, structurales, métaboliques et fonctionnelles du VG en réponse à un stress chronique tels que l'hypertension ou un évènement cardiaque comme l'IDM (Tham *et al.*, 2015). Ce processus biologique est un mécanisme compensatoire qui, dans le cadre du RVG post-IDM, permet dans un premier temps de lutter contre le stress lié à l'IDM puis de palier l'augmentation de la charge de travail du cœur par une hypertrophie du VG. Cette hypertrophie du VG, liée à une augmentation de la taille des cardiomyocytes et de la masse du myocarde, permet de normaliser les contraintes pariétales mais aussi d'augmenter le volume d'éjection systolique afin de maintenir, au moins dans un premier temps, le débit cardiaque en dépit de la baisse de contractilité du cœur (Tiyagura *et al.*, 2006). Néanmoins à long terme, la dilatation du VG devient inadaptée car elle génère à son tour des contraintes pariétales déclenchant un cercle vicieux qui concourt au développement de l'IC (Tham *et al.*, 2015).

Le RVG est un processus évolutif et dynamique qui peut être représenté schématiquement en 2 étapes : une phase d'hypertrophie compensée et une phase d'hypertrophie décompensée (Figure 14).

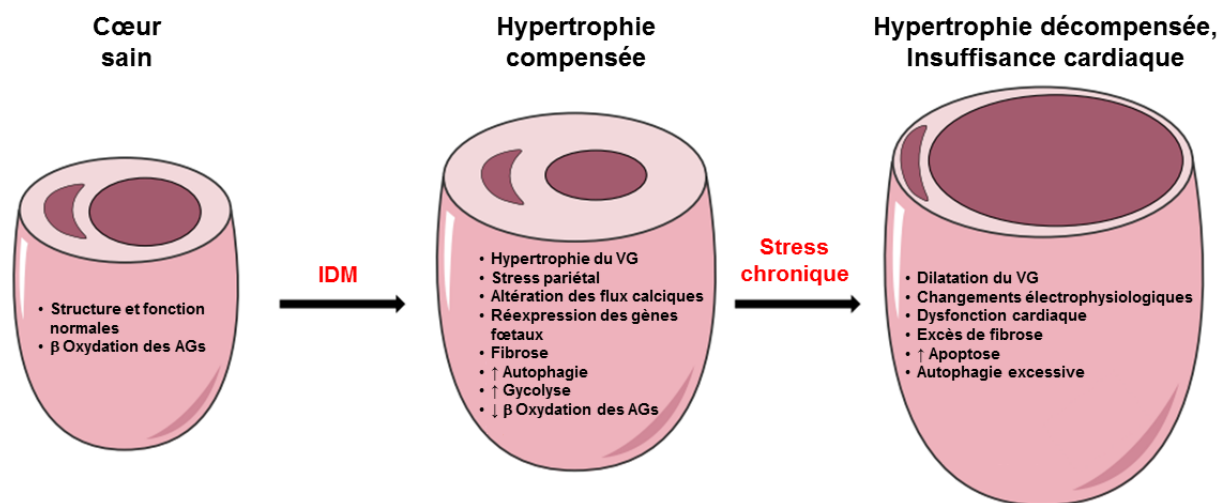


Figure 14. Représentation schématique du RVG : aspects morphologiques, biologiques et biochimiques. AGs : acides gras ; VG : ventricule gauche. Adapté de Tham *et al.*, 2015.

La première phase du RVG correspond à la phase compensatoire qui débute dans les premières minutes suivant l'IDM et s'étend jusqu'à plusieurs semaines. Elle est caractérisée par une expansion et un amincissement de la zone infarctée (Tiyyagura *et al.*, 2006). Au cours de cette phase, un ensemble de changements structurels, métaboliques, biochimiques et moléculaires vont de concert avec l'hypertrophie du cœur, permettre de maintenir la fonction cardiaque (Grossman *et al.*, 1975).

La deuxième phase du RVG correspond à la phase décompensée qui s'étend de quelques mois à un an après l'IDM. Au cours de cette phase, le stress chronique engendré par l'hypertrophie du VG va entraîner sa dilatation, altérer de manière définitive les fonctions contractiles du cœur et permettre de cette manière le développement de l'IC (Tham *et al.*, 2015).

B. Mécanismes physiopathologiques

Le RVG s'accompagne de la modulation d'un grand nombre de processus biologiques. La perturbation des flux calciques, la réexpression des gènes fœtaux, la modulation du métabolisme énergétique, le stress oxydant, l'inflammation, la mort cellulaire ou encore la modulation de l'expression des protéines sarcomériques sont autant d'éléments qui participent au processus de RVG et à l'installation de l'IC (Tham *et al.*, 2015).

1. Flux calciques

Dans le cœur sain, les flux calciques jouent un rôle central puisqu'ils régulent la contraction du cœur. En effet, la dépolarisation du cardiomyocyte par un potentiel d'action va entraîner l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule via les canaux calciques de type L localisés au niveau des tubules transverses (tubules T). Cette entrée modeste de Ca^{2+} va activer les récepteurs à la ryanodine de type 2 (RyR2) localisés au niveau de la membrane du réticulum sarcoplasmique. Cette activation va entraîner la libération massive des stocks calciques contenus dans le réticulum sarcoplasmique (Figure 15) (Periasamy *et al.*, 2008 ; Tham *et al.*, 2015). L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire va promouvoir la fixation de Ca^{2+} sur la TnC au niveau des sarcomères, favorisant l'interaction actine–myosine. La formation d'un pont entre filaments-fins et filaments épais est à l'origine de la contraction cardiaque (Solaro, 2010). En diastole, la concentration en Ca^{2+} intracellulaire va revenir à son niveau basal grâce à plusieurs systèmes : expulsion du Ca^{2+} hors de la cellule par les échangeurs $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ et par une pompe $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$, réabsorption du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique par la protéine endo/sarcoplasmique Ca^{2+} ATPase SERCA2a (pour *sarcoplasmic réticulum Ca^{2+} ATPase*) (Bers, 2006). L'activité de cette pompe est régulée par le phospholamban (PLB) dont la phosphorylation par les protéines kinases A (PKA) et la protéine kinase II calcium-calmoduline dépendante (CaMK II) en thréonine (Thr) 16 et Thr17 respectivement, lève l'inhibition de la pompe SERCA2 (Figure 15) (Periasamy *et al.*, 2008 ; Tham *et al.*, 2015).

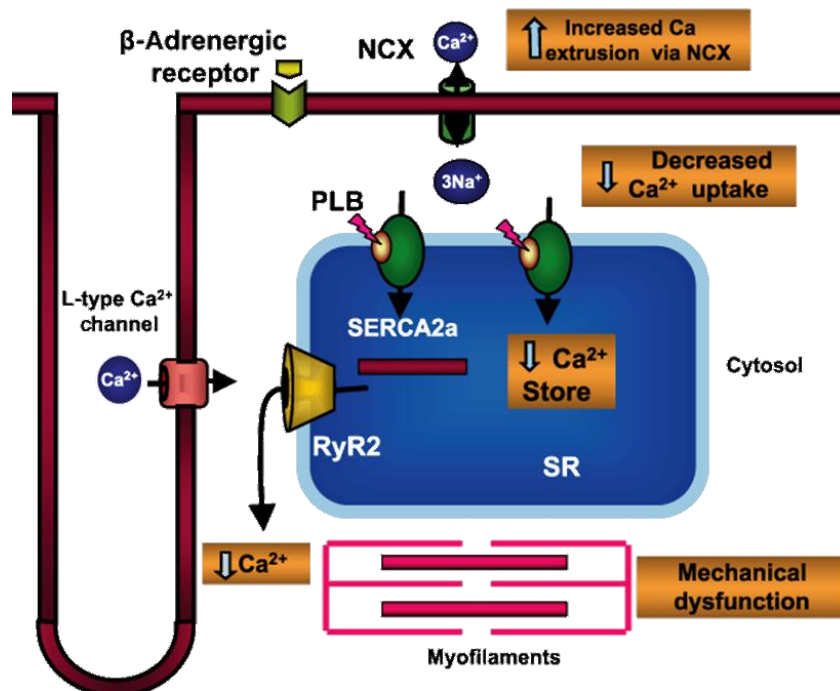


Figure 15. Représentation schématique de l'altération des flux calciques au cours du RVG. NCX : échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; PLB : phospholamban ; RyR2 : récepteur à la ryanodine de type 2 ; SR : réticulum sarcoplasmique (Periasamy *et al.*, 2008).

La perturbation de ces flux calciques entrant et sortant contribue à la dysfonction contractile observée au cours du RVG et de l'IC. La modulation de l'expression et/ou l'activité de la pompe SERCA2a consécutivement à un défaut de phosphorylation du PLB, la dysfonction des RyR2 ou encore l'altération de la structure des tubules T sont à l'origine de ces perturbations (Tham *et al.*, 2015).

En effet, une diminution de l'expression de SERCA2a a été mise en évidence dans des modèles expérimentaux d'IC chez le cochon et le chien (Kawase *et al.*, 2008 ; Rourke *et al.*, 1999) mais aussi chez l'homme (Hasenfuss *et al.*, 1994 ; Arai *et al.*, 1993). L'altération de l'expression et/ou de l'activité de la pompe SERCA2a au cours du RVG entraînerait d'une part une accumulation de Ca^{2+} intracellulaire empêchant la cellule de se relaxer et d'autre part, une diminution du stock de Ca^{2+} au niveau du réticulum sarcoplasmique altérant significativement les capacités contractiles du cœur (Tham *et al.*, 2015).

La dysfonction des RyR2 se matérialise par une fuite des stocks de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique menant progressivement à leur vidange, à l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire et à l'augmentation de la fréquence des arythmies par post-dépolarisation tardive (Bers *et al.*, 2014).

L'altération de la structure des tubules T au cours du RVG notamment en terme d'espacement entre les tubules semble également contribuer à la dysfonction contractile du VG et au développement de l'IC (Crossman *et al.*, 2011).

2. Réexpression des gènes fœtaux

Au cours du RVG, la transition entre hypertrophie compensée et décompensée est marquée par la réexpression de gènes fœtaux c'est-à-dire de gènes initialement impliqués dans le développement cardiaque embryonnaire (Arai *et al.*, 1993). Parmi ces gènes, les peptides natriurétiques de type A et B (ANP / BNP) ont été identifiés. En se fixant sur leurs récepteurs, l'ANP et le BNP entraînent une vasodilatation et par conséquent une diminution de la pression artérielle. La réexpression de l'isoforme squelettique de l' α -actine a également été décrite (Taegtmeyer *et al.*, 2010). Cette isoforme squelettique en remplaçant l'isoforme cardiaque de l'actine pourrait altérer directement la contractilité des sarcomères.

3. Métabolisme énergétique

Avec une consommation quotidienne en ATP 15 à 20 fois supérieure à son poids, le cœur est un des organes les plus avides d'énergie. Les cardiomyocytes disposent d'une réserve d'ATP réduite, ne permettant que quelques contractions et doivent donc produire en permanence une quantité d'ATP suffisante pour assouvir leurs besoins énergétiques. Une telle synthèse d'ATP est possible grâce à la présence de nombreuses mitochondries au sein des cellules musculaires cardiaques qui occupent environ 30% de son volume. Chez le sujet adulte sain, 60 à 90% de l'énergie nécessaire au bon fonctionnement du cœur provient de la β -oxydation des acides gras. Le reste, soit 10 à 40%, provient du catabolisme du glucose (Tham *et al.*, 2015).

La β -oxydation des acides gras ainsi que la glycolyse vont aboutir à la synthèse d'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) permettant d'alimenter le cycle de Krebs et ainsi d'entretenir la production de nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH). La réoxydation du NADH au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie s'accompagne de la création d'un gradient de proton permettant la production d'ATP (Figure 16).

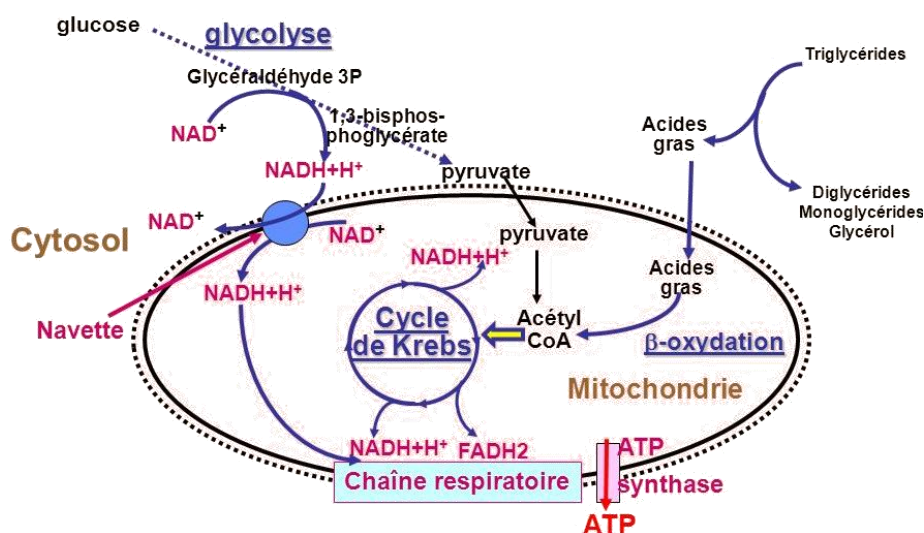


Figure 16. Représentation schématique des différentes sources d'énergie pour la cellule musculaire cardiaque.

Comme décrit précédemment, l'augmentation de la charge de travail du cœur au cours du RVG implique un accroissement de ses besoins énergétiques. Pour répondre à cette demande le cœur change de substrat préférentiel (Taegtmeyer, 2002). En effet, la β -oxydation des acides gras diminue au profit de la glycolyse. Ces changements sont en relation avec la modulation de l'activité et/ou de l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la glycolyse et la β -oxydation des acides gras telles que l'isoforme α du récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α) (Lopaschuk *et al.*, 2010). Ces changements sont d'autant plus adaptés en conditions d'hypoxie post-ischémique car la glycolyse est nettement moins coûteuses en oxygène que la β -oxydation des acides gras (Tham *et al.*, 2015) mais au prix d'une diminution importante de la production d'ATP.

4. Stress oxydant

Le stress oxydant survient lorsqu'il existe un déséquilibre entre la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la capacité du cœur à détoxifier les radicaux libres de l'oxygène tels que l'anion superoxyde (O_2^-) et le radical hydroxyle (OH^\cdot) ou à éliminer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les hypochlorites (OCl^-) (Tham *et al.*, 2015 ; Münzel *et al.*, 2015).

Un grand nombre d'études ont souligné le rôle important joué par les ROS dans le RVG (Heymes *et al.*, 2003). Plusieurs protéines ou complexes protéiques tels que la chaîne respiratoire de la mitochondrie, la NADPH oxydase (oxydo-réductase de classe I) et l'oxyde nitrique synthase (eNOS) ont été identifiées comme sources de ROS au cours du RVG et de l'IC (Figure 17).

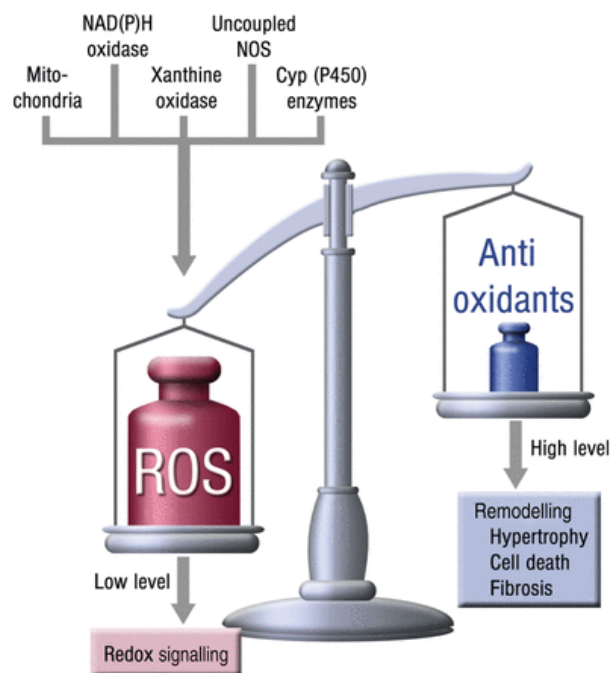


Figure 17. Principales sources de ROS au cours du RVG et de l'IC et déséquilibre entre leur ROS et la capacité du cœur à les éliminer (Münzel *et al.*, 2015).

En effet, au cours de la dilatation du VG il a été mis en évidence une augmentation de l'activité de la NADPH oxydase ainsi qu'un découplage de la eNOS conduisant tous deux à un accroissement de la production d' O_2^- (Heymes *et al.*, 2003). De même, l'augmentation de la production d'ATP au cours de l'hypertrophie cardiaque entraîne une augmentation de la production d' O_2^- , d' H_2O_2 et d' OH^- consécutivement à la suractivation de la chaîne respiratoire mitochondriale (Münzel *et al.*, 2015).

L'augmentation de la production de ROS au cours du RVG va entraîner une augmentation de l'oxydation des acides nucléiques, des protéines et des lipides ce qui affecte considérablement les mécanismes cellulaires dans lesquels ils sont impliqués (Münzel *et al.*, 2015).

5. Inflammation, fibrose et remodelage de la matrice extracellulaire

a) Inflammation

Divers stress cellulaires, tels que l'IDM peuvent stimuler la réponse immunitaire et entraîner une réponse inflammatoire du tissu lésé. Cette inflammation lorsqu'elle est contrôlée, constitue une réponse adaptative puisqu'elle vise à former de nouveaux vaisseaux sanguins dans le but d'irriguer le tissu endommagé mais aussi à cicatriser la zone lésée.

Les dommages causés par la nécrose du tissu suite à un IDM vont entraîner la production de « signaux de dangers » tels que l'interleukine (IL)- 1α , des protéines de choc thermique (Hsp), l'ARN extracellulaire ou encore la protéine HMGB1 (pour *High-MobilityGroup Box 1*) qui en activant les récepteurs de mort cellulaire de type Toll (TLR) vont promouvoir l'activité du facteur de transcription NF- κ B (pour *Nuclear Factor-kappa B*) (Saxena *et al.*, 2015). L'activation de NF- κ B va induire la synthèse de plusieurs protéines de l'inflammation telles que les cytokines pro-inflammatoires (tumor necrosis factor (TNF)- α , IL- 1β , and IL-6) et les chémokines ainsi que l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales vasculaires. Ces molécules d'adhésion permettent le recrutement de leucocytes au niveau de la zone endommagée afin de la réparer (Figure 18) (Fang *et al.*, 2015).

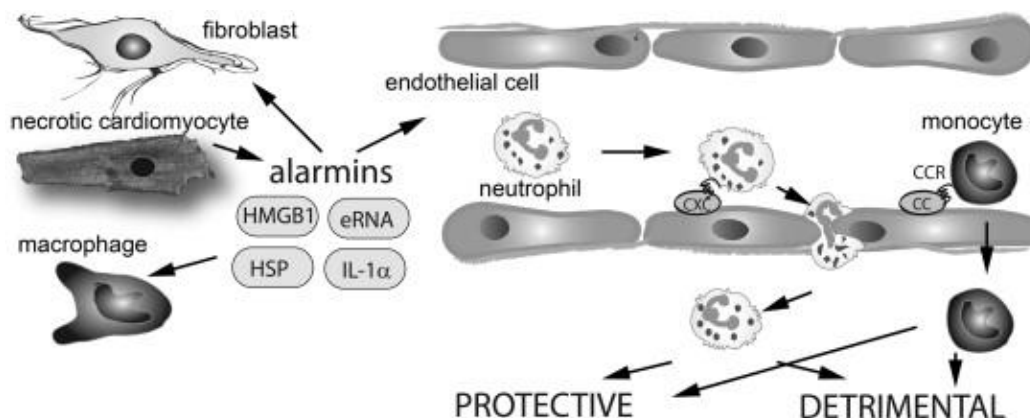


Figure 18. Représentation schématique de la réponse inflammatoire post-IDM. eRNA : ARN extracellulaire ; HMGB1 : highmobility group box 1 ; HSP : protéines de choc thermique ; IL- 1α : interleukine- 1 α (Saxena *et al.*, 2015).

Néanmoins si cette inflammation est excessive ou devient chronique, elle peut endommager le tissu cardiaque en altérant la contractilité des cardiomyocytes, en entraînant l'augmentation de la production de ROS, l'apoptose et la fibrose et ainsi participer au RVG et au développement de l'IC (Fang *et al.*, 2015 ; Tham *et al.*, 2015).

b) Fibrose et remodelage de la matrice extracellulaire

En post-IDM, la réponse inflammatoire est un élément nécessaire et indispensable à la réparation de la lésion cardiaque. Au niveau de cette lésion, les cellules cardiaques nécrosées incapables de se régénérer sont remplacées par une cicatrice fibreuse de matrice extracellulaire (MEC) composée principalement de collagène, de fibronectine, de métalloprotéinases matricielles (MMPs) et d'inhibiteurs tissulaires des MMP (TIMPs). Cette cicatrisation de la zone endommagée est possible grâce à l'action conjointe des macrophages, des lymphocytes recrutés suite à la lésion du tissu mais aussi des cellules endothéliales et des cardiomyocytes résidents (Saxena *et al.*, 2015 ; Fang *et al.*, 2015).

Dans le cœur sain, la MEC consiste en un réseau organisé autour des cardiomyocytes servant d'échafaudage aux éléments cellulaires mais aussi de support aux processus mécaniques et électriques tels que la coordination de la fonction contractile et le couplage électrique entre cardiomyocytes. Au sein de cette MEC, les fibroblastes régulent la synthèse de collagène (de type I et III principalement) via la sécrétion de cytokines, de facteurs de croissance et de MMPs. Au cours du RVG, l'accumulation de collagène au niveau du cœur consécutive à l'activation et la prolifération accrue des fibroblastes cardiaques différenciés en myofibroblastes concoure au processus physiopathologique de RVG et au développement de l'IC (Tham *et al.*, 2015).

6. Mort cellulaire

Les cardiomyocytes en tant que cellules post-mitotiques (Bergmann *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2015 ; Linton *et al.*, 2015) ont une capacité de régénération très limitée c'est pourquoi dans le cœur sain, le taux de mort cellulaire est assez faible. La perte massive de cardiomyocytes par nécrose à la suite d'un IDM altère significativement les capacités contractiles du myocarde et est à l'origine du RVG. Au cours de ce RVG, la perte progressive des cardiomyocytes par apoptose et autophagie contribue à la progression de la dysfonction cardiaque et au développement de l'IC. Il a été décrit que suite à un IDM, l'autophagie est activée pour venir en relais au système ubiquitine-protéasome (UPS) quand ses capacités de dégradation sont dépassées (Tannous *et al.*, 2008). L'autophagie en assurant la dégradation et le recyclage des protéines endommagées et des agrégats protéiques pour la synthèse de nouvelles protéines, participe à l'hypertrophie des cardiomyocytes et au remodelage des sarcomères. Néanmoins un excès d'autophagie peut aussi mener à la dysfonction et à la mort cellulaire. La transition entre hypertrophie compensée et décompensée du VG semble marquée par l'induction de la mort cellulaire par apoptose (Maejima *et al.*, 2014).

7. Protéines sarcomériques

La dysfonction contractile observée au cours du RVG peut être directement en lien avec la modulation de l'expression d'une ou plusieurs protéines sarcomériques mais aussi avec leur régulation post-traductionnelle.

Au cours du RVG il a été montré que l'expression de plusieurs protéines sarcomériques est modulée dans le VG hypertrophié. C'est le cas de la chaîne lourde de la myosine qui voit l'expression de son isoforme α diminuer au cours du RVG au profit de l'expression de l'isoforme β . Ces deux isoformes cardiaques de la myosine ont des propriétés contractiles distinctes. Ainsi, le remplacement de l'isoforme α de la myosine par l'isoforme β au cours du RVG pourrait modifier de manière significative la force de contraction des cardiomyocytes (Krenz *et al.* 2004).

De même, l'expression ventriculaire de la chaîne légère de la myosine est modulée au cours de l'hypertrophie cardiaque. En effet, le ratio isoforme atriale de la chaîne légère de la myosine (ALC-1) / isoforme ventriculaire (VLC-1) augmente dans les ventricules. Au niveau fonctionnel, le remplacement de la VLC-1 par l'ALC-1 se traduit par une diminution de la sensibilité des myofilaments au Ca^{2+} (Yar *et al.*, 2014).

La réexpression de l'isoforme squelettique de l' α -actine comme décrit précédemment pourrait altérer la contractilité cardiaque des sarcomères (Taegtmeyer *et al.*, 2010).

Enfin, la modulation de l'expression des 4 isoformes de la TnT ainsi que des isoformes de la titine pourrait également avoir lieu au cours de l'hypertrophie ventriculaire et pourrait participer à la dysfonction contractile (Yin *et al.*, 2015).

Il a été mis en évidence récemment que les modifications post-traductionnelles des protéines sarcomériques pourraient également avoir un impact sur les propriétés contractiles du cœur. Ainsi, dans un modèle expérimental de souris hypertendues, la modulation du statut redox des protéines du myofilament entraînait une augmentation de la sensibilité des myofilaments au Ca^{2+} à l'origine de la dysfonction contractile du cœur. L'oxydation de la titine dans un modèle murin d'IDM semble lui accroître sa flexibilité (Yin *et al.*, 2015). Ces données soulignent l'importance d'explorer les modifications post-traductionnelles des protéines sarcomériques qui participent probablement activement à la transition entre hypertrophie compensée du VG et dysfonction contractile du myocarde.

8. Principales voies de signalisation

De nombreuses voies de signalisation sont impliquées dans le processus de RVG. Au centre de ces voies de signalisation, les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) qui sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, participent activement à l'hypertrophie cardiaque. Au niveau du cœur les récepteurs α et β adrénergiques, le récepteur de type 1 à l'angiotensine II et le récepteur à l'endothéline sont les GPCRs majoritaires (Cotecchina *et al.*, 2015).

Introduction

Au cours du RVG, le système rénine-angiotensine-aldostérone, activé en réponse à une surcharge de pression, est impliqué dans l'hypertrophie et la dilatation du VG (Münzel *et al.*, 2015). L'effecteur de cette voie de signalisation, l'angiotensine II, résulte du clivage de l'angiotensinogène par la rénine en angiotensine I. Le clivage de l'angiotensine I par l'enzyme de conversion à l'angiotensine aboutit à la production d'angiotensine II. Après un IDM, la mise en évidence de la présence d'angiotensine I et II mais aussi d'angiotensinogène au niveau de la zone infarctée a permis de mettre en évidence la production locale d'angiotensine II. Cette dernière va activer la NADPH oxydase qui à son tour va promouvoir la production de ROS et la synthèse de TNF β (Shearer *et al.*, 2013). En se fixant sur les récepteurs cardiaques à l'angiotensine I, l'angiotensine II entraîne la production d'aldostérone, induit une rétention de sodium et d'eau, une vasoconstriction des artéoles, une augmentation de la résistance vasculaire, une fibrose cardiaque, une hypertrophie cardiaque et la dysfonction du VG (Figure 19) (Buggey *et al.*, 2015).

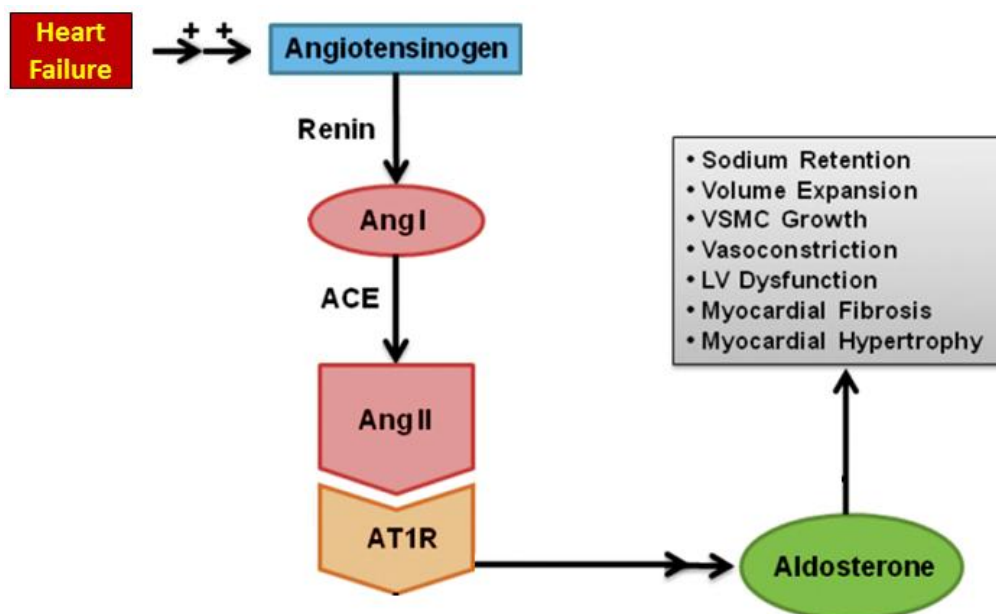


Figure 19. Implication du système rénine-angiotensine-aldostérone dans le développement du RVG et de l'IC. ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine ; Ang I : angiotensine de type 1 ; Ang II : angiotensine de type 2 ; ART1 : récepteur à l'angiotensine de type 1 ; LV : ventricule gauche ; VSMC : cellules musculaires lisses vasculaires. D'après Buggey *et al.*, 2015.

V. Desmine

La Desmine est une protéine de la famille des filaments intermédiaires retrouvée dans l'ensemble des cellules musculaires. Dans le génome humain, la Desmine est codée par un gène unique (*desmin* ou *DES*) localisé sur le bras long du chromosome 2 en position 35 (de la 219 418 376^{ème} paire de bases à la 219 426 738^{ème}) (Figure 20) (Bär *et al.*, 2005).

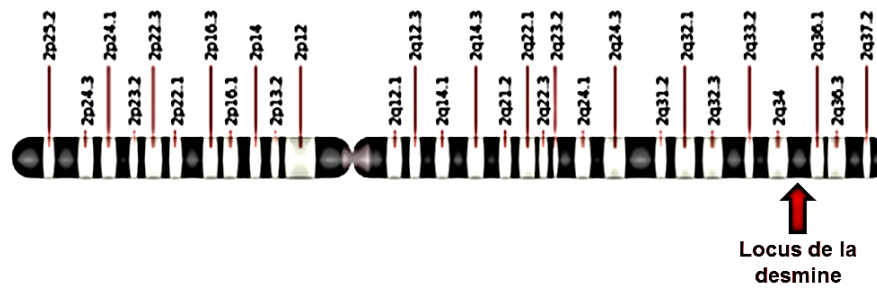


Figure 20. Représentation schématique du chromosome 2 humain et localisation du locus de la Desmine.

La Desmine est l'un des premiers marqueurs de différenciation musculaire (Herrmann *et al.*, 1989 ; Winter *et al.*, 2014). En effet, au cours du développement embryonnaire murin la Desmine apparaît dès le 8^{ème} jour de gestation d'abord au niveau du neuroectoderme (8,25^{ème} jour) puis au niveau des cellules précurseurs cardiaques (8,5^{ème}) et enfin au niveau du myotome des somites (9^{ème} jour) (Fürst *et al.*, 1989 ; Schaart *et al.*, 1989).

A. Structure

1. Structure primaire

La Desmine est une protéine d'environ 53 kDa (53,536 kDa exactement) composée chez l'homme de 470 acides aminés. Au niveau moléculaire, la Desmine comme toutes les protéines des filaments intermédiaires se décompose en trois domaines : une tête en position N-terminale (acides aminés 1 à 108), un corps (acides aminés 109 à 412) et une queue en position C-terminale (acides aminés 413 à 470) (Snider *et al.*, 2014 ; Winter *et al.*, 2014).

La structure primaire du corps de la Desmine est semblable à celle des autres protéines qui constituent la famille des filaments intermédiaires telle que la vimentine alors que ses extrémités N- et C-terminale sont moins conservées. En effet, le corps de la Desmine et des protéines des filaments intermédiaires en général est impliqué dans leur polymérisation alors que la tête et la queue sont responsables de l'hétérogénéité des différentes protéines au sein de cette famille (Snider *et al.*, 2014).

Parmi les 84 acides aminés qui constituent la tête de la Desmine, un grand nombre sont des arginines. Ces dernières semblent jouer un rôle central dans la polymérisation de la Desmine puisqu'une mutation (substitution ou délétion) de ces arginines impacte la capacité de cette protéine à former un réseau de filaments matures (Winter *et al.*, 2014).

2. Structure secondaire

Au niveau structural, la tête et la queue de la Desmine, extrémités N- et C-terminale respectivement, sont plutôt globulaires (Snider *et al.*, 2014) alors que le corps de la Desmine est composé de quatre segments α hélicoïdaux (segments 1A, 1B, 2A et 2B) connectés entre eux par

trois segments flexibles, les linkers L1, L12 et L3. Ces segments α hélicoïdaux jouent un rôle central dans la formation du réseau de filaments de Desmine. (Figure 21) (Bär *et al.*, 2005 ; Winter *et al.*, 2014).

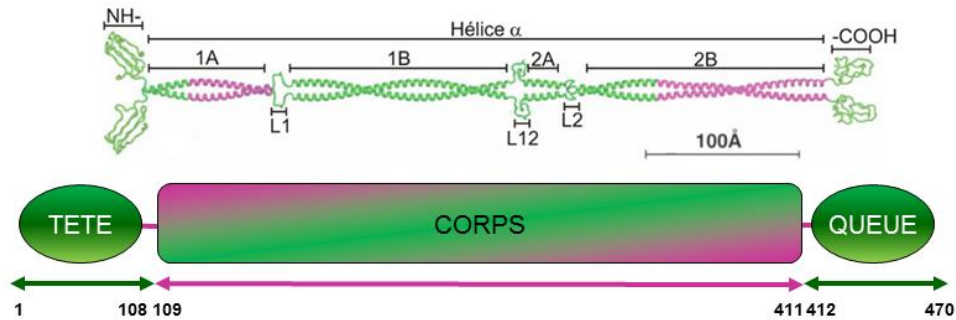


Figure 21. Représentation schématique de la Desmine.

3. Structure tertiaire

A l'instar des autres protéines de filaments intermédiaires, la Desmine polymérise en un réseau tridimensionnel de filaments. Ainsi, les monomères de Desmine vont s'associer de manière parallèle, via leur structure α hélicoïdales, en homodimères qui à leur tour vont s'associer de manière antiparallèle en tétramères solubles, unités de base du filament intermédiaire. L'assemblage latéral de huit tétramères permet la formation de structures appelées unités de longueur du filament. Ces dernières vont s'associer bout à bout pour former un filament court ou protofilament qui après compaction et enroulement avec d'autres protofilaments va former un filament intermédiaire de Desmine de 10 nm de diamètre (Figure 22) (Snider *et al.*, 2014 ; Winter *et al.*, 2014).

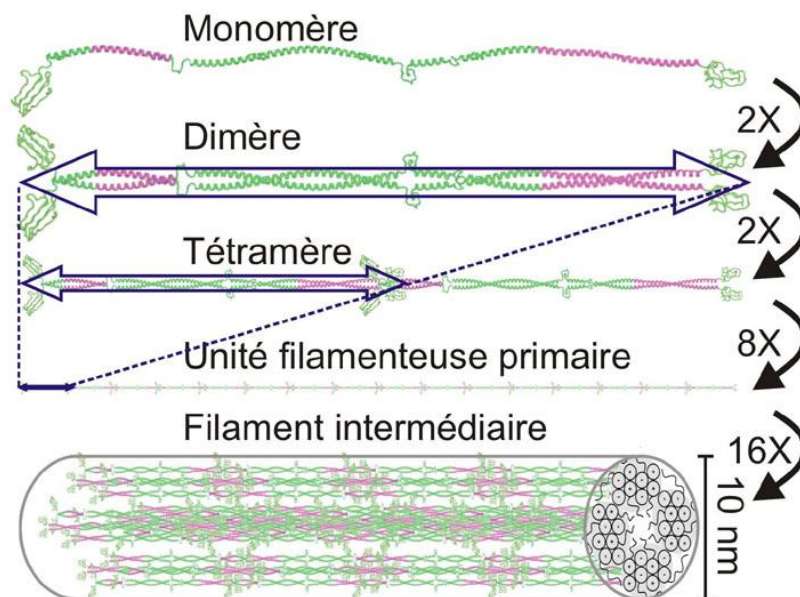


Figure 22. Représentation schématique de la formation des filaments de Desmine.

B. Fonction au sein de la cellule cardiaque

La Desmine en tant que principal filament intermédiaire des cellules cardiaques joue un rôle central dans l'architecture des cardiomyocytes. En effet, les filaments de Desmine forment un réseau tridimensionnel qui connecte l'appareil contractile via les disques Z des sarcomères à la fois au noyau de la cellule, aux disques intercalaires et aux costamères de la membrane plasmique, aux mitochondries mais aussi aux autres organites intracellulaires pourvus d'une membrane (Figure 23). De cette manière le réseau de Desmine facilite la communication entre les différents organites intracellulaires, entre les cellules avoisinantes en les rattachant entre elles via les desmosomes des disques intercalaires mais aussi les échanges entre la MEC et le noyau (Winter *et al.*, 2014 ; Capetanaki *et al.*, 2015).

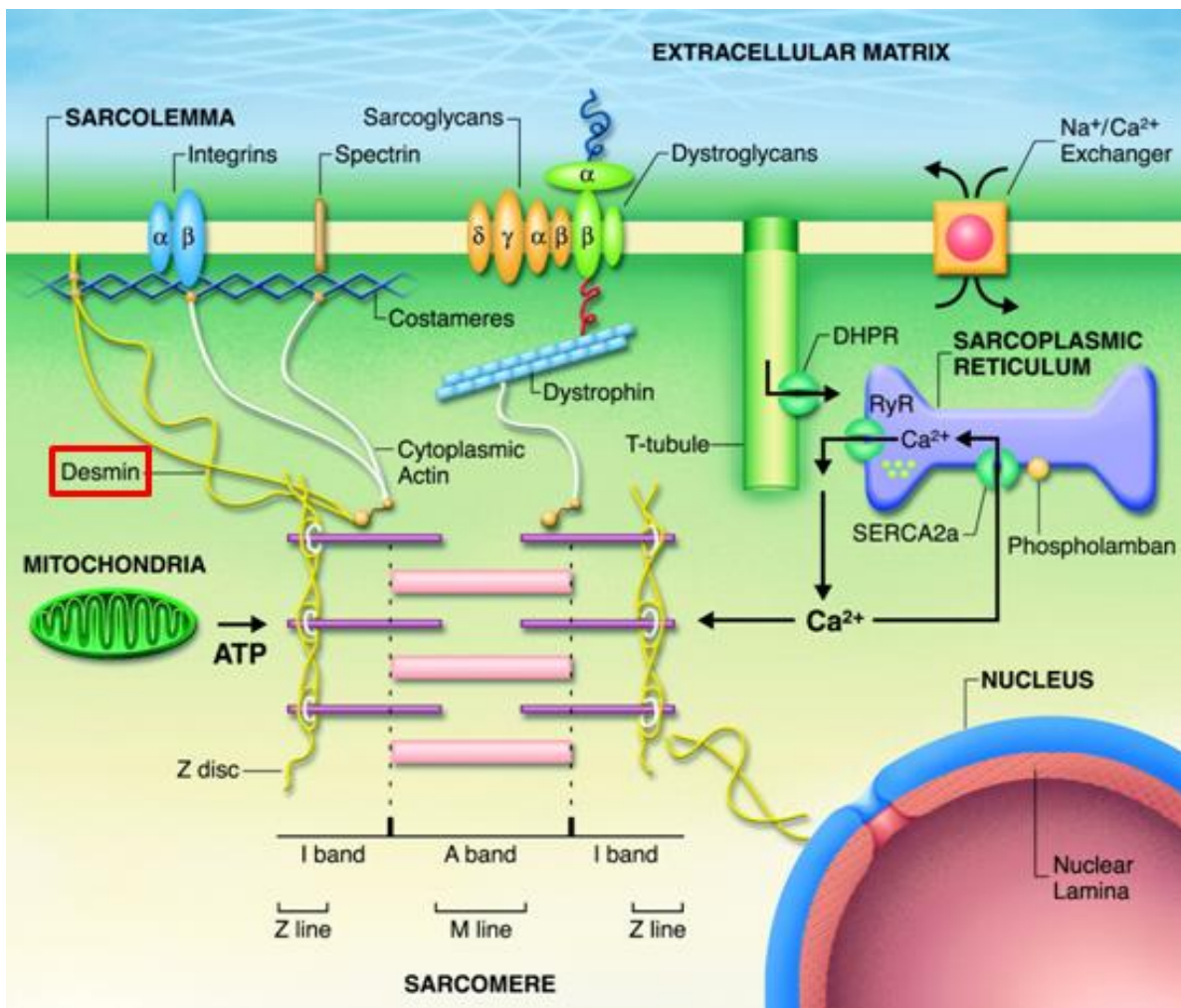


Figure 23. Représentation schématique de l'implication de la Desmine dans l'architecture du cardiomyocyte (Fatkin *et al.*, 2002).

Le réseau de filaments de Desmine est défini dans la littérature comme un intégranteur mécano-chimique de la morphologie et de la fonction cellulaire. En effet, en participant à la charpente du

cytosquelette il assure l'intégrité structurale des cardiomyocytes, en stabilisant le sarcomère au moment de la contraction musculaire et permet la transmission de la force contractile (Goldfarb *et al.*, 2009 ; Winter *et al.*, 2014; Capetanaki *et al.*, 2015). En conférant aux cellules une résistance mécanique notamment à l'étirement, ce réseau assure le maintien de l'intégrité du tissu lors de tels stress (Capetanaki *et al.*, 2015). Au sein de la cellule cardiaque, la Desmine joue un rôle fondamental dans l'intégration des fonctions contractiles et métaboliques des cellules cardiaques par le cytosquelette (Kawajiri, 2003). L'altération de la structure des filaments de Desmine pourrait alors impacter la fonction contractile des cardiomyocytes et à plus large échelle la fonction cardiaque.

En 1996, Milner *et al.* ont montré que l'inactivation du gène de la Desmine chez la souris bien que n'étant pas létale puisque ces souris se développent normalement et sont fertiles, altère l'architecture de l'ensemble des cellules musculaires (cardiaques, squelettiques et lisses) et ce dès le début du développement. En effet, une altération de la structure des myofibrilles résultant d'une part d'un défaut d'alignement des sarcomères les uns par rapport aux autres et d'autre part d'un défaut d'ancrage de ces sarcomères à la membrane plasmique a été mis en évidence chez la souris invalidée pour le gène de la Desmine. Les auteurs ont également mis en évidence une augmentation significative de la quantité de mitochondries qui de plus étaient anormalement enflées. Enfin, l'absence de Desmine engendre un défaut d'adhésion cellulaire se traduisant par l'augmentation de l'espace intercellulaire (Milner *et al.*, 1996 ; Capetanaki *et al.*, 1997). Ces anomalies de la structure des cellules sont encore plus prononcées au niveau du cœur qui présente dès le 5^{ème} jour post-natal des cardiomyocytes dégénérés (Thornell *et al.*, 1997). En médiant la dégénérescence des cardiomyocytes, l'absence de Desmine entraîne la nécrose et la calcification du tissu cardiaque (Milner *et al.*, 1996 ; Capetanaki *et al.*, 1997 ; Thornell *et al.*, 1997).

C. Régulation post-traductionnelle

La Desmine est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles (MPTs) telles que la phosphorylation, l'ADP ribosylation, glycation, l'oxydation, la nitration ou encore l'ubiquitinylation (Inagaki *et al.*, 1988 ; Janué *et al.*, 2007a ; Diguët *et al.*, 2011 ; Cohen *et al.*, 2012). Ces MPTs, impliquant ou non des enzymes, sont dans la majorité des cas localisées au niveau de la tête de la Desmine (Winter *et al.*, 2014) et peuvent avoir un impact sur les différents processus cellulaires faisant intervenir la Desmine tels que la myogenèse, la fusion myoblastique, la division cellulaire ou encore la contraction musculaire (Winter *et al.*, 2014). En effet, l'ensemble des MPTs de la Desmine excepté l'ubiquitinylation qui semble être un signal d'adressage au protéasome en vue de sa dégradation (Diguët *et al.*, 2011), ont été décrites comme interférant dans les processus de polymérisation de la Desmine en filaments intermédiaires (O'Connor *et al.*, 1981 ; Inagaki *et al.*, 1988 ; Winter *et al.*, 2014). La phosphorylation et l'ADP ribosylation en plus d'empêcher la formation de nouveaux filaments de Desmine semblent également induire la dépolymérisation des filaments de Desmine existants. Néanmoins, toutes les MPTs de la Desmine n'ont pas le même effet sur la dépolymérisation des filaments existants (Winter *et al.*, 2014).

1. Phosphorylation

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle dynamique et réversible impliquant de nombreuses kinases et phosphatases qui vont respectivement ajouter ou retirer un groupement phosphate sur un acide aminé hydroxylé (sérine [Ser], thréonine [Thr] ou tyrosine [Tyr]) d'une protéine cible (Figure 24) (Lima *et al.*, 2012).

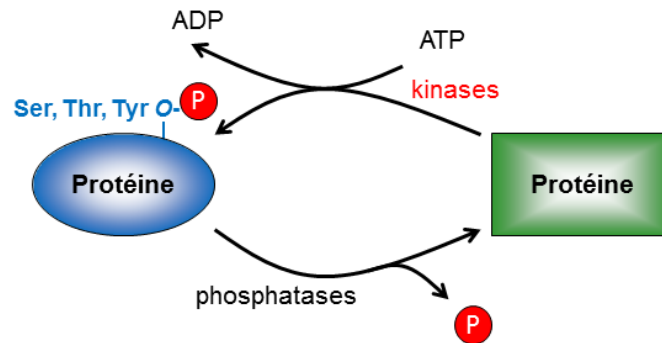


Figure 24. Mécanismes de phosphorylation et déphosphorylation des protéines. Les protéines kinases assurent le transfert d'un groupement phosphate provenant de l'ATP sur les résidus Ser, Thr et/ou Tyr des protéines cibles alors que les phosphatases le retirent.

La modulation du niveau de phosphorylation des protéines est la conséquence d'une activation et/ou d'une inhibition de kinases et phosphatases. Ces enzymes, qui représentent environ 2% du génome humain, jouent un rôle central dans la régulation de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la migration, l'adhésion et la survie cellulaire, l'angiogénèse, la réponse inflammatoire, la régulation du cycle cellulaire, la signalisation intra-cellulaire, la réorganisation du cytosquelette ou encore le développement du système cardiovasculaire (Delom *et al.*, 2006). En effet, la phosphorylation induit des modifications structurales et fonctionnelles de la protéine cible et par conséquent peut moduler son activité (activation ou inhibition dans le cas d'une enzyme) ou sa fonction, induire un changement de sa localisation cellulaire ou encore moduler ses interactions avec d'autres protéines (Lima *et al.*, 2012). On recense actuellement plus de 500 protéines kinases codées par le génome humain pouvant être classées de plusieurs façons. De manière générale, on distingue 2 catégories de kinases en fonction de leur spécificité de substrat : les protéines Tyr kinases et les protéines Ser/Thr kinases (Shchemelinin *et al.*, 2006). Le taux de phosphorylation des résidus Ser est respectivement 10 et 100 fois plus important que celui des résidus Thr et Tyr. Bien qu'elle soit la moins courante, la phosphorylation en Tyr joue un rôle central. En effet, elle permet de réguler l'activité de nombreux facteurs de croissance. De la même manière que les protéines kinases, les protéines phosphatases peuvent être classées en fonction de leur spécificité de substrat. Ainsi, on distingue les protéines Ser/Thr phosphatases et les protéines Tyr phosphatases.

Au niveau de la Desmine, plusieurs sites de phosphorylation ont été identifiés chez le rat par analyses phosphoprotéomiques à haut débit. Certains de ces sites ont par ailleurs été validés chez l'homme. Ces sites de phosphorylation, dont la plupart sont localisés au niveau de la tête de la Desmine, concernent majoritairement des Ser (Lundby *et al.*, 2012 ; Bian *et al.*, 2013). Plusieurs

Introduction

kinases ont d'ores et déjà été montrées impliquées dans la phosphorylation de la Desmine (Tableau 2) néanmoins la liste de ces kinases n'est pas exhaustive puisque la régulation de la phosphorylation d'un grand nombre de ces sites n'a pas été étudiée.

Tableau 2. Sites de phosphorylation de la Desmine identifiés et kinases impliquées.

Kinase impliquée	Site(s) chez l'homme	Implication	Identification
Protein kinase A (PKA)	S45, S60	Fusion des myoblastes	par homologie avec le poulet
Protein kinase C (PKC)	S13, S48, S68	Desminopathies Desminopathies	par homologie avec le poulet
Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)	S7, S32, T76	Division cellulaire	par homologie avec le poulet
p21-activated kinase (PAK)	Différents de Rho-kinase	Contraction musculaire Contraction musculaire	par homologie avec la vimentine
Rho-associated kinase (Rho-kinase)	T17, T76, T77	Division cellulaire	<i>in vitro</i>
Aurora kinase B (Aurora B)	S12, T17, S60	Division cellulaire	<i>in vitro</i>
Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II)	Unknown	IC	A étudier
Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3β)	S28, S32	IC	chez le chien et l'homme
Unknown	S28	Cardiomyopathie dilatée	

D'après Winter *et al.*, 2014

Il a été montré que la phosphorylation de la Desmine a un rôle physiologique au cours de la division cellulaire. En effet, la dépolymérisation de la Desmine consécutive à sa phosphorylation est un phénomène indispensable au bon déroulement de la cytokinèse (Snider *et al.*, 2014) et joue donc un rôle central dans la division cellulaire. La phosphorylation de la Desmine permet également le renouvellement de ses filaments en permettant l'intégration de nouvelles unités de Desmine lors de leur repolymérisation (Snider *et al.*, 2014). Néanmoins, une hyperphosphorylation de la Desmine peut impacter sa capacité à former des filaments voire même induire la dépolymérisation des filaments de Desmine préexistants. Ces derniers pourraient alors s'agréger de façon anarchique et s'accumuler au niveau du cytoplasme des cellules (Caron *et al.*, 1999) entraînant un dysfonctionnement cellulaire. L'hyperphosphorylation de la Desmine pourrait de cette manière altérer l'architecture des sarcomères et serait déterminante pour la fonction locale du cardiomyocyte (Monreal, 2008). Ces modulations du niveau de phosphorylation de la Desmine pourraient participer au développement du RVG et de la dysfonction VG observée au cours de l'IC.

2. Autres modifications post-traductionnelles

Janue *et al.* ont mis en évidence en 2007 une forme oxydée et nitrée de la Desmine dans des biopsies de muscles de patients souffrant de desminopathies. L'oxydation de la Desmine semble moduler sa structure secondaire la rendant plus susceptible à un clivage par les caspases mais moins sensible au clivage par les calpaïnes (Chen *et al.*, 2014).

La Desmine est également la cible de produits avancés de glycation (AGEs) dans les cardiomyopathies dilatées chez la souris mais aussi chez l'homme. Les produits AGEs peuvent se former sur des protéines, des lipides et des groupes d'acides nucléiques et correspondent à une glycation non enzymatique. Au niveau de la Desmine, la formation d'AGEs semble moduler l'organisation de son réseau de filaments. Cette perturbation du réseau de Desmine semble/pourrait

être impliquée dans l'altération de la structure des myofibrilles, la dysfonction mitochondriale ainsi que dans la diminution de la force contractile et des réserves énergétiques du myocarde (Diguët *et al.*, 2011).

Récemment une forme ubiquitinylée de la Desmine a également été mise en évidence dans un modèle murin d'atrophie musculaire. Cette ubiquitylation de la Desmine en réponse à l'augmentation de sa forme phosphorylée au cours de l'atrophie musculaire, semble médiée par l'ubiquitine ligase TRIM32 (pour *Tripartite motif-containing protein 32*) afin de promouvoir la dégradation de la Desmine par le protéasome (Cohen *et al.*, 2012).

D. Pathologies liées à la Desmine

1. Définition

Les pathologies liées à la Desmine ou desminopathies font partie de la famille des myopathies myofibrillaires et se caractérisent au niveau morphologique par la présence au sein de la cellule musculaire d'agrégats protéiques positifs pour la Desmine et par une désorganisation du réseau de myofibrilles (Clemen *et al.*, 2013).

2. Cause

Les desminopathies sont des maladies génétiques rares (moins de 1 cas pour 2 000 patients) dues à une ou plusieurs mutations sur le gène de la Desmine ou de sa chaperonne l' α B-Crystalline (Paulin *et al.*, 2004) qui peuvent se transmettre de manière autosomique dominante mais aussi autosomique récessive. Pas moins de 61 mutants différents de Desmine étaient recensés en 2012 (Clemen *et al.*, 2013). Ces mutants affectent à la fois l'organisation des filaments intermédiaires, la fonction des mitochondries, les différentes voies de signalisation dans lesquelles la Desmine est impliquée mais aussi le contrôle qualité des protéines et entraînent de cette manière une dégénérescence des muscles parfois dès l'enfance et qui s'aggrave avec le temps. Les desminopathies peuvent se déclarer à tous âges mais dans la plupart des cas se manifestent à l'âge adulte entre 20 et 40 ans (Clemen *et al.*, 2013).

3. Phénotype

Sur le plan clinique, les desminopathies se caractérisent notamment par une faiblesse musculaire. Une méta-analyse réalisée en 2010 a montré que dans environ deux tiers des cas, la faiblesse musculaire constatée chez les patients souffrant de desminopathie touche les muscles proximaux et distaux en particulier au niveau des jambes alors que des myopathies distales et proximales sévères ont été diagnostiquées dans 27% et 6% des cas respectivement (Spaendonck-Zwarts *et al.*, 2011). Dans cette même étude, les patients souffrant d'une desminopathie présentaient la plupart du temps des troubles respiratoires, une véritable insuffisance respiratoire (dans 26% des cas) et une atteinte

cardiaque (dans environ 7 cas sur 10) (Spaendonck-Zwarts *et al.*, 2011). Ces troubles cardiaques peuvent être imputés soit à une atteinte du myocarde lui-même pouvant mener à l'IC, soit à un défaut de conduction de l'influx nerveux au niveau du cœur et du rythme cardiaque secondaires à une atteinte du tissu nodal (Clemen *et al.*, 2013). La cataracte, des troubles de la déglutition ou encore du transit intestinale (diarrhée, constipation voire même pseudo-obstruction intestinale) ont également été décelés (Spaendonck-Zwarts *et al.*, 2011).

Au niveau moléculaire, les desminopathies se caractérisent par une accumulation cytoplasmique d'agrégats protéiques dans les cellules musculaires cardiaques et squelettiques. Ces agrégats sont notamment composés de Desmine et de sa chaperonne l' α B-Crystalline mais également de nombreuses autres protéines identifiées récemment telles que la vimentine, l'HspB1 (pour *Heat Shock 27kDa Protein 1*), la filamine C ou encore la sous-unité β 4 du protéasome (Maerkens *et al.*, 2013). Cette accumulation d'agrégats protéiques pourrait être due à la dysfonction des systèmes protéolytiques tels que l'autophagie (Weilh *et al.*, 2013).

4. Thérapeutiques

Aucune thérapeutique spécifique des desminopathies n'est à ce jour connue (Clemen *et al.*, 2013). La prise en charge de ces patients repose actuellement sur la prévention et le traitement des complications, en particulier des complications cardiaques et musculaires. L'absence de traitement efficace pour soigner les desminopathies souligne l'importance de préserver la structure de la Desmine.

VI. Contrôle qualité des protéines

Le cardiomyocyte étant décrit comme une cellule post-mitotique (Bergmann *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2015 ; Linton *et al.*, 2015), les processus de contrôle qualité des protéines jouent un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Une altération de cette homéostasie entraîne une accumulation de protéines mal conformées et d'agrégats protéiques inhérents à l'apparition d'une protéotoxicité cellulaire (Wang *et al.*, 2015).

Trois grands mécanismes ont été à ce jour décrits comme participant au contrôle qualité des protéines au sein de la cellule : l'autophagie, le l'UPS et la réponse UPR (*Unfolded Protein Response*) (Wang *et al.*, 2015).

A. L'autophagie

L'autophagie est décrite comme un mécanisme cellulaire qui assure la dégradation d'une partie du cytoplasme par ses propres lysosomes (Linton *et al.*, 2015). L'autophagie participe à l'homéostasie cellulaire en assurant l'élimination et le remplacement continu du matériel cytoplasmique, des protéines et des organites cellulaires (Wang *et al.*, 2015 ; Ravikumar *et al.*, 2010). La dégradation des

différents constituants cellulaires au sein des lysosomes va générer des acides aminés, des nucléotides et des acides gras libres qui pourront ensuite être réutilisés afin de synthétiser de nouvelles macromolécules et de l'énergie sous forme d'ATP. En plus de son implication dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, l'autophagie joue un rôle central en situation physiologique tel que le développement embryonnaire précoce et en situation physiopathologique comme lors d'une dénutrition néonatale ou d'un RVG (Ravikumar *et al.*, 2010).

L'autophagie est active à l'état basal mais peut être stimulée dans des conditions de stress métabolique comme une carence en nutriments, une absence de facteurs de croissance, une hypoxie, par diverses pathologies et par des agents pharmacologiques (Ravikumar *et al.*, 2010). Il a été montré qu'un dysfonctionnement des mécanismes d'autophagie participe au développement d'une large gamme de pathologies humaines allant des maladies infectieuses au cancer en passant par les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et l'obésité (Ravikumar *et al.*, 2010 ; Linton *et al.*, 2015).

Actuellement, trois types d'autophagie ont été décrits : la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) (Figure 25). Ces trois mécanismes, différent par leur sélectivité vis à vis des éléments à dégrader et sur leur mode de délivrance aux lysosomes (Rothenberg *et al.*, 2010).

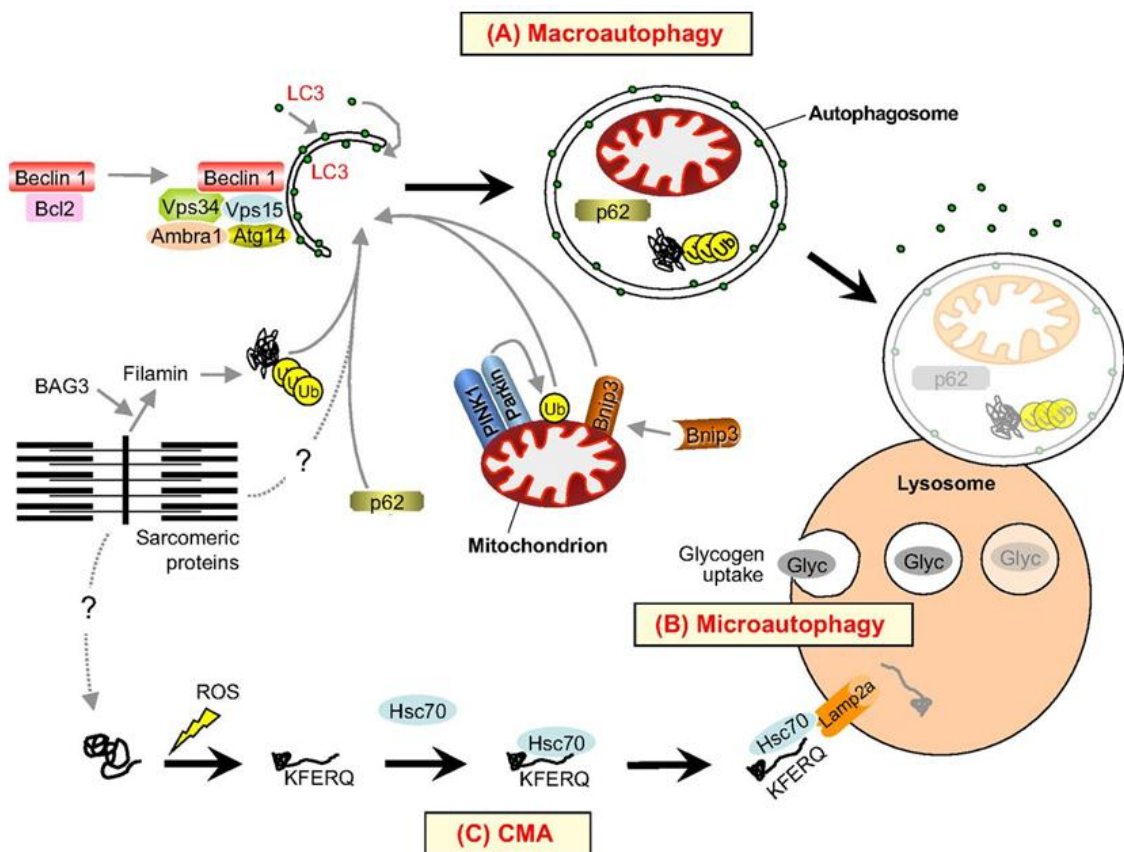


Figure 25. Les différents types d'autophagie. La macroautophagie se déroule principalement en deux étapes : séquestration du matériel à dégrader par l'autophagosome et dégradation au niveau avec le lysosome (A). La microautophagie consiste en la dégradation non sélective d'une partie du cytoplasme par invagination de la membrane lysosomale (B). La CMA nécessite la reconnaissance et la fixation de la protéine Hsc70 sur le motif pentapeptidique KFERQ de la protéine puis sa translocation dans la lumière du lysosome grâce au récepteur LAMP2a (pour *Lysosome-associated membrane protein 2 isoform a*) (C) (Bonaldo *et al.*, 2013).

1. La macroautophagie

La macroautophagie, plus communément connue sous le terme générique autophagie, est une forme d'autophagie qui repose sur la formation d'une vésicule à double membrane (autophagosome) autour des protéines et organites à dégrader (Linton *et al.*, 2015). Des trois types d'autophagie existants, la macroautophagie est la forme la mieux caractérisée. Elle participe à l'élimination des protéines à demi-vie longue ainsi qu'à la clairance des protéines et organites endommagés (Ravikumar *et al.*, 2010). A ce jour, chez la levure, plus d'une trentaine de gènes différents ont été identifiés comme participant à la régulation de la macroautophagie. Ces gènes Atg (pour *autophagy-related genes*), dont la plupart ont des orthologues chez les mammifères (Ravikumar *et al.*, 2010), codent pour plus d'une trentaine de protéines (actuellement 36 identifiées) qui orchestrent la macroautophagie et en font par conséquent un processus cellulaire très dynamique (Linton *et al.*, 2015). Une concentration trop faible en certains acides aminés, en facteurs de croissance ou en ATP, une hypoxie comme lors d'un IDM, la présence d'agrégats protéiques ou encore le stress du réticulum endoplasmique (RE) sont des facteurs inducteurs de la macroautophagie (Nixon *et al.*, 2013).

La macroautophagie se déroule en plusieurs étapes au cours desquelles interviennent les différentes protéines Atg. L'étape d'initiation de la formation de l'autophagosome est suivie par une étape d'élongation de la double membrane lipidique avant la fusion de l'autophagosome avec le lysosome.

a) Initiation de la formation de l'autophagosome

L'initiation de la formation de l'autophagosome résulte soit de l'inhibition de mTOR (pour *mammalian target of rapamycin*) soit de l'activation de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK). Ces 2 phénomènes entraînent l'activation par phosphorylation de la protéine ULK1 (pour *Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1*) qui est une sous-unité du complexe Unc51-like kinase (ULK) composé également des protéines ULK2, Atg101, Atg13, et FIP200 (pour *FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa*) (Nixon *et al.*, 2013) (Figure 26). Une fois activé, ULK1 va phosphoryler AMBRA1 (pour *Autophagy/Beclin-1 Regulator 1*), un élément du complexe multiprotéique phosphoinositide 3-kinase (PI3K) composé des protéines Vsp34 (pour *vacuolar sorting protein 34*), Beclin 1, Vps15 et Atg14, et entraîner la translocation de ce complexe depuis le cytosquelette vers une membrane isolée (ou structure préautophagosomale) afin d'initier la formation de l'autophagosome (Figure 26).

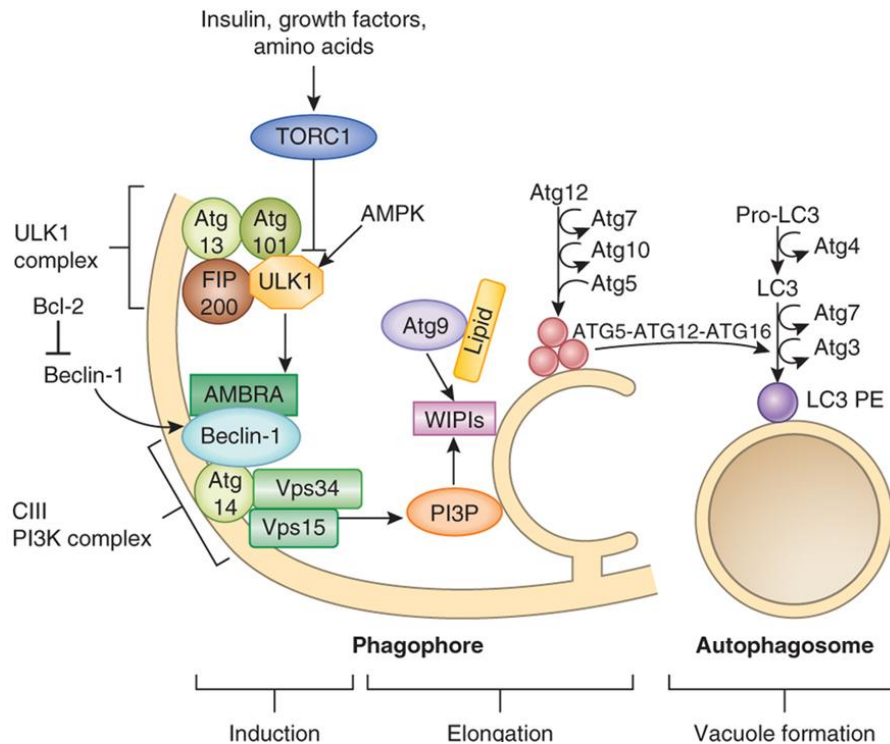


Figure 26. Représentation schématique de la formation de l'autophagosome. Ce processus se déroule en 3 étapes : induction, élongation, formation de la vacuole autophagique (Nixon *et al.*, 2013).

Au niveau de cette membrane isolée, la production de phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) par Vps34 permet à la fois le recrutement des protéines intervenant dans l'élongation du phagophore à l'origine de l'autophagosome en particulier de WIPI1 (pour WD repeat domain phosphoinositide-interacting 1) et WIPI2 et son élongation (Nixon *et al.*, 2013).

b) Elongation

Après recrutement des protéines WIPIs à la membrane de la structure préautophagosomale, 2 systèmes de conjugaison œuvrent en parallèle pour assurer la lipodation de protéine LC3 (pour *microtubule-associated protein 1 light chain 3*) et son incorporation dans la membrane de l'autophagosome naissant (Ravikumar *et al.*, 2010)

Le premier système de conjugaison se forme par étapes successives. Dans un premier temps, la protéine Atg12 est activée par l'Atg7 puis transférée sur l'Atg10 en vue d'être liée de manière covalente par sa glycine C-terminale à la lysine (Lys) 130 de l'Atg5. Ce complexe Atg12-Atg5 va ensuite être conjugué à l'Atg16L1 pour former le complexe Atg12-Atg5-Atg16L1 (Figure 27). Ce complexe est essentiel à l'élongation du phagophore puisqu'en transitant à sa membrane il permet le recrutement du second complexe de conjugaison.

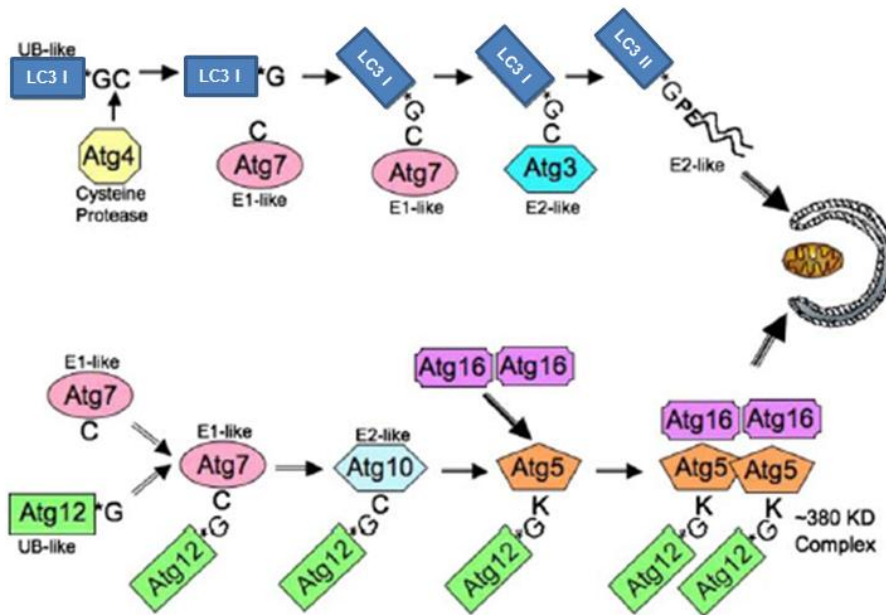


Figure 27. Représentation schématique des processus cellulaires impliqués dans la lipidylation du LC3 et dans son incorporation à la membrane de l'autophagosome naissant (Adapté de Gottlieb *et al.*, 2009)

Le second système de conjugaison implique la protéine LC3. Le précurseur du LC3, le pro-LC3 va former le LC3 I après clivage de sa partie C-terminale par la protéine Atg4. Au niveau de la membrane de l'autophagosome naissant, le LC3 I va être pris en charge et activé par Atg7, transféré vers Atg3 puis lié de manière covalente à un phosphatidylethanolamine pour former le LC3 II (Figure 27). Ce dernier va s'insérer dans la membrane de l'autophagosome et y demeurer jusqu'à sa fusion avec le lysosome alors que le complexe Atg12-Atg5-Atg16L1 est recyclé vers le cytosol. Au moment de la fusion avec le lysosome, les protéines LC3 II présentes à la membrane cytoplasmique de l'autophagosome peuvent être délipidées par l'Atg4 pour être recyclées. Bien que le rôle du LC3 II ne soit pas totalement connu, il semble favoriser la fusion vésicule-vésicule et ainsi faciliter la fermeture de la double membrane (Ravikumar *et al.*, 2010).

L'élongation du phagophore nécessite à la fois des fragments de membrane provenant d'autres organelles et un transporteur pour les amener au niveau du phagophore. La protéine Atg9L qui est connue pour être une protéine transmembranaire transitant entre les endosomes, le trans-Golgi et le phagophore semble remplir cette fonction de transport des fragments de membrane vers la structure préautophagosomale pour assurer son élongation (Ravikumar *et al.*, 2010 ; Nixon *et al.*, 2013).

c) Fusion et dégradation des protéines

La fusion des autophagosomes nouvellement formés avec d'autres vésicules intracellulaires implique de nombreuses protéines telles que ESCRT (pour *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*), SNAREs (pour *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*), Rab7, les protéines Vps de classe C ou encore le complexe Beclin-1/PI3K/UVRAG (pour *UV Radiation Resistance-Associated Gene*). L'autophagosome peut fusionner soit directement

avec un lysosome pour former un autolysosome soit fusionner dans un premier temps avec un endosome pour former un amphisome qui fusionnera dans un second temps avec un lysosome et donnera un autolysosome (Figure 28). Pour ce faire, la protéine UVRAG, partenaire connu de Beclin 1, va recruter les protéines Vps de classe C au niveau de la double membrane et dans le même temps activer Rab7 et ainsi promouvoir la fusion de l'autophagosome avec un endosome tardif ou un lysosome (Ravikumar *et al.*, 2010 ; Nixon *et al.*, 2013).

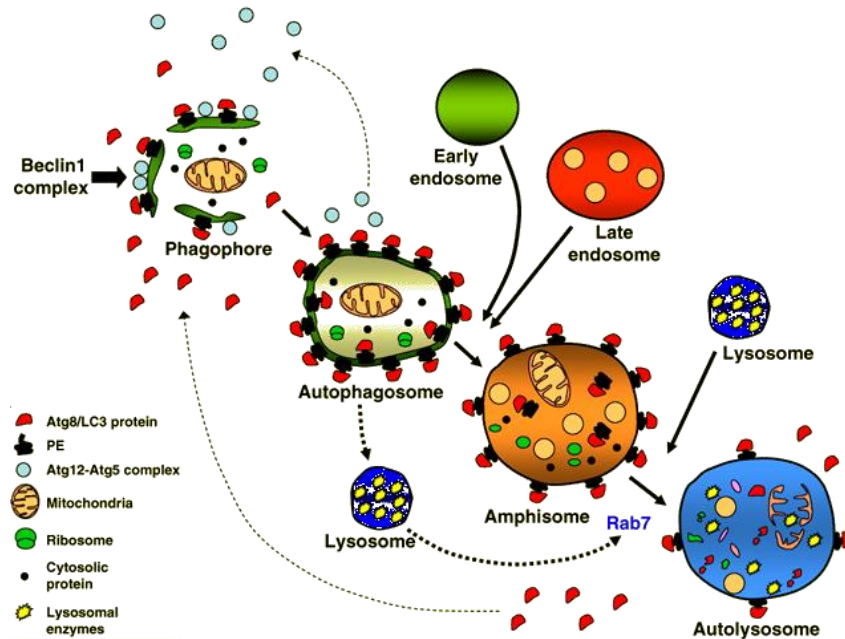


Figure 28. Représentation schématique de la fusion de l'autophagosome avec le lysosome (Fader *et al.*, 2009).

Au sein du lysosome, les macromolécules sont dégradées par les hydrolases résidentes, notamment les cathepsines, en sous unités telles que les acides gras, le glycérol, les acides aminés. Ces derniers sont ensuite libérés dans le cytosol afin d'être réutilisés par la cellule (Lorin, 2008). Il a été montré que l'acidification du lysosome est essentielle pour assurer sa fusion avec l'autophagosome. En effet, l'inhibition de la pompe à proton ATPase dépendante du lysosome par divers agents pharmacologiques tels que la bafilomycine A1 (Baf) inhibe la formation des autolysosomes (Ravikumar *et al.*, 2010).

2. La microautophagie

La microautophagie est un processus biologique fondamental permettant la séquestration de constituants cytoplasmiques directement par la membrane lysosomale en vue de leur dégradation. Il existe 2 grands types de microautophagie : la microautophagie non-sélective régulièrement observée chez les mammifères et la microautophagie sélective le plus souvent observée chez la levure (Li *et al.*, 2012).

a) Autophagie non sélective

La microautophagie non sélective assure comme son nom l'indique la séquestration et la dégradation non sélective de petites portions cytoplasmiques en marge des lysosomes par invagination aléatoire de leur membrane. Ce processus se déroule en 5 étapes. Dans un premier temps, suite à la ségrégation latérale des lipides membranaires et à l'exclusion des grosses protéines transmembranaires, la membrane lysosomale s'invagine puis, dans un deuxième temps, s'étend pour former le tube autophagique. Le long de ce tube autophagique, la quantité de protéines intramembranaires va décroître considérablement par rapport à la base du tube. Cette différence de densité entre la base et le haut du tube autophagique provoque son élargissement/extension à la base jusqu'à la formation d'une structure pré-vésiculaire. Cette structure va ensuite se refermer pour former une vésicule lysosomale, on parle de scission. Au sein du lysosome, la vésicule est ensuite dégradée par les hydrolases lysosomales dont Atg15p et Atg22p. L'ensemble de ce processus est orchestré par de nombreuses protéines telles que la GTPase Vps1p qui régule l'invagination de la membrane, le complexe VTC (pour *Vacuolar Transporter Chaperone*) qui contrôle la distribution des protéines à la membrane lysosomale et participe à la scission du tube autophagique (Li *et al.*, 2012).

b) Autophagie sélective

La microautophagie sélective consiste en la séquestration sélective de certains organelles par le lysosome. Plusieurs types de microautophagie ont été décrites : la micropexophagie intervient pour éliminer les peroxisomes superflus ou endommagés ; la microautophagie coup par coup du noyau dégrade des petites portions nucléaires non essentielles ; la micromitophagie assure l'élimination des mitochondries endommagées soit par séquestration lysosomale, soit par transfert d'hydrolases au sein de la mitochondrie par l'intermédiaires de pores (Li *et al.*, 2012).

c) Régulation

Bien qu'elle soit active de manière constitutive, la microautophagie est induite en réponse à une carence en nutriments, en azote ou encore par la présence d'organelles endommagés (Li *et al.*, 2012). La microautophagie a beaucoup été étudiée chez la levure mais ses mécanismes de régulation et son rôle physiologique chez les mammifères restent à élucider (Mijaljica *et al.*, 2011). Néanmoins, elle semble impliquée dans le contrôle et le maintien de la taille des organelles, dans l'homéostasie membranaire et dans la survie cellulaire en cas de carence prolongée en azote (Li *et al.*, 2012). Ainsi, la microautophagie fonctionne de pair avec la macroautophagie et la CMA pour assurer l'homéostasie cellulaire.

3. L'autophagie médiée par les chaperonnes

La CMA est la forme d'autophagie la plus sélective. Contrairement aux 2 autres voies décrites précédemment, la CMA ne nécessite pas la formation d'une vésicule pour dégrader ses cibles mais implique plusieurs protéines chaperonnes telles que Hsc70 et Hsp90 qui assurent le transport de la protéine à dégrader jusqu'au lysosome (Liu *et al.*, 2015 ; Dice, 2007). La sélectivité de ce système protéolytique repose sur la présence d'un motif pentapeptidique dans la séquence en acides aminés des protéines à dégrader. Ce motif permet de cibler spécifiquement une protéine sans perturber les protéines environnantes. Ainsi, la CMA représente un système protéolytique de choix pour la dégradation des protéines endommagées, mal conformées ou encore les sous-unités surnuméraires de complexes multi-protéiques (Cuervo *et al.*, 2013).

a) Sélectivité de la CMA

Les protéines cibles de la CMA possèdent dans leur structure primaire un motif pentapeptidique leur permettant d'être reconnues par la protéine Hsc70. Ce motif consiste en une glutamine [Q] invariablement présente en début ou en fin de motif, d'un ou deux acides aminés chargés positivement (lysine [K] ou arginine [R]), d'un ou deux acides aminés hydrophobes (phénylalanine [F], valine [V], leucine [L] ou isoleucine [I]) et d'un acide aminé chargé négativement (acide glutamique [E] ou acide aspartique [D]) (Cuervo *et al.*, 2013). Ce motif pentapeptidique KFERQ (ou assimilé KFERQ) est présent dans environ 30% des protéines cytosoliques (Liu *et al.*, 2015) mais n'est pas toujours accessible. Ce site peut être démasqué suite à un changement de conformation d'une protéine induit par une MPT, par le désassemblage d'un complexe multiprotéique ou lors de la libération d'une protéine d'un compartiment subcellulaire (Cuervo *et al.*, 2013). Ce motif d'adressage à la CMA, reposant sur un ensemble de charges portées par des acides aminés, peut également être créé à partir d'un motif incomplet subissant une MPT telle qu'une phosphorylation, une acétylation ou une ubiquitinylation qui apporte la charge manquante (Liu *et al.*, 2015 ; Cuervo *et al.*, 2013).

b) Déroulement de la CMA

1) Reconnaissance des cibles de la CMA

Le motif pentapeptidique KFERQ des protéines cibles de la CMA est reconnu par la protéine de choc thermique Hsc70. Cette protéine, aussi connue sous le nom de HSP73 ou de HSPA8, est exprimée de manière constitutive et joue un rôle central dans de nombreux processus cellulaires en particulier dans la CMA (Stricher, 2013). La Hsc70 cytosolique reconnaît et fixe le motif KFERQ de la protéine à dégrader et participe à son dépliement au niveau de la membrane lysosomale afin de permettre sa translocation dans la lumière du lysosome (Liu *et al.*, 2015 ; Cuervo *et al.*, 2013).

2) Acheminement vers le lysosome

Après fixation de la protéine à dégrader via son motif KFERQ, la chaperonne Hsc70 va, à l'aide de ses co-chaperonnes notamment la Hsp90 cytosolique, la Hsp40, HIP, Hop et Bag-1 qui stabilisent le complexe Hsc70-substrat (Kaushik *et al.*, 2011), transporter la protéine à dégrader jusqu'à la membrane lysosomale pour qu'elle y soit transloquée puis dégradée (Liu *et al.*, 2015 ; Cuervo *et al.*, 2013). Au niveau du lysosome, le complexe protéine à dégrader/Hsc70/co-chaperonnes va se fixer à l'extrémité cytosolique C-terminale du récepteur lysosomal LAMP2a via Hsc70 (Liu *et al.*, 2015 ; Cuervo *et al.*, 2013).

3) Translocation lysosomale et dégradation

La fixation de la protéine à dégrader sur le récepteur lysosomal lamp2a via Hsc70 entraîne la multimérisation de LAMP2a en un complexe multiprotéique d'environ 700 kDa. La formation de ce dit complexe va permettre la translocation du couple substrat linéarisé/Hsc70 à travers la membrane du lysosome. Les données de la littérature suggèrent que la chaperonne Hsc70 résidente du lysosome joue un rôle majeur dans la translocation du substrat dans la lumière du lysosome. En effet, elle pourrait tracter le substrat dans la lumière du lysosome ou encore empêcher son reflux cytoplasmique (Cuervo *et al.*, 2013). Néanmoins le mécanisme exact de translocation des cibles de la CMA au lysosome reste encore à élucider. Après translocation du substrat au niveau du lysosome, les enzymes lysosomales vont le dégrader et le complexe multiprotéique LAMP2a va se dissocier permettant ainsi la fixation de nouveaux substrats de la CMA à la membrane des lysosomes (Liu *et al.*, 2015).

c) Fonction de la CMA

L'une des fonctions de la CMA est, comme la macroautophagie, de participer au recyclage des acides aminés. Néanmoins, la cinétique d'induction de ces deux systèmes est différente. En effet, l'activité de la macroautophagie est maximale après 4 à 6h de sevrage puis décroît avec le temps alors que la CMA est activée progressivement à partir de 8 à 10h de sevrage et persiste jusqu'à 88h soit plus de trois jours (Cuervo *et al.*, 2000 ; Cuervo *et al.*, 2013). Il a été montré qu'en cas de carence prolongée en nutriments, condition dans laquelle l'activité de la CMA est maximale, la CMA est responsable de la dégradation de 30% des protéines cytosoliques. Les protéines cytosoliques dégradées dans de telles conditions sont des protéines non essentielles à la survie cellulaire. Elles sont alors source d'acides aminés pour assurer la synthèse des protéines essentielles et ainsi la survie cellulaire (Cuervo *et al.*, 2013).

La CMA participe également activement au contrôle qualité des protéines aux côtés de la macroautophagie et de l'UPS. Entre autres, elle assure l'élimination des protéines oxydées suite à un

stress oxydant, des sous-unités surnuméraires de complexes protéiques assemblés au niveau du cytoplasme ou encore des protéines altérées (Cuervo *et al.*, 2013).

Enfin, la CMA a été montrée impliquée dans la modulation de la fonction d'une cellule spécialisée par exemple en assurant la dégradation de facteurs de transcription au niveau rénal ou neuronal (Paired box gene 2 (Pax2) et myocyte enhancer factor 2D (MEF2D) respectivement) (Cuervo, 2014).

d) Régulation

La CMA est sensible à de multiples facteurs, néanmoins son activité est largement dépendante de l'expression de LAMP2a. En effet, cette protéine est **LE** facteur limitant de la CMA puisqu'il s'agit du récepteur lysosomal assurant la translocation des cibles de la CMA au lysosome. LAMP2a est donc au centre de la régulation de la CMA. Il a été montré que son niveau d'expression à la membrane des lysosomes est positivement corrélé à l'activité de la CMA (Cuervo *et al.*, 2000; Cuervo *et al.*, 2013). Ce niveau de LAMP2a à la membrane des lysosomes peut être modulé au niveau transcriptionnel et post-traductionnel. Récemment, il a été montré que l'activité de la CMA peut également être modulée par des agents pharmacologiques ou encore des siRNA (Pedrozo *et al.*, 2013).

1) Régulation endogène de la CMA

Il a été montré que le stress oxydant entraîne une augmentation de la transcription de l'ARNm de LAMP2a. Dans de telles conditions, à la membrane des lysosomes le niveau de LAMP2a, facteur limitant de la CMA, augmente et par conséquent l'activité de la CMA croît (Cuervo *et al.*, 2013 ; Liu, 2015).

Une carence prolongée en nutriments et plus particulièrement en sérum peut également induire la CMA, c'est même la condition dans laquelle son activité est la plus élevée (Cuervo *et al.*, 2013). En cas de stress nutritif, le taux de dégradation de LAMP2a diminue, entraînant une augmentation du niveau de LAMP2a à la membrane des lysosomes et ainsi un accroissement de l'activité de la CMA (Cuervo *et al.*, 2000 ; Cuervo *et al.*, 2013).

2) Régulation exogène de la CMA

Au niveau traductionnel, le niveau de LAMP2a peut être régulé artificiellement au moyen de siRNA dirigés spécifiquement contre l'ARN messager (ARNm) de l'isoforme a de la protéine LAMP2 (Pedrozo *et al.*, 2013). En se liant spécifiquement à l'ARNm de la protéine LAMP2a, le siRNA va entraîner le clivage de l'ARNm et par conséquent empêcher sa traduction en protéine.

En 2005, Finn *et al.* ont montré que 2 agents pharmacologiques, la geldanamycine (GA) et le 6-aminonicotinamide (6-AN) étaient des activateurs de la CMA (Finn *et al.*, 2005). La GA est un

antibiotique connu notamment pour être un inhibiteur de la protéine Hsp90. La Hsp90, protéine de choc thermique est dans le cadre de la CMA impliquée dans le chaperonnage des cibles de la CMA au lysosome avec Hsc70 mais aussi dans la stabilisation de LAMP2a à la membrane du lysosome au cours de la formation du complexe multiprotéique (Kaushik *et al.*, 2012). En occupant la poche de liaison à l'ATP de la Hsp90, la GA inhibe son activité ATPasique intrinsèque et l'empêche ainsi de jouer son rôle de chaperonne. L'inhibition de la Hsp90 par la GA perturbe la liaison Hsp90-protéines clientes qui vont alors être dégradées par le protéasome et la Hsp90 qui peut alors jouer son rôle de co-chaperonne pour la CMA (Zhang *et al.*, 2004 ; Kamal *et al.*, 2004, Mori *et al.*, 2015).

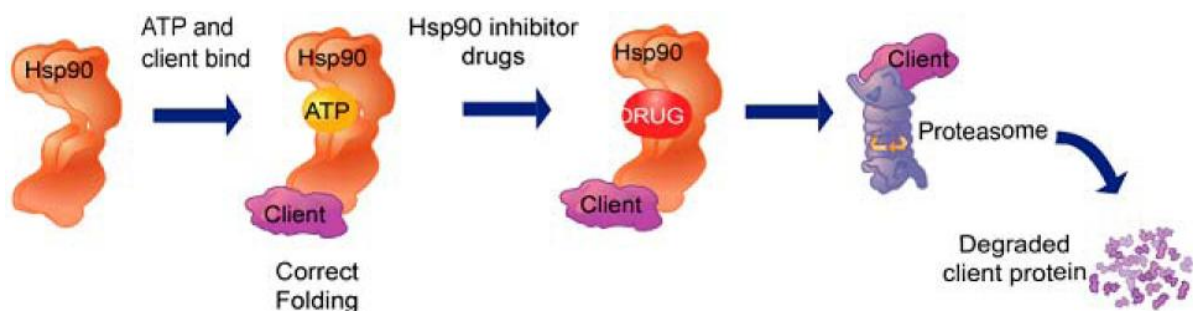


Figure 29. Mécanisme d'action de la geldanamycine (GA) sur la Hsp90 (Kamal, 2009).

Le 6-AN est un inhibiteur de la glucose-6-phosphate déshydrogénase qui régule la voie des pentoses phosphates. En inhibant la déshydrogénation du glucose 6-phosphate, le 6-AN diminue le niveau intracellulaire de NADPH et promeut l'oxydation des protéines cytosoliques (Finn *et al.*, 2005). En effet, le NADPH est connu pour jouer, avec la glutathion réductase, un rôle dans le maintien du glutathion sous forme réduite afin de promouvoir aux cellules une résistance contre le stress oxydant et de préserver le pH intracellulaire. Ainsi, en augmentant le niveau d'oxydation des protéines le 6-AN, active la CMA (Finn *et al.*, 2005).

B. Le système ubiquitine-protéasome

Le système ubiquitine-protéasome ou UPS, est un système multienzymatique présent dans les cellules eucaryotes qui assure le renouvellement de la plupart des protéines (80-90%) mais participe également à leur contrôle-qualité en assurant la dégradation des protéines mal repliées (McLendon *et al.*, 2015 ; Nishida *et al.*, 2015). Cette voie de dégradation des protéines diffère de la voie lysosomale en plusieurs points. En effet, l'UPS est connu pour dégrader principalement les protéines à demi-vie courte. Cette dégradation se fait à pH neutre au sein d'un complexe multiprotéique et n'implique aucune compartimentation cellulaire. Contrairement à l'autophagie, l'UPS est un système hautement sélectif, actif au sein du cytoplasme des cellules mais également de leurs noyaux (Ross *et al.*, 2015). Enfin, l'UPS est capable de dégrader les protéines monomériques mais ne peut pas prendre en charge les complexes protéiques de haut poids moléculaire (Nishida *et al.*, 2015).

La dégradation des protéines par l'UPS se déroule en 2 grandes étapes : la liaison de molécule d'ubiquitine de manière covalente sur les résidus Lys des protéines puis, la prise en charge et la dégradation des protéines par le protéasome 26S.

1. Ubiquitylation des protéines

L'ubiquitylation est une MPT réversible ATP dépendante aboutissant à la liaison covalente d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine sur une protéine cible. L'ubiquitine est une petite protéine d'environ 8,5 kDa composée de 76 acides aminés qui est très conservée chez les eucaryotes. L'ubiquitylation peut prendre plusieurs formes allant de l'addition d'un seul résidu ubiquitine (mono-ubiquitylation) à la formation de chaînes d'ubiquitine (poly-ubiquitylation). La conjugaison d'une chaîne poly-ubiquitylée sur la protéine à dégrader est indispensable à sa reconnaissance et sa prise en charge par le protéasome (Ross *et al.*, 2015).

Le processus d'ubiquitylation se déroule en 3 étapes et fait intervenir 3 complexes enzymatiques différents coopérant pour aboutir à la liaison covalente d'une molécule d'ubiquitine sur une protéine cible via sa glycine en position C-terminale: une étape d'activation de l'ubiquitine, une étape de conjugaison de l'ubiquitine et enfin une étape de liaison de l'ubiquitine à la protéine cible (Figure 30) (Ross *et al.*, 2015).

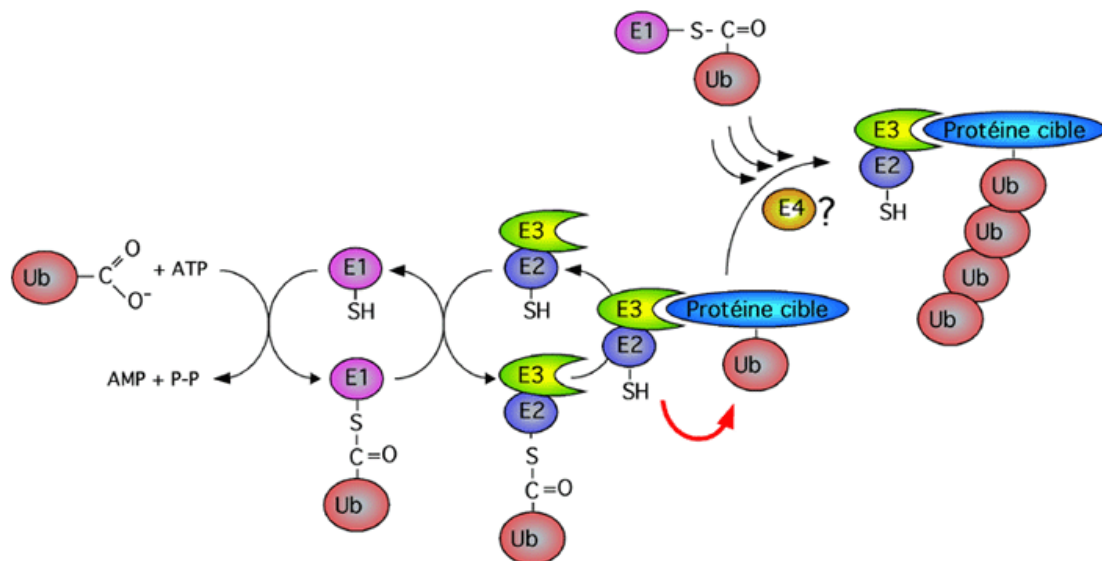


Figure 30. Représentation schématique du processus d'ubiquitylation. Ub : ubiquitine ; E1 : enzyme activatrice de l'ubiquitine ; E2 : enzyme de conjugaison de l'ubiquitine ; E3 : ubiquitine ligase.

Dans un premier temps, l'ubiquitine réagit avec l'enzyme E1 qui, en présence d'ATP, catalyse la formation d'une liaison thioester entre sa cystéine (Cys) et la glycine C-terminale de l'ubiquitine. L'ubiquitine alors dite « activée » est transférée par l'enzyme E1 sur une Cys de l'enzyme E2 par une liaison thioester. Enfin, l'ubiquitine ligase E3 transfère l'ubiquitine sur le groupement ϵ -amine d'une Lys interne au substrat, parfois sur le groupement α -amine du résidu N-terminal et dans des cas exceptionnels sur une Cys, une Ser ou une Thr (Morris, 2011 ; Moulton *et al.*, 2014). A ce jour on

dénombrer pas moins de 600 enzymes E3, 30 enzymes E2 et seulement 2 enzymes E1 chez l'homme traduisant la complexité de ce système (Ross *et al.*, 2015)

Le processus d'ubiquitinylation se répète afin de greffer d'autres molécules d'ubiquitine sur l'une des sept Lys (Lys6, 11, 27, 29, 33, 48 et 63) interne à la molécule d'ubiquitine précédemment liée à la protéine cible et permet ainsi la formation d'une chaîne poly-ubiquitinylée. La taille de la chaîne poly-ubiquitinylée joue un rôle important puisqu'elle va conditionner le devenir de la protéine porteuse. En effet, la présence d'une chaîne liée en Lys48 poly-ubiquitinylée comprenant au moins 4 molécules d'ubiquitine est le plus souvent un signe d'adressage au protéasome alors que les autres types de liaisons ont été montrées impliquées dans les mécanismes d'endocytose, de réparation de l'ADN, d'autophagie ou encore de transcription (Ross *et al.*, 2015).

2. Prise en charge et dégradation par le protéasome

Après avoir été taguée par une chaîne poly-ubiquitinylée, la protéine est reconnue, prise en charge et dégradée par le protéasome 26S. Le protéasome 26S, communément dénommé protéasome, est un complexe protéolytique d'environ 2,4 MDa composé de 2 domaines distincts : un cœur protéolytique ou protéasome 20S ainsi qu'un ou deux complexes régulateurs, les sous-unités 19S, placées de part et d'autre du protéasome 20S. L'ensemble de ces trois complexes constitue le protéasome 26S (Figure 31) (Ross *et al.*, 2015 ; Grigoreva *et al.*, 2015).

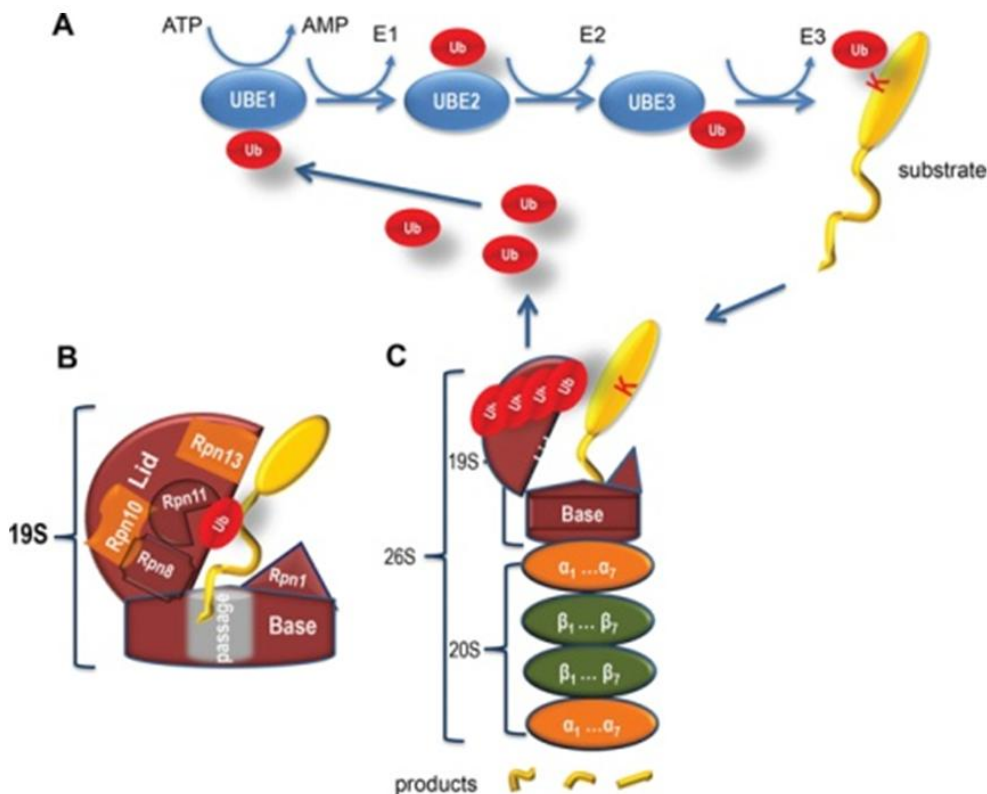


Figure 31. Représentation schématique de la structure du protéasome. E1 : enzyme activatrice de l'ubiquitine ; E2 : enzyme de conjugaison de l'ubiquitine ; E3 : ubiquitine ligase E3 ; Ub : ubiquitine. Adapté de Grigoreva *et al.*, 2015.

a) Le cœur protéolytique

Le cœur protéolytique est composé d'un empilement de 4 anneaux lui conférant une forme cylindrique. Ces anneaux sont eux-mêmes composés de 7 sous-unités différentes. Les 2 anneaux externes du protéasome 20S sont composés de sous-unités de type α et les 2 anneaux internes de sous-unités de type β . Les sous-unités α jouent un rôle structural puisqu'elles assurent l'interaction avec les sous-unités régulatrices 19S et aident le substrat à parvenir au cœur du protéasome où il sera dégradé par les sous-unités β portant différentes activités protéolytiques (trypsine, chymotrypsine et activité assimilée à celle des caspases). Néanmoins, il semble qu'en plus de leur rôle structural, les sous-unités α portent une activité endoribonuclease et interagissent avec différentes ubiquitine-ligases et hydrolases (Ross *et al.*, 2015; Grigoreva *et al.*, 2015).

b) Les sous-unités régulatrices

Les sous-unités régulatrices 19S sont impliquées dans la préparation de la protéine cible à sa dégradation au sein du cœur protéolytique du protéasome 26S. Ainsi, elles assurent la reconnaissance et la liaison de la protéine cible, sa déubiquitinylation et son passage au sein du cœur protéolytique du protéasome. Ainsi, les sous-unités régulatrices 19S sont constituées de deux sous-parties distinctes assurant ces différentes fonctions : la base et le chapeau.

La base des sous-unités régulatrices 19S se compose de 9 protéines dont 6, les Rpt 1 à 6 (pour *Regulatory particle triple A*), sont des ATPases qui assurent la liaison avec les sous-unités α du protéasome 20S. La base du protéasome 19S intervient également dans le recrutement des protéines ubiquitinylées et participe à leur déploiement pour faciliter leur passage dans le cœur protéolytique du protéasome.

Le chapeau du protéasome 19S, constitué de 9 protéines Rpn (pour *Regulatory particle non-ATPase* ; Rpn3, et Rpn5 à 12), est impliqué à la fois dans la reconnaissance de la chaîne poly-ubiquitinylée de la protéine cible, dans sa dé-ubiquitinylation mais aussi dans sa translocation dans le cœur protéolytique du protéasome pour qu'elle y soit dégradée. Après reconnaissance du substrat via sa chaîne poly-ubiquitinylée, l'activité isopeptidase du complexe 19S va assurer le détachement des groupements ubiquitine permettant leur recyclage. Le 19S va ensuite participer au déploiement du substrat. Une fois dépourvu de sa conformation tridimensionnelle, le substrat va alors être transféré dans le cœur protéolytique du protéasome pour y être dégradé (Ross *et al.*, 2015; Grigoreva *et al.*, 2015).

C. La réponse UPR

Au cours de leur synthèse environ 35% des protéines, qu'elles soient sécrétées, transmembranaires ou résidentes du RE, sont dirigées vers ce compartiment subcellulaire pour y être

Introduction

repliées à l'aide de chaperonnes (ou non), subir un contrôle de leur repliement puis être maturées par diverses MPTs.

Divers stimuli tels que les ROS, les acides gras libres ou encore une altération de la fonction du protéasome peuvent perturber l'homéostasie du RE et être à l'origine d'un défaut de repliement des protéines. L'accumulation de protéines mal repliées au sein du RE consécutive à une altération ou une inhibition du processus de repliement des protéines est à l'origine de l'activation de la réponse UPR. La réponse UPR correspond à un ensemble de voies de signalisation qui a pour but de diminuer à la fois la synthèse des protéines afin de réduire leur accumulation au sein du RE mais aussi d'augmenter à la fois la synthèse des protéines chaperonnes participant au repliement des protéines au sein du RE et celle des protéines impliquées dans la machinerie de dégradation des protéines associées au RE (ERAD pour *ER-Associated Degradation*). Cette réponse adaptative de la cellule permet au RE de recouvrer son homéostasie. Trois voies de signalisation sont impliquées dans l'induction de l'UPR. Ces 3 voies font intervenir 3 protéines transmembranaires du RE : la kinase PERK (pour *Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase*), la Ser/Thr kinase IRE1 (pour *Inositol Requiring Enzyme 1*) et l'ATF6 (pour *Activating Transcription Factor 6*) (Figure 32) (Wang *et al.* 2015).

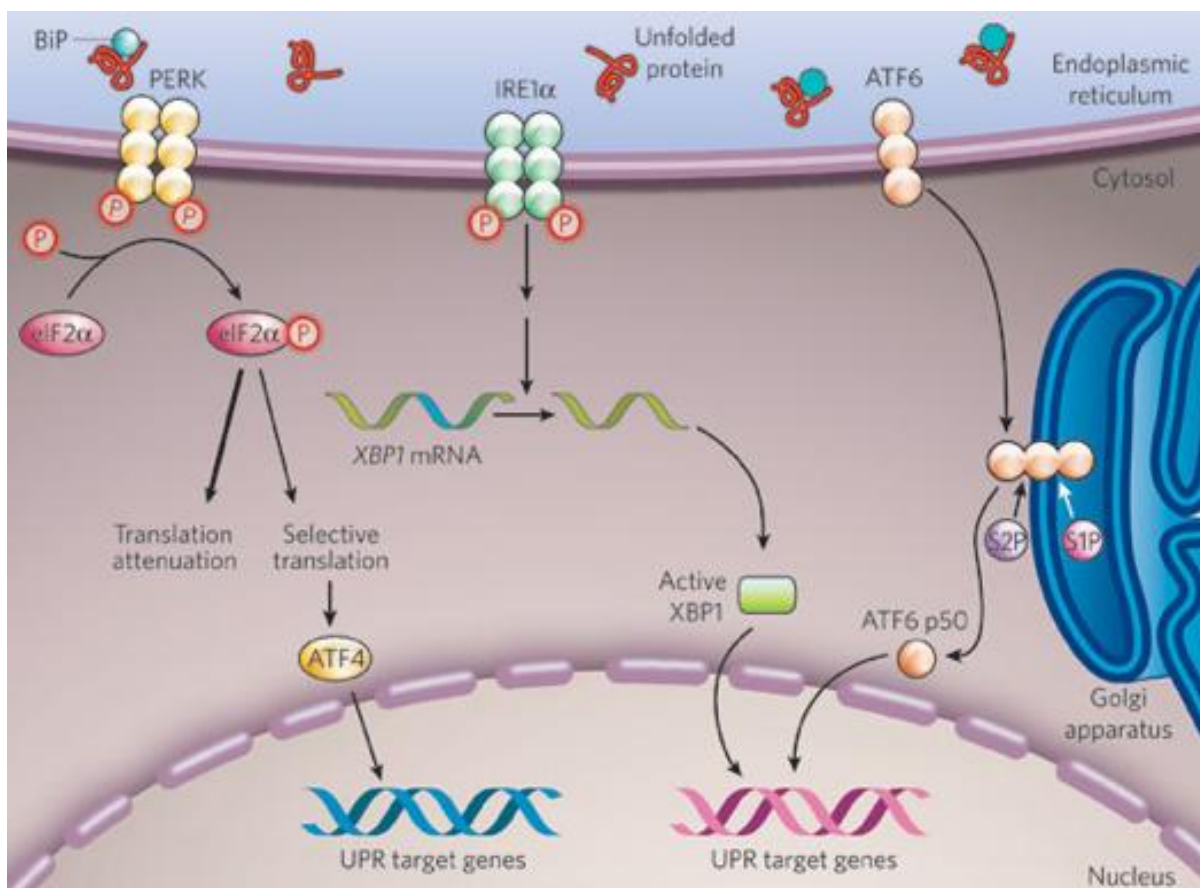


Figure 32. Représentation schématique des 3 voies de signalisation impliquées dans la réponse UPR (Zhang *et al.*, 2008).

1. Voie impliquant PERK

A l'état basal, la protéine transmembranaire PERK est lié à Bip, chaperonne résidente du RE et est inactive. En cas de stress du RE lié à l'accumulation de protéines mal repliées, le couple PERK-Bip se dissocie permettant à PERK de se dimériser via son domaine N-terminal et d'être activée par autophosphorylation. Une fois activée, PERK va phosphoryler et inhiber le facteur 2 d'initiation de la traduction (eIF2 α) et par conséquent réprimer la traduction des ARNm en protéines. Néanmoins, eIF2 α phosphorylé est capable de promouvoir de manière sélective la transcription de certains ARNm portant un cadre de lecture ouvert en 5'UTR tel qu'ATF4. ATF4, est un facteur de transcription qui favorise l'expression des chaperonnes intervenant dans le repliement des protéines au sein du RE mais aussi dans la régulation de l'autophagie (Wang *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2014).

2. Voie impliquant IRE-1

Après dissociation du complexe IRE1-Bip, la Ser/Thr kinase et endoribonucléase IRE1 va tout comme PERK se dimériser et s'activer par autophosphorylation. Une fois activée, au niveau cytoplasmique la ribonucléase IRE1 va épisser l'ARNm codant le facteur de transcription XBP1 (pour *X-box binding protein 1*) en ôtant un intron de 26 paires de bases. Cet épissage cytoplasmique change le cadre de lecture de l'ARNm de XBP1 et donne lieu à un ARNm XBP-1s codant le facteur de transcription XBP1. Ce facteur de transcription se lie sur les promoteurs de gènes codant les protéines impliquées dans la voie de dégradation ERAD (Wang *et al.*, 2015).

3. Voie impliquant ATF6

L'ATF6 est un facteur de transcription qui au cours de l'UPR transloque du RE vers l'appareil de Golgi où il est clivé en 2 fragments. Le domaine N-terminal qui porte l'activité facteur de transcription est relargué au niveau du cytoplasme puis transporté jusqu'au noyau où il va induire la transcription de gènes codant les protéines chaperonnes résidentes du RE (Wang *et al.*, 2015).

D. Dialogue entre l'autophagie et l'UPS

Initialement l'autophagie et l'UPS ayant été étudiés individuellement étaient considérés comme 2 voies de dégradation à part entière. En 2007, Pandey et al. ont mis en évidence, dans un modèle de neurodégénérescence chez la drosophile, l'existence d'un dialogue entre ces 2 systèmes protéolytiques. Ils ont pu montrer que l'altération de l'activité de l'UPS chez la drosophile entraînait une activation de l'autophagie permettant d'assurer la dégradation des protéines. Ils en ont conclu que ces 2 systèmes protéolytiques n'étaient pas mutuellement exclusifs (Pandey *et al.*, 2007). Ce dialogue entre l'autophagie et l'UPS existe aussi bien en conditions physiopathologiques qu'en conditions physiologiques. Néanmoins, ces mécanismes de dégradation n'étant pas redondants, l'augmentation

de l'activité d'un système en réponse à l'inhibition du second permet de maintenir l'homéostasie cellulaire en conditions physiologiques mais pas en conditions physiopathologiques (Park *et al.*, 2013).

Plusieurs études suggèrent que le stress du RE et la réponse UPR pourraient constituer le médiateur entre l'autophagie et l'UPS (Wang *et al.*, 2014). En effet, l'accumulation de protéines malconformées au sein du RE pourrait activer la réponse UPR. Comme décrit précédemment, la réponse UPR diminue la synthèse des protéines, augmenter la synthèse des protéines de la machinerie ERAD mais aussi des protéines chaperonnes résidentes du RE. L'augmentation de l'expression du facteur de transcription ATF4 en particulier semble impliqué dans la dialogue entre l'autophagie et l'UPS puisqu'il entraîne une augmentation de l'autophagie en réponse à l'inhibition du protéasome (Wang *et al.*, 2014). D'autres protéines telles que p53 et certaines protéines Atg ont été proposées comme des médiateurs du dialogue entre l'autophagie et l'UPS mais les mécanismes impliqués ne sont pas encore précisément connus (Park *et al.*, 2013).

Dans la plupart des cellules, un dialogue bidirectionnel entre la CMA et la macroautophagie a été mis en évidence. En d'autres termes, l'inhibition de la CMA entraîne une induction de la macroautophagie et réciproquement l'inhibition de la macroautophagie entraîne une activation de la CMA (Park *et al.*, 2013). Il en va de même pour les dialogues entre la CMA et l'UPS. En revanche, cette réciprocité n'est pas valable dans le cas d'un dialogue entre la macroautophagie et l'UPS. En effet, une inhibition de l'UPS entraîne une activation de la macroautophagie alors que l'inverse n'est pas valable (Figure 33). En revanche, il semble que la suractivation pharmacologique ou génétique d'un système protéolytiques n'a pas d'impact sur les 2 autres (Park *et al.*, 2013).

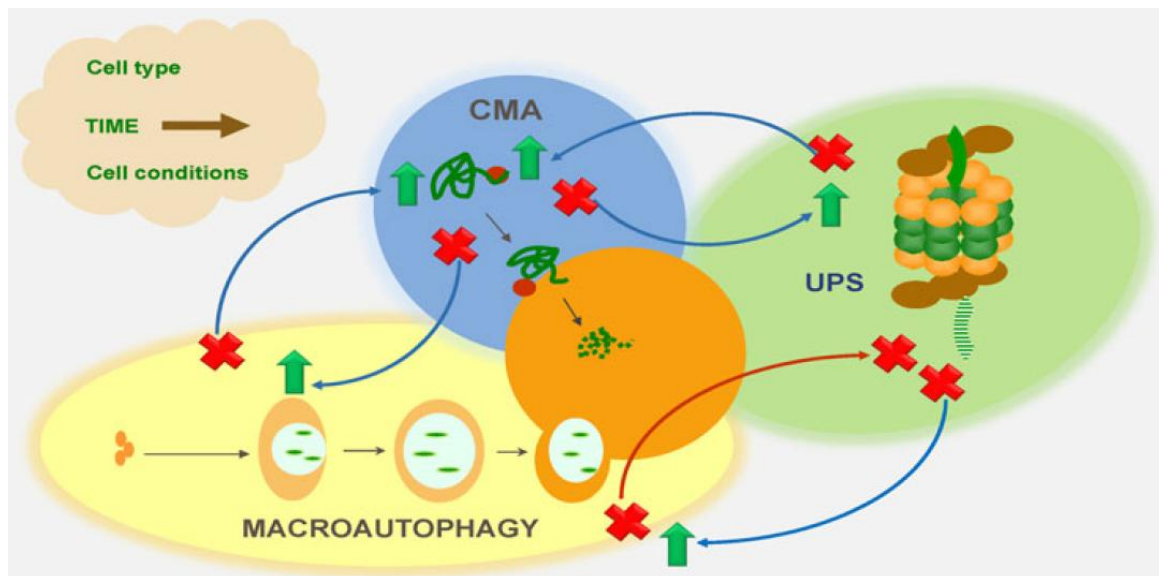


Figure 33. Représentation schématisée des mécanismes compensatoires permettant d'assurer la protéolyse en cas d'inhibition de la macroautophagie, de la CMA et de l'UPS (Park *et al.*, 2013).



Objectifs

Objectifs

De nos jours, l'IC représente une des premières cause de morbi-mortalité dans les pays développés et ce en dépit de l'amélioration de la prise en charge des patients. En pratique clinique, le seul biomarqueur pronostic d'IC utilisé est le BNP/NT-proBNP. Toutefois, le dosage du BNP/NT-proBNP présente de nombreuses limitations puisque le niveau de BNP, mais surtout du NT-proBNP, est clairement associé à l'âge et à la fonction rénale. De plus, le BNP/NT-proBNP est utile pour le diagnostic des patients souffrant d'IC et donc à un stade avancé de la maladie mais ne permet pas à lui seul de diagnostiquer les patients ayant un taux de BNP dans la « zone grise », c'est-à-dire compris entre 100 et 400 pg/mL (Chugh *et al.*, 2013). Les mécanismes physiopathologiques sous-jacents à l'IC étant toujours inconnus, les thérapeutiques actuelles traitent les symptômes d'IC qui apparaissent une fois la pathologie bien installée (Agnetti *et al.*, 2014). L'identification de nouveaux biomarqueurs du RVG post-IDM ainsi que la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la survenue et le développement de l'IC post-IDM permettraient à la fois de diagnostiquer les patients à risque mais aussi de développer des thérapeutiques capables de soigner les causes de l'IC et non les conséquences. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet de thèse.

Afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs pronostiques du RVG post-IDM mais aussi de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le RVG pathologique menant au développement de l'IC, l'équipe a comparé par approche protéomique, sans *a priori*, les phosphoprotéomes des VG de rat à partir d'un modèle d'expérimental d'IC à 2 mois post-IDM. Après coloration des gels 2D au ProQ Diamond et au SyproRyby, l'équipe a pu mettre en évidence une modulation du niveau de phosphorylation de 69 spots correspondant à 30 protéines dans les VG de rats IC par rapport aux témoins (Dubois *et al.*, 2011). Parmi ces protéines, 5 protéines sarcomériques ont été identifiées : la Desmine et sa chaperonne l' α B-crystalline, la troponine T (TnT) et les chaînes légères 1/3 et 2 de la myosine. L'existence d'une balance phosphorylation/O-N-acétylglucosaminylation (O-GlcNAcylation) permettant la régulation fonctionnelle d'un grand nombre de protéines (Linton *et al.*, 2015) a incité l'équipe à mesurer le niveau de o-glcnaacylation des 5 protéines sarcomériques identifiées dans l'analyse phosphoprotéomique comme ayant une modulation de leur niveau de phosphorylation. De manière intéressante, 2 de ces protéines, la Desmine et la TnT, voyaient leur niveau de phosphorylation et d'O-GlcNAcylation modulés dans des sens opposés dans les VG de rats IC.

Nous nous sommes intéressés en premier lieu à la caractérisation des MTPs de la TnT qui, en contrôlant l'interaction actine-myosine, est une protéine directement impliquée dans la régulation de la contraction musculaire. Les travaux menés au laboratoire ont permis d'identifier précisément l'acide aminé impliqué dans la diminution du niveau de phosphorylation de la TnT dans le modèle d'IC chez le rat, à savoir la sérine 208 (Ser208). La TnT phosphorylée en Ser208 a également été montrée diminuée dans le plasma des rats IC à 2 mois post-IDM. La validation de ces données chez l'homme a permis de démontrer que la TnT phosphorylée en Ser208 est un nouveau biomarqueur pronostique du RVG post-IDM (Dubois *et al.*, 2011). La mise en évidence de l'existence d'une corrélation entre le taux plasmatique de TnT phosphorylée en Ser208 et la fonction cardiaque a permis de souligner l'importance des MTPs des protéines sarcomériques au cours du RVG post-IDM et de l'IC mais aussi

Objectifs

l'importance d'identifier les acteurs ces MPTs (Dubois-Deruy *et al.*, 2013).

Ainsi, au cours de ma thèse, j'ai participé à l'identification précise de l'acide aminé impliqué dans la modulation du niveau d'O-GlcNAcylation de la TnT dans le modèle d'IC chez le rat mais aussi à la mise en évidence de l'existence d'une balance phosphorylation/O-GlcNAcylation de la TnT (Résultats, Partie 1). Néanmoins, mon travail de thèse portait principalement sur l'étude de la régulation post-traductionnelle de la Desmine dans le modèle d'IC chez le rat et s'articulait autour de 3 grands axes qui recourent :

- L'étude de la Desmine en tant que potentiel biomarqueur du RVG post-IDM et/ou de l'IC (Résultats, Partie 2) ;
- L'identification du ou des résidus impliqué(s) dans l'augmentation de la forme phosphorylée de la Desmine et de la ou des protéines kinases impliquées (Résultats, Partie 3) ;
- L'identification des mécanismes responsables de l'accumulation de Desmine phosphorylée dans les VG de rats IC et mais aussi les mécanismes mis en œuvre pour l'éliminer (Résultats, Partie 4).



Matériel et Méthodes

I. Modèles

A. Modèle animal

L'ensemble des expériences impliquant des animaux ont été réalisées selon la réglementation relative au traitement et à l'utilisation des animaux de laboratoire publiée par l'Institut National Américain de la Santé. La rédaction des protocoles expérimentaux ainsi que l'utilisation des animaux ont été supervisées par une personne habilitée à l'expérimentation sur animaux vivants (F. Pinet: 59-350126 ; date d'expiration : 22 Juin 2016).

Le modèle expérimental d'IC est réalisé en collaboration avec l'unité INSERM U1096 dirigée par le Pr Vincent Richard à Rouen. L'IDM est induit par ligature de la branche descendante de l'artère coronaire gauche (figure 34) chez des rats mâles de souche Wistar (Janvier, Le Genest St Isle, France) âgés de 10 semaines (n=11) qui constituent le groupe IC. Le groupe témoin (n=11) est constitué de rats Wistar également âgés de 10 semaines ayant subi l'intervention mais sans ligature de l'artère selon le protocole décrit en 1997 par Mulder *et al.* Avant de procéder à l'opération, les animaux sont anesthésiés par une injection en intrapéritonéal (IP) de sodium méthohexital (50 mg/kg). Les animaux reçoivent également une dose d'analgésique en amont de la chirurgie (xylazine 5 mg/kg, IP) et 1h après (xylazine 50 mg/kg, IP) afin d'abolir toute sensation de douleur.

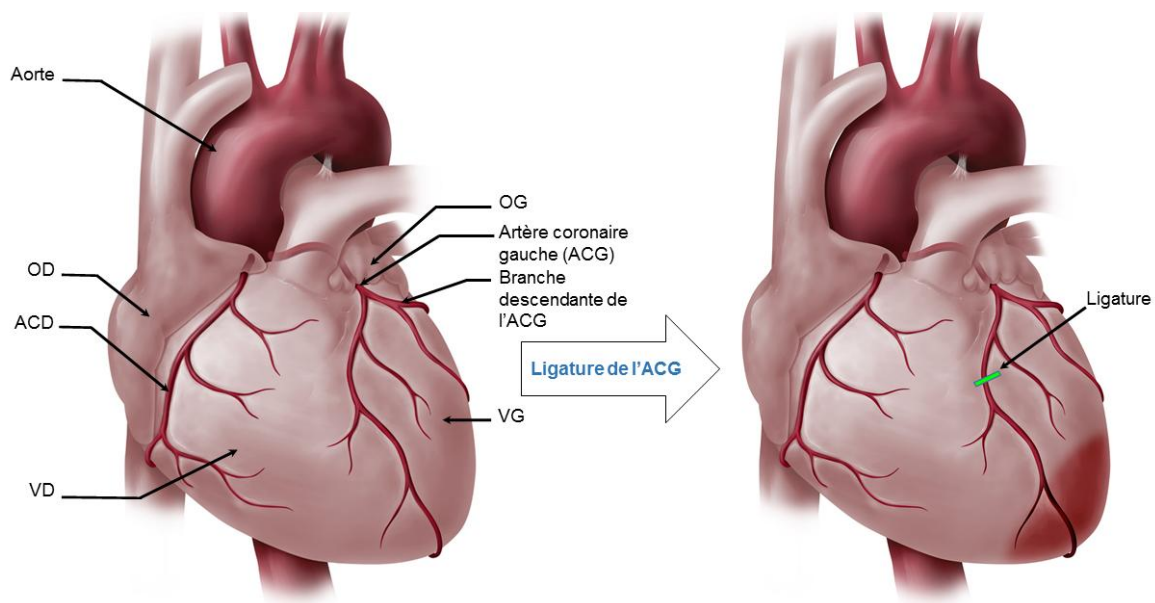


Figure 34. Représentation schématique de la ligature de l'artère coronaire gauche du modèle expérimental d'IC chez le rat. ACD : artère coronaire droite ; ACG : artère coronaire gauche ; OD : oreillette droite ; OG : oreillette gauche ; VD : ventricule droit ; VG : ventricule gauche.

Après 2 mois de ligature, les paramètres hémodynamiques et échocardiographiques des animaux sont mesurés après anesthésie par le sodium méthohexital (50 mg/kg, IP). Avant de prélever le sang

et le cœur des animaux, les rats sont euthanasiés par une administration excessive de sodium pentobarbital (500 mg/kg, IP).

Les cœurs sont lavés de leur sang par incubation dans le tampon Krebs-Henseleit (120 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4 , 1,2 mM MgSO_4 , 25mM NaHCO_3 , 11 mM D-Glucose, 2,5 mM CaCl_2) puis chaque compartiment du cœur est minutieusement disséqué afin d'éliminer les zones nécrosées avant d'être congelé à -80°C .

Les échantillons de sang sont collectés dans des tubes sous EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique) puis centrifugés pendant 15 min à 1600 g afin de séparer le plasma des cellules du sang ainsi que des plaquettes. Les plasmas, correspondant aux surnageants obtenus après centrifugation, sont récupérés puis congelés à -80°C .

1. Déplétion en albumine et immunoglobulines

Les plasmas sont déplétés en albumine et en immunoglobulines de type G (IgG) à l'aide du kit ProteoPrep Blue Albumin and IgG Depletion (Sigma-Aldrich). Un volume de 25 μL de plasma est ajouté sur la colonne après équilibration de celle-ci selon le protocole du fabricant, et incubé pendant 20 min à température ambiante (TA). Une centrifugation de la colonne pendant 1 min à 10 600 g permet de récupérer l'éluat qui est à nouveau déposée et incubé sur la colonne pendant 10 min. Une nouvelle centrifugation permet de collecter l'éluat. La colonne est ensuite lavée avec 100 μL de tampon d'équilibration avant d'être centrifugée pendant 1 min à 18 000 g afin de collecter la seconde fraction de l'éluat qui est additionnée à la première. La concentration en protéines est déterminée par la méthode de Bradford. Les plasmas déplétés sont conservés à -20°C .

2. Equalisation

Les plasmas sont égalisés à l'aide du kit ProteoMinerTM Protein Enrichment (Bio-Rad). Dans un premier temps, la colonne contenant 500 μL de billes en suspension (20% [v/v] billes, 20% [v/v] éthanol, 0.5% [v/v] acétonitrile (ACN)) est centrifugée à 1000 g pendant 2 min afin d'éliminer la solution de stockage. La colonne est ensuite lavée pendant 5 min avec 1 mL d'eau déionisée avant d'être centrifugée pendant 2 min à 1000 g. Un second lavage réalisé avec 1 mL de tampon de lavage (150 mM NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 dans du tampon phosphate salin (PBS), pH 7.4) permet d'équilibrer la colonne. Un volume de 200 μL de plasma est déposé et incubé sur la colonne pendant 2h à TA. Les protéines non liées sont éliminées par centrifugation de la colonne pendant 2 min à 1000 g et par lavage des billes (4 fois avec 1 mL de tampon de lavage et 1 fois avec 1 mL d'eau déionisée). Afin d'éluer les protéines liées, les billes sont incubées pendant 15 min à TA avec 100 μL de solution d'élution (solution d'élution lyophilisée (4 M urée, 1% [v/v] CHAPS) reconstituée dans 610 μL d'acide acétique 5%) et la colonne est centrifugée pendant 2 min à 1000 g. L'étape d'élution est répétée 2 fois. Les éluats sont ensuite poolés et la concentration protéique est déterminée par la méthode de Bradford. Les plasmas égalisés sont conservés à -20°C .

B. Modèles cellulaires

1. Lignée H9c2

Les cellules H9c2 (American Type Culture Collection [ATCC], CRL-1446) constituent une lignée immortalisée de cellules cardiomyoblastiques dérivées de cœurs de rats embryonnaires (souche BDX1) ayant des propriétés électrophysiologiques et biochimiques proches de celles du tissu cardiaque et/ou squelettique en fonction des conditions de culture (Kimes, 1976; Ménard, 1999; Lau *et al.*, 2012).

Les cellules H9c2 sont cultivées dans du milieu minimum essentiel de Dulbecco (DMEM GlutaMAX™-I, 25 mM D-Glucose, 1 mM pyruvate de sodium, glutamine, Life technologies) complété avec 10% [v/v] de sérum de veau fœtal (SVF, ATCC) et 1% [v/v] de pénicilline-streptomycine (Life technologies). Afin d'éviter la dédifférenciation des cellules H9c2 en myotubes polynucléés (Kimes, 1976), les cellules sont détachées du fond de la boîte lorsqu'elles atteignent 70 à 80% de confluence par une incubation, après 2 rinçages des cellules avec du PBS 1X, avec de la trypsine-EDTA pendant 10 min à 37°C. Pour arrêter l'action de la trypsine, la suspension de cellules est diluée et homogénéisée avec du milieu DMEM complet avant d'être centrifugée à 1 880 g pendant 10 min. Le surnageant est éliminé et le culot de cellules est resuspendu dans 1 mL de milieu complet afin de réaliser un dénombrement cellulaire sur cellule de Malassez. Les cellules H9c2 sont ensemencées à 100 000 cellules par puits de plaques 6 puits et maintenues en culture durant 2 jours dans une atmosphère à 5% de CO₂.

2. Culture primaire de cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux

Les cardiomyocytes de rats nouveau-nés (NCM) sont isolés à partir de ventricules de cœurs de rats Wistar néonataux âgés de 1 à 2 jours selon la méthode décrite par Oyamada *et al.* en 1994.

Après désinfection des rats néonataux dans 2 bains d'éthanol successifs, les animaux sont sacrifiés par décapitation afin d'isoler les cœurs. Ces derniers sont incubés dans une solution saline équilibrée (20 mM HEPES, 120 mM NaCl, 1 mM NaH₂PO₄, 5,5 mM glucose, 5,4 mM KCl, et 0,8 mM MgSO₄, pH 7.2) dans le but d'éliminer le sang. Les oreillettes sont ensuite éliminées et les ventricules coupés en petits morceaux de 1 à 2 mm de large à l'aide de ciseaux afin d'augmenter la zone de contact avec les enzymes et ainsi améliorer l'efficacité de la digestion. Dans un premier temps, une étape de prédigestion est réalisée afin de préparer le tissu à la digestion enzymatique. Pour cela, les morceaux de ventricules sont incubés sous agitation (150 rotations par minutes (rpm), Incu Shaker mini, Benchmark) pendant 8 min à 36°C dans la solution saline équilibrée (6 mL pour 24 cœurs environ) contenant 0,04% [m/v] de collagénase II (Worthington, Lakewood, NJ, USA) et 0,05% [m/v] de pancréatine (Sigma-Aldrich). Le surnageant est ensuite éliminé avant de procéder à la digestion enzymatique pour isoler les cellules cardiaques. Pour ce faire, les morceaux de ventricules sont incubés sous agitation (150 rpm) pendant 15 min à 36°C dans la même solution que pour la prédigestion. A l'issue des 15 min, le surnageant est récupéré et additionné de 1 mL de SVF afin

d'inactiver les enzymes de digestion puis est centrifugé pendant 1 min à 133 g. Le surnageant est éliminé et le culot contenant les cellules cardiaques est resuspendu dans 4 mL de milieu de culture complet (DMEM + Medium199 (Sigma-Aldrich) 4:1 [v/v], 10% [v/v] sérum de cheval (Life Technologies), 5% [v/v] SVF (ATCC), 1% pénicilline-streptomycine (Life Technologies)). Ces étapes sont répétées 4 à 5 fois jusqu'à digestion maximale des ventricules. L'ensemble des suspensions cellulaires obtenues sont regroupées et centrifugées pendant 7 min à 133 g afin de précipiter les cellules qui sont ensuite resuspendues dans du milieu de culture complet (6 mL pour les cellules de 24 cœurs environ). Un gradient de percoll (bas du gradient : 58,5% [v/v] percoll; haut du gradient : 40,5% [v/v] percoll dans la solution saline équilibrée) est utilisé pour séparer les cardiomyocytes des autres cellules cardiaques (notamment des fibroblastes) et des débris cellulaires. Un volume de 2 mL de suspension cellulaire est déposé délicatement sur le gradient de percoll et l'ensemble est centrifugé à TA pendant 30 min à 1 600 g (Figure 35).

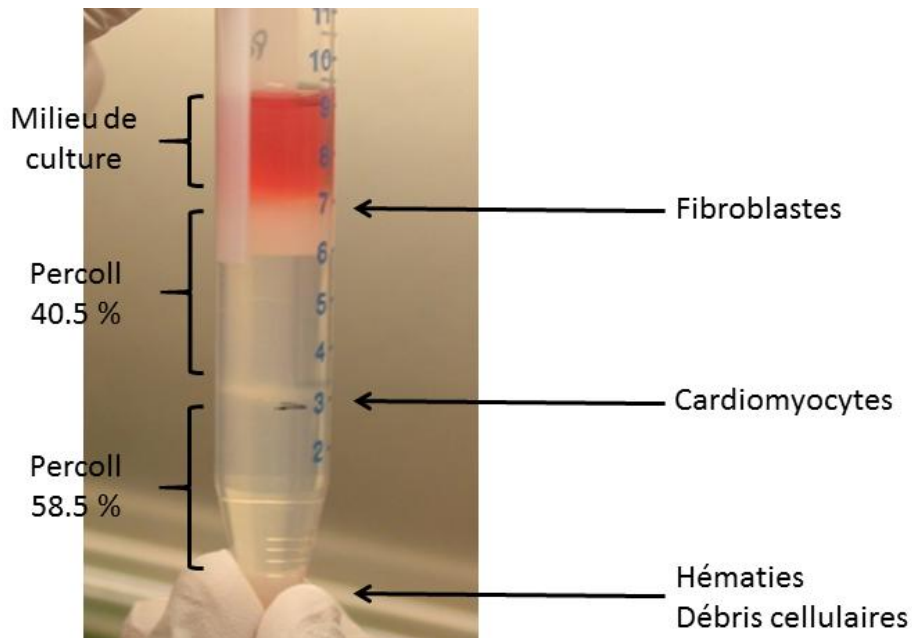


Figure 35. Isolement des cardiomyocytes de rats néonataux à l'aide d'un gradient de percoll. Après 30 min de centrifugation, les cardiomyocytes ont migré à l'interface entre le percoll 58.5% et le percoll 40.5% alors que les fibroblastes sont restés en haut du gradient et que les débris cellulaires ont précipité au fond du tube.

A l'issue de la centrifugation, les cardiomyocytes sont récupérés et resuspendus dans 45 mL de milieu complet. Une centrifugation de 7 min à 133 g permet de précipiter les NCM mais aussi d'éliminer le percoll. Les cellules sont alors resuspendues dans 5 mL de milieu de culture complet, comptées sur cellule de Malassez etensemencées à 400 000 cellules par puits de plaque 6 puits (800 000 siensemencées sur lamelles de verre) et maintenues en culture pendant 7 jours à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂. Le milieu est changé tous les 1 à 2 jours.

II. Traitements pharmacologiques

A. Inhibition pharmacologique de PKC ζ

Avant de traiter les cellules H9c2 et les NCM avec un inhibiteur pharmacologique de la kinase PKC ζ lipidé et donc perméable à la membrane cellulaire, les cellules sont sevrées en sérum pendant 1h. Les cellules H9c2 et les NCM sont ensuite incubées pendant 30 min et 1h respectivement, avec 10 μ M de myristoylated PKC ζ pseudosubstrate (myr PS [Myr-Ser-Ile-Tyr-Arg-Arg-Gly-Ala-Arg-Arg-Trp-Arg-Lys-Leu-OH], Enzo Life Sciences) dans un milieu sans sérum. En intracellulaire, ce dernier se loge dans la poche de liaison au substrat et bloque ainsi le site catalytique de PKC ζ .

B. Induction de la CMA

Les cellules H9c2 et les NCM sont sevrées en sérum pendant 24h avant d'être traitées avec 2 et 5 μ M de geldanamycine (GA, Enzo Life Sciences) pendant 17h afin d'induire la CMA (Pedrozo et *al.*, 2013). La GA est un antibiotique connu pour inhiber l'activité chaperonne de Hsp90 en se logeant dans sa poche de liaison à l'ATP (Kamal, 2009).

C. Inhibition du protéasome et de la macroautophagie

Avant de traiter les NCM avec différents agents pharmacologiques (MG132, 3-méthyladénine [3MA]), les cellules sont sevrées en sérum durant 24h. Le MG132 (Sigma-Aldrich) est un aldéhyde peptidique connu pour inhiber l'activité protéolytique du protéasome 26S. En inhibant Vps34, la 3MA quant à elle inhibe la formation des autophagosomes. Le protocole suivi pour le traitement des NCM est décrit sur la figure 36.

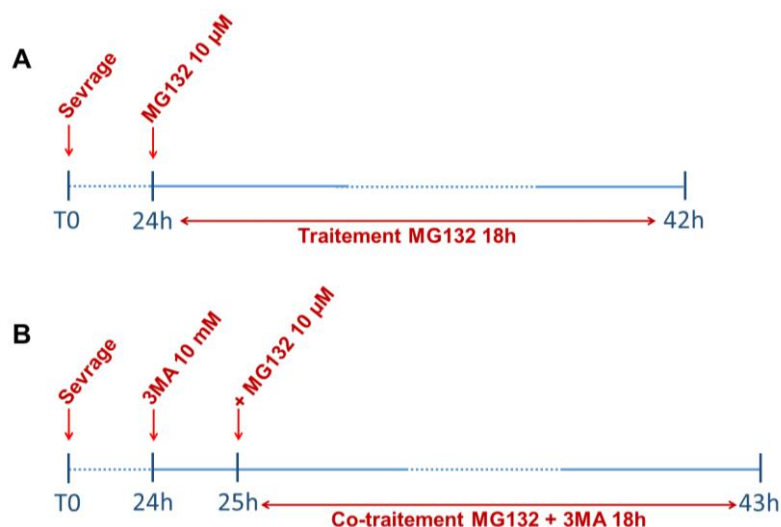


Figure 36. Schéma récapitulatif des différentes conditions de traitement des NCM. Traitement des NCM avec le MG132 (A) et co-traitement des NCM avec le MG132 et la 3MA (B).

III. Analyses biochimiques

A. Extraction des protéines

1. Protéines RIPA solubles

Les protéines RIPA solubles sont extraites à 4°C à partir d'un morceau de VG congelé d'environ 40 mg. Le tissu est broyé avec un Potter-Elvehjem sur la glace en présence de 1 mL de tampon RIPA 1X (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% [v/v] NP40 (Sigma-Aldrich), 0.5% [m/v] sodium deoxycholate et 0.1% [m/v] SDS) contenant des anti-protéases (Complete™, Roche Diagnostics), 1% [v/v] d'anti-Ser/Thr phosphatases et 1% [v/v] d'anti-Tyr phosphatases (Phosphatase inhibitor Cocktail 2 et 3, Sigma-Aldrich) ainsi que 1 mM de sodium orthovanadate (Na₃VO₄). Les lysats sont ensuite incubés pendant 1h à 4°C sur une roue avant d'être centrifugés à 4°C pendant 15 min à 15 300 g afin de collecter les surnageants contenant les protéines RIPA solubles et de les conserver à -80°C.

Les protéines RIPA solubles des cellules H9c2 et des NCMs sont extraites de la même manière par grattage des cellules dans du tampon RIPA 2X après les avoir rincées avec du PBS 1X.

2. Protéines RIPA insolubles

Les culots contenant les débris cellulaires et les protéines RIPA insolubles, obtenus après extraction des protéines RIPA solubles, sont resuspendus dans 15 µL (pour les cellules) et 300 µL (pour les VG de rats) de tampon urée-thiourée (5 M urée (Sigma-Aldrich), 2 M thiourée (Sigma-Aldrich), 50 mM DTT (Bio-Rad), 0,1% [m/v] SDS, dans du PBS pH 7.4). Les lysats sont ensuite soniqués (1 fois pendant 6 secondes pour les cellules et 3 fois pendant 6 secondes pour les VG) à une amplitude de 40% (Vibra Cell, Bioblock Scientific 72442) avant d'être incubés pendant 30 min à 4°C sur une roue. Une centrifugation à 4°C pendant 15 min à 15 300 g permet de précipiter les débris cellulaires. Les surnageants contenant les protéines insolubles sont collectés et conservés à -80°C.

3. Protéines membranaires

L'extraction des protéines membranaires est réalisée à 4°C à partir d'un morceau de VG de rats d'environ 40 mg broyé avec un Potter-Elvehjem dans 1 mL de tampon HEPES (50 mM HEPES, 0,2% [v/v] triton X-100, 10% [m/v] sucrose, pH 7.4) contenant des anti-protéases, 1% [v/v] d'anti-Ser/Thr phosphatases et d'anti-Tyr ainsi que 1 mM de Na₃VO₄. Après homogénéisation des tissus par 3 sonications de 6 secondes à 40% d'amplitude (Vibra Cell, Bioblock Scientific 72442), les lysats protéiques sont incubés pendant 30 min sur une roue à 4°C. Une centrifugation à 6 800 g pendant 10 min permet de précipiter les débris cellulaires. Les surnageants protéiques sont collectés et conservés à -80°C.

4. Dosage de la concentration en protéines

La concentration en protéines des échantillons est déterminée par la méthode de Bradford. Une gamme étalon (0, 1, 2, 5, 10, 15 et 20 µg/µL) est réalisée avec la sérum albumine bovine (BSA) dans 1 mL de solution contenant 20% [v/v] de réactif Biorad (Biorad protein assay). Pour les échantillons extraits dans le tampon urée-thiourée, un volume de tampon équivalent au volume nécessaire pour doser la concentration protéique des échantillons est ajouté dans la gamme étalon. L'absorbance est mesurée à 595 nm avec un spectrophotomètre (BioTek PowerWave XS2).

B. Immunoprécipitation et western blot

1. Immunoprécipitation

Afin d'immunoprécipiter la Desmine, 50 µg de protéines insolubles sont incubées sur la nuit à 4°C sous agitation lente avec 1 µL d'anticorps (Ac) anti-Desmine (DE-U-10, Sigma) dans du tampon RIPA 1X contenant des anti-protéases, des anti- Ser,Th et Tyr phosphatases et du Na₃VO₄. Le lendemain, les complexes formés sont récupérés par incubation des échantillons pendant 4h à 4°C avec 30 µL de billes magnétiques A/G (Pierce) préalablement lavées trois fois avec du tampon RIPA 1X. Après 4h d'incubation, les surnageants sont récupérés afin de vérifier l'efficacité de l'immunoprécipitation et les billes magnétiques sont lavées 3 fois avec le tampon RIPA 1X afin d'éliminer les protéines non-fixées. Les billes sont ensuite resuspendues dans 30µL de tampon Laemmli et incubées pendant 10 min à TA sous agitation. Les surnageants contenant la Desmine immunoprécipitée sont alors récupérés puis chargés dans un gel de polyacrylamide afin d'être analysés par western blot ou par spectrométrie de masse.

2. Western blot

Le western blot est une technique dite semi-quantitative qui permet de mesurer spécifiquement l'expression d'une protéine au sein d'un mélange protéique complexe (protéines issues des VG de rats du modèle *in vivo*, des cellules H9c2, des NCM ou encore du plasma). Le western blot se décompose en plusieurs étapes : une première étape d'électrophorèse qui consiste en la séparation des protéines de l'échantillon étudié dans un gel ; une étape de transfert des protéines sur une membrane poreuse grâce à un courant électrique ; une étape d'incubation de la membrane avec un Ac primaire dirigé contre la protéine d'intérêt ; une seconde étape d'incubation de la membrane avec un Ac secondaire (couplé à une enzyme) dirigé contre l'Ac primaire ; une étape de révélation à l'aide du substrat de l'enzyme couplé à l'Ac secondaire qui permet de détecter le signal traduisant la présence de la protéine qui est ensuite quantifié.

a) Electrophorèse en conditions dénaturantes

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) permet de séparer les protéines d'un échantillon complexe en fonction de leur poids moléculaire.

Dans un premier temps, les échantillons sont dilués dans le tampon Laemmli (62,5 mM Tris HCl pH 6,8, 2 % [m/v] SDS, 25 % [v/v] Glycérol, 0,01 % [m/v] bleu de bromophénol, 5 % [v/v] β -mercaptoéthanol) et chauffés pendant 10 min à 95°C. Les protéines sont ensuite déposées sur un gel d'acrylamide/bis-acrylamide de dimension 8,6 x 6,8 cm placé dans une cuve de migration (Bio-Rad) remplie de tampon de migration (250 mM Tris Base, 1,9 M glycine, 35 mM SDS). Les protéines sont séparées dans le gel de résolution « classique » alors que les différentes formes phosphorylées des protéines sont séparées dans un gel Phos-Tag™ (Wako) (Tableau 3). La migration s'effectue 90 volts (V) dans le gel Phos-Tag™ jusqu'à la sortie du bleu de bromophénol. Dans le gel de résolution « classique », la migration s'effectue à 90 V pendant 15 min afin que les protéines entrent dans le gel de concentration, puis à 180 V jusqu'à la sortie du bleu de bromophénol.

Tableau 3. Composition des gels de concentration et de résolution

Composition pour un gel	Gel de Concentration	Gel de résolution							
		8%		10%		12%		15%	
		Classique	Phos-Tag™	Classique	Phos-Tag™	Classique	Phos-Tag™	Classique	Phos-Tag™
% d'acrylamide	4%								
H2O ultra-pure (mL)	1,58	5,35	5,21	4,85	4,71	4,35	4,21	3,6	3,46
acrylamide/bis 40% (mL)	0,25	2	2	2,5	2,5	3	3	3,75	3,75
Tris HCl 1,5M pH 8,8 (mL)		2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Tris HCl 0,5M pH 6,8 (mL)	0,63								
SDS 10% (μ L)	25	100	100	100	100	100	100	100	100
Phos-Tag™ (μ L)			40		40		40		40
MnCl ₂ 10mM (μ L)			100		100		100		100
APS 10X (μ L)	12,5	50	50	50	50	50	50	50	50
Temed (μ L)	2,5	5	5	5	5	5	5	5	5

La concentration du gel de résolution varie en fonction du poids moléculaire de la protéine étudiée (Figure 37).

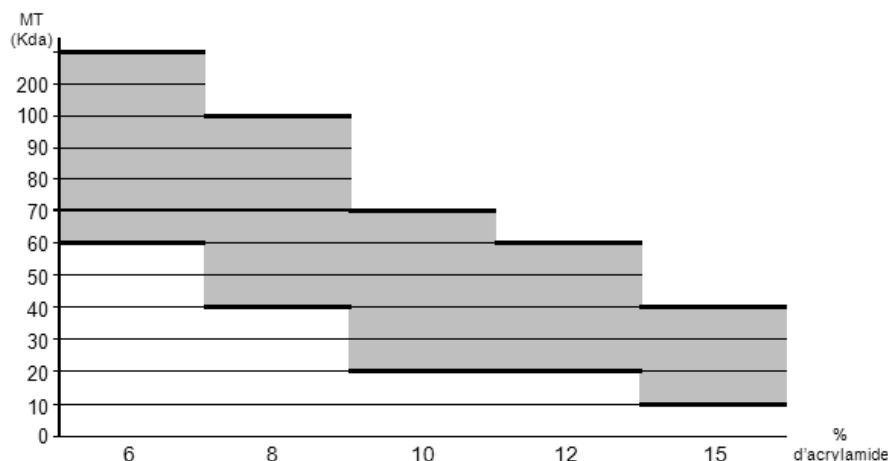


Figure 37. Représentation schématique de la séparation des protéines dans le gel de résolution en fonction du pourcentage d'acrylamide. MT : marqueur de taille ; kDa : KiloDalton.

b) Transfert des protéines sur membrane

Après la migration, les protéines du gel de résolution « classique » sont transférées sur une membrane de nitrocellulose de 0,2 μm de porosité (Trans-Blot Turbo™ Transfer pack, Bio-Rad) à l'aide du système de transfert semi-sec Bio-Rad (Trans-Blot Turbo™). L'efficacité du transfert et l'homogénéité des dépôts sont vérifiés par une coloration des protéines de la membrane au rouge ponceau (0,1 % [m/v] ponceau S (Sigma-Aldrich), 5% [v/v] acide acétique).

Avant de réaliser le transfert des protéines du gel Phos-Tag™ sur membrane PVDF (Trans-Blot Turbo™ Transfer pack, Bio-Rad), le MnCl_2 contenu dans le gel est éliminé par incubation du gel 3 fois pendant 10 min dans une solution de transfert contenant de l'EDTA (10 mM EDTA, 10% [v/v] méthanol, NuPAGE® transfer buffer (Life Technologies)) puis 3 fois pendant 10 min dans la solution de transfert sans EDTA.

c) Immunomarquage et révélation

La membrane est ensuite incubée pendant 1h à TA sous agitation lente dans la solution de saturation préparée dans le TBS-Tween (TBS-Tween; 0,1M Tris HCl [pH 7.4], 0,1% [v/v] Tween, 150 mM NaCl) afin de bloquer les sites de fixation aspécifiques de l'Ac primaire. Après la saturation, la membrane est incubée sur la nuit à 4°C sous agitation lente avec l'Ac primaire dilué dans un tampon, dans la plupart des cas, identique à celui de la saturation. Les conditions de saturation et d'hybridation des membranes avec les différents Ac primaires utilisés sont résumées dans le tableau 4.

Tableau 4. Conditions de western blot pour les différentes protéines d'intérêt étudiées.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Espèce	Echantillon	Solution de saturation	Dilution Ac primaire	Dilution Ac secondaire
Actine sarcomérique	Dako	MO874	Souris	VG rat NCM	Lait 5%	1/2 000	1/5 000
Aurora B	BD Transduction Laboratories	611082	Souris	VG rat	Lait 5%	1/1 000	1/5 000
Beclin-1	Cell Signaling	#3738	Lapin	VG rat NCM	Lait 5%	1/1 000 BSA 5% 1/2 000 BSA 5%	1/5 000 Lait 5%
CaMK II	Abcam	ab22609	Souris	VG rat	Lait 5%	1/1 000	1/5 000
CaMK II p-T287	Thermo Scientific	PA5-17755	Lapin	VG rat	Lait 5%	1/1 000	1/5 000
CryAB	Enzo Life Sciences	ADI-SPA-223-F	Lapin	VG rat NCM	Lait 5%	1/15 000 1/20 000	1/20 000 1/20 000
CryAB p-S59	Abcam	ab5577	Lapin	VG rat	BSA 1% + Lait 1%	1/4 000	1/5 000
Desmine	Abcam	ab32362	Lapin	VG rat Plasma NCM H9c2	Lait 5%	1/1 000 1/2 000 1/5 000 1/5 000	1/5 000 1/10 000 1/10 000 1/10 000
Desmine	Dako	M0760	Souris	Plasma	Lait 5%	1/2 000	1/10 000
Desmine	Sigma	DE-U-10	Souris	Plasma NCM	Lait 5%	1/2 000 1/5 000	1/10 000 1/10 000
Desmine p-S60	Abcam	ab111382	Lapin	VG rat	BSA 1% + Lait 1%	1/2 000	1/5 000
GAPDH	Santa Cruz	sc-365062	Souris	VG rat NCM	Lait 5%	1/5 000	1/10 000
GSK-3β	Cell Signaling	#9315	Lapin	VG rat NCM	Lait 5%	1/10 000 1/3 000 BSA 5%	1/10 000 1/10 000
GSK-3β p-S9	Cell Signaling	#9336	Lapin	VG rat NCM	Lait 5%	1/2 000 BSA 5% 1/3 000 BSA 5%	1/5 000 Lait 5% 1/10 000 Lait 5%
Hsc70	Abcam	ab2788	Souris	VG rat NCM	Lait 5%	1/20 000	1/40 000
Hsp40	Abcam	ADI-SPA-400-F	Lapin	VG rat	Lait 5%	1/5 000	1/10 000
Hsp90	Abcam	ab13492	Souris	VG rat NCM	Lait 5%	1/500 1/1 000	1/5 000 1/3 000
LAMP2a	Invitrogen	51-2200	Lapin	VG rat NCM	Lait 5%	1/2 500 1/2 000	1/5 000
LC3B	Cell Signaling	#2775	Lapin	VG rat NCM	BSA 1% + Lait 1%	1/1 000	1/3 000
p62	BD Transduction Laboratories	610498	Souris	VG rat NCM	Lait 5%	1/1 000	1/5 000
PLB	Santa Cruz	sc-21923	Chèvre	VG rat	Lait 5%	1/500	1/5 000
PLB p-T17	Santa Cruz	sc-17024-R	Lapin	VG rat	Lait 5%	1/2 000	1/5 000
p-Ser	Sigma	P5747	Souris	NCM	BSA 5%	1/200	1/5 000
PKCζ C-20	Santa Cruz	sc-216	Lapin	NCM	Lait 5%	1/2 000	1/10 000
PKCζ N-17	Santa Cruz	sc-7262	Chèvre	VG rat	Lait 5%	1/1 000	1/10 000
PKCζ p-T560	Abcam	ab62372	Lapin	VG rat NCM	BSA 1% + Lait 1%	1/1 000	1/5 000
RACK1	Santa Cruz	sc-17754	Souris	VG rat	Lait 5%	1/1 000	1/5 000
TRIM32	LSBio	LS-B1105 / 8586	Lapin	VG rat	Lait 5%	1/5 000	1/5 000
mono- et poly-ubiquitine	Enzo Life Sciences	BML-PW8810	Souris	VG rat NCM	BSA 5%	1/1 000 1/2 500	1/5 000

* % en [m/v]

Le lendemain, la membrane est lavée 3 fois pendant 10 min avec la solution de TBS-Tween afin d'éliminer l'excédent d'Ac primaire. La membrane est ensuite incubée sous agitation lente pendant 1h à TA avec l'Ac secondaire couplé à la peroxidase de raifort (HRP pour *HorseRadish Peroxidase*) diluée dans la solution de saturation (Tableau 4). Trois lavages avec la solution de TBS-Tween sont de nouveau réalisés pour éliminer l'excédent d'Ac secondaire avant de procéder à la révélation. Pour ce faire, la membrane est incubée pendant 5 min dans l'obscurité en présence d'ECL (pour *Enhanced Chemiluminescent*) Clarity (Bio-Rad). La HRP couplée à l'Ac secondaire va alors catalyser une réaction menant à l'émission de luminescence. Le signal est détecté à l'aide de la caméra ChemiDocTM XRS+ (Bio-Rad) et les images sont traitées avec le logiciel Image LabTM (Bio-Rad).

Dans le cas où différents Ac sont incubés sur une même membrane, une étape de déshybridation du couple Ac primaire/Ac secondaire déjà fixé sur la membrane est nécessaire. Pour cela, la membrane est incubée pendant 15 min et à TA avec la solution de déshybridation (Restore plus western blot stripping buffer, Thermo Scientific) puis lavée 3 fois pendant 10 min avec le TBS-Tween avant de procéder à la saturation et l'hybridation avec le nouvel Ac primaire.

d) Quantification du signal

La quantification du signal obtenu après révélation du western blot est effectuée avec le logiciel Image LabTM (Biorad). La bande correspondant à la protéine d'intérêt est sélectionnée dans une aire permettant d'obtenir l'intensité de la bande en fonction de l'aire. La valeur d'intensité de la protéine d'intérêt est rapportée à la valeur d'intensité de l'échantillon et/ou de la protéine de référence (Actine sarcomérique, Actine β , GAPDH et α -tubuline). Les valeurs d'intensité sont exprimées en unité arbitraire (U.A.).

IV. Analyses en microscopie

A. Microscopie électronique

L'ultrastructure (structure des sarcomères et des organites cellulaires tels que les mitochondries et les autophagosomes) des VG de rats est analysée par microscopie électronique. Au préalable, les échantillons subissent plusieurs étapes allant de leur conditionnement à leur coloration avec des métaux lourds en passant par leur déshydratation et leur inclusion dans une résine hydrophobe.

1. Conditionnement des échantillons

En collaboration avec l'unité U1096 du Dr Vincent Richard à Rouen, les VG de rats du modèle expérimental d'IC sont fixés, immédiatement après leur prélèvement, dans une solution contenant 4% [m/v] de paraformaldéhyde et 1% [m/v] de glutaraldéhyde. La double fixation permet de préserver un

maximum de structures cellulaires. Les échantillons sont ensuite lavés 3 fois avec du PBS 1X avant d'être conservés à 4°C dans du tampon phosphate 0.1 M contenant 0.5 % [m/v] de paraformaldéhyde.

En collaboration avec la plateforme BICeL (BioImaging Center Lille-Nord de France), les VG sont orientés et coupés selon l'axe apex-base en petits rectangles (inférieurs à 1 mm d'épaisseur). Les échantillons sont fixés à 4°C au moins 48h avec une solution de cacodylate de sodium à 0,1 M [pH 7.2] contenant 1% [m/v] de glutaraldéhyde. Avant de procéder à leur contraste, les échantillons sont lavés à l'eau ultrapure.

2. Contraste des échantillons

Afin de visualiser les différentes structures cellulaires, les échantillons sont contrastés pendant 1h à l'obscurité dans deux bains successifs composés de 1% [m/v] de tétr oxyde d'osmium et 1,5% [m/v] de potassium hexacyanoferrate pour l'un et de 1% [m/v] d'acétate d'uranyl pour l'autre. Après chaque bain, plusieurs lavages à l'eau ultrapure sont réalisés afin d'éliminer le surplus de contrastants. Les tissus sont ensuite déshydratés afin de remplacer l'eau des échantillons par de l'éthanol qui à son tour est remplacé par le milieu d'enrobage au moment de l'inclusion. Pour cela, les tissus sont incubés pendant 15 à 20 min dans des bains d'éthanol de concentration croissante (50%, 70%, 95% et deux fois 100%). Les échantillons sont ensuite incubés sur la nuit dans une solution d'imprégnation composée de 50% de résine Epon et de 50% d'éthanol [v/v]. Le lendemain, les échantillons sont incubés dans une nouvelle solution d'imprégnation composée de résine Epon et de 1,7% [m/v] diméthylaminoéthanol (DMAE) qui est changée à plusieurs reprises durant 2 jours. Après imprégnation de l'échantillon dans la résine, cette dernière polymérise dans et autour de l'échantillon par chauffage à 60°C pendant 48h. Des coupes ultrafines de 80 nm d'épaisseur sont réalisées avant d'être déposées sur des grilles en cuivre (100 mesh) recouvertes de formvar.

3. Analyse au microscope électronique

En collaboration avec le Dr Barois de la plateforme BICeL, l'ultrastructure des VG de rats a été observée à l'aide d'un microscope électronique à transmission (Hitachi H7500) à 80 kV équipé d'une caméra digitale (système AMT) à 1 Mpixels.

B. Microscopie confocale

L'immunofluorescence est une technique d'immunomarquage qui permet de déterminer la localisation cellulaire voire subcellulaire d'une protéine ou encore de mettre en évidence une co-localisation entre protéines notamment grâce à la technique du Proximity Ligation Assay (PLA). L'immunofluorescence se décompose en 4 grandes étapes : la fixation des cellules ou du tissu à étudier ; la perméabilisation des cellules ; l'hybridation de l'échantillon avec les Ac primaires reconnaissant les protéines d'intérêt puis avec les Ac secondaires, couplés à un fluorochrome ou à

des sondes PLA, qui reconnaissent le ou les Ac primaires ; la détection du signal fluorescent au microscope confocal.

1. Fixation de l'échantillon

Les cellules en culture sont rincées 2 fois avec du PBS 1X avant d'être fixées pendant 20 min à TA avec une solution de PBS 1X contenant 4% [m/v] de paraformaldéhyde.

Des morceaux congelés de VG de rats du modèle sont inclus dans un milieu d'enrobage spécifique pour coupes congelées hydrosolubles (Richard-Allan Scientific™ Neg-50™, Thermo Scientific) qui permet d'obtenir des sections de haute qualité sans irrégularités. Des coupes de 10 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées à l'aide d'un cryostat puis sont déposées sur lamelles de verre avant d'être séchées pendant 1h à 37°C. De la même manière que pour les cellules en culture, les coupes de tissu sont fixées pendant 20 min à TA avec une solution de PBS 1X contenant 4% [m/v] de paraformaldéhyde.

Les échantillons (cellules et tissus) sont rincés 3 fois pendant 5 min avec du PBS 1X avant de procéder à la perméabilisation des cellules.

2. Perméabilisation des cellules

La perméabilisation des cellules est une étape indispensable pour le marquage des protéines. Cette étape permet la formation de pores dans la membrane cellulaire qui favorisent l'entrée des Ac primaires et secondaires dans les cellules. Pour ce faire, l'échantillon est incubé pendant 20 min à TA avec une solution de PBS 1X contenant 0,1 % [v/v] de triton X-100 puis 3 rinçages de 5 min au PBS 1X sont réalisés.

3. Incubation avec les anticorps primaires et secondaires

Avant de procéder à l'hybridation avec les Ac primaires et secondaires, l'échantillon est incubé pendant 30 min à TA avec une solution de PBS 1X contenant 1% [m/v] de BSA afin de bloquer les sites de fixation aspécifiques des Ac primaires. A l'issue de l'étape de saturation, l'échantillon est incubé sur la nuit à 4°C (ou 2h à TA) avec l'Ac primaire dilué dans la solution de BSA 1%. Le lendemain, l'échantillon est lavé 3 fois pendant 10 min avec du PBS 1X avant d'être incubé avec les Ac secondaires.

Dans le cas d'une immunofluorescence classique, l'échantillon est incubé pendant 30 min à TA avec les Ac secondaires couplés à un fluorochrome (goat anti-souris Alexa 488 et Alexa 555 ; goat anti-lapin Alexa 488 et Alexa 555, Invitrogen). Trois rinçages de 10 min sont de nouveau réalisés avant de monter les lamelles sur lames de verre avec du milieu de montage contenant du DAPI (Vectashield H-1500, Vector) qui permet de marquer les noyaux des cellules. Les conditions

d'hybridation des échantillons avec les différents Ac primaire et secondaire sont résumées dans le tableau 5.

Tableau 5. Conditions d'immunomarquage des différentes protéines d'intérêt étudiées.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Espèce	Echantillon	Dilution Ac primaire	Dilution Ac secondaire
Aurora B	BD Transduction Laboratories	611082	Souris	H9c2	1/50	1/500
CryAB	Enzo Life Sciences	ADI-SPA-223-F	Lapin	NCM	1/200	1/500
CryAB p-S59	Abcam	ab5577	Lapin	VG rat	1/200	1/500
Desmine	Abcam	ab32362	Lapin	VG rat NCM	1/100	1/500
Desmine	Dako	M0760	Souris	VG rat NCM	1/100	1/500
Desmine	Sigma	DE-U-10	Souris	VG rat NCM	1/100	1/500
Hsc70	Abcam	ab2788	Souris	NCM	1/100	1/500
LAMP1	Enzo Life Sciences	ADI-VAM-EN001	Souris	NCM	1/50	1/300
LAMP2a	Invitrogen	51-2200	Lapin	NCM	1/50	1/300
PKCζ C-20	Santa Cruz	sc-216	Lapin	VG rat	1/100	1/500
RACK1	Santa Cruz	sc-17754	Souris	VG rat	1/100	1/500
TRIM32	Thermo Scientific	PA5-22316	Lapin	VG rat	1/100	1/500

Dans le cas d'un PLA, le marquage est réalisé en suivant les instructions du fournisseur et en utilisant les réactifs du kit Duolink® (Olink Bioscience, Uppsala, Suède). Brièvement, l'échantillon est incubé pendant 1h à 37°C avec les anticorps secondaires couplés à des sondes nucléotidiques (ou sondes PLA) compatibles (Duolink® In Situ PLA® Probe anti-mouse PLUS et anti-Rabbit MINUS, Sigma-Aldrich) diluées au 1/5 dans la solution de BSA 1%. Après 2 lavages avec du PBS 1X, l'échantillon est incubé pendant 30 min à 37°C avec la ligase du kit diluée au 1/40 dans la solution de ligation 1X. Cette étape permet l'hybridation et la ligation des oligonucléotides, présents dans la solution de ligation, aux sondes PLA et la formation d'un ADN double brin si les sondes sont à moins de 40 nm de distance. L'échantillon est ensuite lavé 2 fois pendant 2 min avec du PBS 1X avant d'être incubé dans l'obscurité pendant 1h40 à 37°C avec la polymérase du kit diluée au 1/80 dans la solution d'amplification 1X contenant des nucléotides et oligonucléotides fluorescents. Cette étape permet d'amplifier l'ADN double brin par réaction en chaîne par polymérase lorsqu'il y a eu ligation entre les 2 sondes PLA. Les oligonucléotides fluorescents présents dans la solution d'amplification s'hybrident aux produits d'amplification et permettent de mettre en évidence une colocalisation entre les protéines étudiées sous forme de points lumineux visibles au microscope confocal. Trois rinçages de 10 min sont de nouveau réalisés avant de monter les lamelles sur lames de verre de la même manière que pour l'immunofluorescence classique.

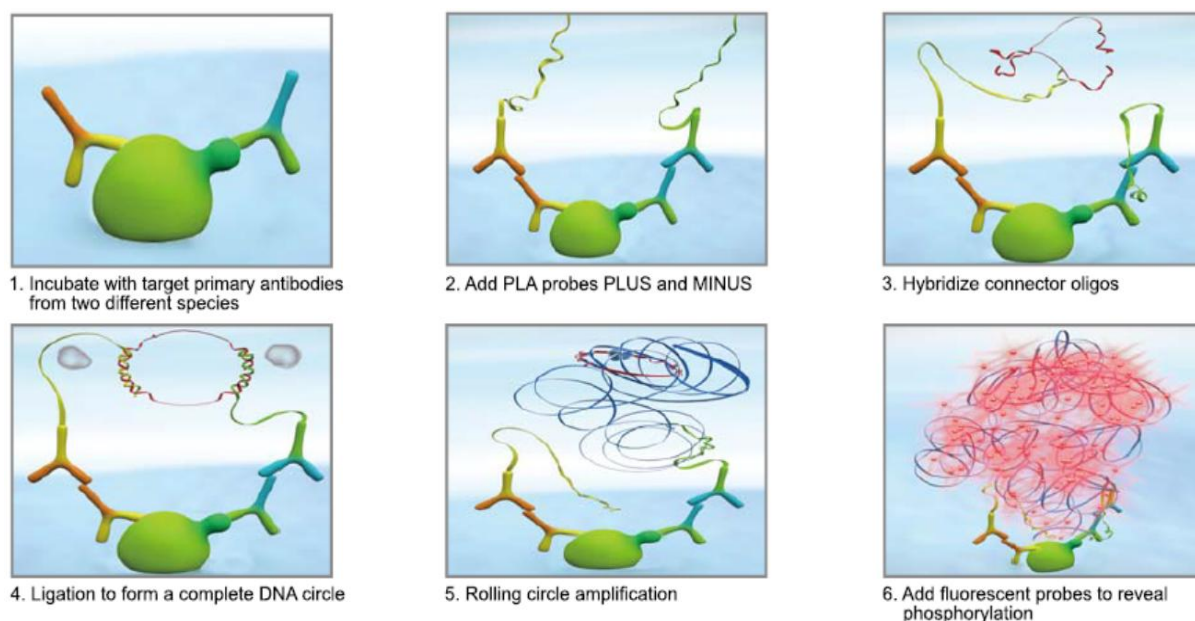


Figure 38. Schéma récapitulatif des différentes étapes d'un test PLA

4. Détection du signal/lecture des lames au microscope confocal

Les lames sont analysées à l'aide d'un microscope confocal ZEISS LSM 710 équipé d'une diode UV et de 3 lasers dans le visible (un laser argon multi-raies à 458 nm, 477 nm, 488 nm, et 514 nm et deux lasers hélium-néon à 543 nm et 633 nm). L'utilisation du laser argon multi-raies à 458 nm permet de visualiser les noyaux des cellules colorés au DAPI. Le laser argon multi-raies à 488 nm est utilisé pour observer les protéines via la détection du fluorochrome Alexa 488 et le laser hélium-néon à 543 nm permet de visualiser les protéines via l'Alexa 555.

V. Spectrométrie de masse

Les analyses en spectrométrie de masse ont été réalisées en collaboration avec la Plateforme de Protéomique et Peptides Modifiés (P3M) de Lille. Le détail de la démarche expérimentale est présenté dans la partie 2 des résultats (article soumis).



Résultats



Partie 1

Etude de la balance
phosphorylation/O-GlcNAcylation
de la troponine T dans l'insuffisance
cardiaque post-infarctus

I. Objectifs de l'étude

Afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs du RVG post-IDM mais aussi de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la survenue et le développement de l'IC, l'équipe a comparé par approche protéomique sans *a priori*, les phosphoprotéomes des VG de rats témoins et IC à 2 mois à partir d'un modèle expérimental d'IC chez le rat. Ce modèle expérimental d'IC a été développé chez le rat notamment en raison de la taille de l'animal qui conditionne la faisabilité de l'acte chirurgical mais détermine également la quantité de matériel biologique disponible pour les analyses.

Parmi les différents modèles d'IC existants (IC secondaire à des modifications génétiques, à une stimulation électrique rapide [modèle de désynchronisation cardiaque], à des modifications de charges ou encore IC d'origine toxicologique ou induite par ligature des coronaires avec reperfusion [modèle ischémie] ou non [modèle d'infarctus]) l'équipe a choisi de réaliser l'étude à partir d'un modèle expérimental d'IC induit par ligature de l'ACG chez des rats mâles de souche Wistar. Ce modèle, ayant permis la découverte de l'effet bénéfique des inhibiteurs de l'ACE dans l'IC (Pfeffer *et al.* 1985), est le plus couramment utilisé puisqu'il est proche de la réalité clinique d'un patient IC dans la mesure où il permet d'étudier 2 niveaux d'IC (IC compensée et décompensée). De plus, tous les animaux subissant une ligature de l'ACG développent un RVG post-IDM et une IC comparable à ce qui est observé chez l'homme mais avec l'avantage de ne développer aucune autre pathologie habituellement associée à l'IC telles que l'athérosclérose, le diabète de type 2 ou l'hypertension artérielle (Mulder *et al.* 1997).

Les analyses phosphoprotéomiques réalisées dans le modèle expérimental d'IC chez le rat à 2 mois post-IDM ont permis de mettre en évidence une modulation du niveau de phosphorylation de 30 protéines dans les VG de rats IC dont la TnT. L'étude de la régulation post-traductionnelle de cette dernière a permis de mettre en évidence l'implication de la Ser208 dans la diminution du niveau de phosphorylation de la TnT dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM. Le niveau de TnT phosphorylée en Ser208 a également été montré diminué dans les plasmas de ces mêmes animaux. La validation d'une diminution du niveau de TnT phosphorylée Ser208 (TnT p-Ser208) chez les patients en post-infarctus (Dubois *et al.*, 2011), qui plus est corrèle avec le degré de RVG (Dubois-Deruy *et al.*, 2013), a confirmé le potentiel de biomarqueur du RVG post-IDM de la TnT p-Ser208. Néanmoins, les mécanismes moléculaires impliqués dans la diminution du niveau de phosphorylation de la TnT en Ser208 ainsi que l'impact d'une telle modulation restent encore à élucider.

Cette étude vise d'une part à identifier, par approche *in vivo*, *ex vivo* (cœur perfusé isolé) et *in vitro* à l'aide d'agents pharmacologiques et de siRNA, les enzymes impliquées dans la diminution de la forme phosphorylée de la TnT en Ser208 dans le modèle d'IC chez le rat et d'autre part à mesurer l'impact d'une telle diminution sur la contractilité cardiaque. Notre étude vise également à déterminer l'existence d'une balance phosphorylation/O-NAcetylglucosaminylation (O-GlcNAcylation) de la TnT.

II. Résultats

III. Discussion

Dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM, nous avons pu montrer que la diminution du niveau de TnT phosphorylée en Ser208 est associée à une diminution du niveau d'expression mais aussi de l'activité de la PKC ϵ , suggérant l'implication de cette kinase dans les modulations du niveau de phosphorylation en Ser208 de la TnT. Cette hypothèse a été renforcée par la mise en évidence d'une diminution significative du niveau de phosphorylation de la TnT en Ser208 1) dans les cœurs de souris invalidées pour le gène de la PKC ϵ , 2) dans les NCM et cellules H9c2 traitées avec un inhibiteur pharmacologique spécifique de l'isoforme ϵ de la PKC ou traitées par un siRNA dirigé contre cette enzyme, 3) dans les VG des cœurs perfusés isolés traités avec le inhibiteur pharmacologique de PKC ϵ .

Par ailleurs, nous avons montré que l'inhibition pharmacologique de la PKC ϵ dans le modèle de cœur perfusé isolé entraîne une diminution de la contractilité cardiaque. Ces résultats ont été renforcés par la mise en évidence, en microscopie de force atomique sur un unique cardiomyocyte, d'une diminution de l'amplitude de contraction de la cellule sans modulation de la fréquence de battement en réponse à l'inhibition pharmacologique de PKC ϵ . L'ensemble de ces résultats suggèrent que la diminution du niveau de phosphorylation de la TnT en Ser208 induite par la diminution de l'activité PKC ϵ altère les capacités contractiles des cardiomyocytes.

Cette étude a également permis de mettre en évidence l'existence d'une balance phosphorylation/O-GlcNAcylation) de la TnT dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM. En effet, dans ces VG, nous avons montré que la diminution du niveau de phosphorylation de la TnT en Ser208 est associée à une augmentation de sa forme O-GlcNAcylée. La diminution de l'activité de la O-N-Acétyleglucosaminidase (OGA) ainsi que l'augmentation de l'activité de la O-N-Acétyleglucosaminyltransférase (OGT) mises en évidence dans le modèle *in vivo* semblent à l'origine de l'augmentation du niveau d'O-GlcNAcylation de la TnT. Par approches *in vitro* et *ex vivo*, nous avons pu montrer que la diminution du niveau de phosphorylation de la TnT en Ser208, induite par inhibition de l'activité et/ou de l'expression de la PKC ϵ , entraîne une augmentation de son niveau d'O-GlcNAcylation. Réciproquement, l'inhibition du processus d'O-GlcNAcylation des protéines, via l'inhibition de l'expression de l'OGT par siRNA, entraîne une diminution du niveau d'O-GlcNAcylation de la TnT et une augmentation de sa forme phosphorylée en Ser208. De même, l'inhibition de l'OGA, enzyme qui retire des groupements O-GlcNAc des protéines, induit une augmentation du niveau d'O-GlcNAcylation de la TnT et une diminution de son niveau de phosphorylation en Ser208. L'ensemble de ces résultats suggèrent l'existence d'une balance phosphorylation/O-GlcNAcylation de la TnT. La mise en évidence par spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire, de l'implication de la Ser190 de la TnT dans la modulation de son niveau d'O-GlcNAcylation dans le modèle *in vivo* a permis de valider l'existence d'une balance phosphorylation/O-GlcNAcylation de la TnT. En effet, ces MPTs impliquent toutes les 2 des résidus Ser et Thr et sont par conséquent des MPTs compétitives. Lorsqu'elles interviennent sur les mêmes résidus Ser et Thr ou des résidus adjacents, comme c'est le cas pour la TnT, elles sont alors mutuellement exclusives. C'est d'ailleurs ce que nous avons pu

observer dans les VG de rats IC puisque la TnT phosphorylée en Ser208 n'est pas détectée dans la fraction protéique enrichie en protéines O-GlcNAcylées en dépit de sa présence au sein de l'échantillon total.

La balance phosphorylation/O-GlcNAcylation de la TnT souligne l'importance des MPTs dans la régulation fonctionnelle des protéines mais aussi l'importance d'identifier les acteurs de ces MPTs. En effet, la modulation de l'activité des enzymes impliquées dans ces MPTs permettrait de moduler le niveau de phosphorylation et d'O-GlcNAcylation des protéines et ainsi de réguler leur fonction biologique voire même un mécanisme plus général comme la contractilité des cardiomyocytes.



Partie 2

Etude de la Desmine comme
biomarqueur potentiel du RVG
post-IDM et de l'IC

I. Objectifs de l'étude

Par analyses phosphoprotéomiques dans le modèle expérimental d'IC chez le rat à 2 mois post-IDM, nous avons mis en évidence une augmentation significative du niveau de phosphorylation de la Desmine dans les VG de rats IC (Dubois *et al.*, 2011). La Desmine, protéine des filaments intermédiaires majeure de la cellule cardiaque, pourrait, de la même manière que la TnT phosphorylée en Ser208, constituer un nouveau biomarqueur du RVG post-IDM et/ou de l'IC.

Dans un modèle expérimental d'IC chez la souris, induit par surexpression au niveau du cœur de la sous-unité catalytique constitutivement active de la calcineurine pendant 14 semaines, 7 protéines, dont la Desmine, ont été identifiées comme différemment exprimées dans les VG des animaux IC (Chugh *et al.*, 2013). La mise en évidence d'une augmentation du niveau de Desmine dans les plasmas de ces mêmes animaux (~45 kDa) mais aussi dans le plasma de patients souffrant d'IC sévère (~22 kDa) (classe III et IV selon les critères de la NYHA) suggère que la Desmine plasmatique pourrait être un biomarqueur circulant d'IC chez la souris et l'homme.

L'objectif de notre étude est de tester le potentiel de biomarqueur circulant d'IC de la Desmine mais également des produits de dégradation de la Desmine, pouvant être générés en réponse à ses MPTs telles que la phosphorylation (Agnetti *et al.*, 2014) et l'ubiquitinylation (Cohen *et al.*, 2012), à partir d'un modèle expérimental d'IC chez le rat par ligature de l'AGC mais aussi dans des plasmas de souris contrôles et de patients IC.

II. Résultats

III. Résultats complémentaires

Nous avons mis en évidence, par analyses phosphoprotéomiques en gel 2D, une augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine dans les VG de rats à 2 mois post-IDM. Par approche biochimique, nous avons validé ces résultats et montré de plus que l'augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine dans le modèle *in vivo* implique uniquement les résidus Ser (Bouvet *et al.*, soumis). L'identification par gel 2D de 2 spots polypeptidiques correspondant à la Desmine suggère l'implication de plusieurs sites de phosphorylation au niveau de la protéine. Grâce à la technologie PhosTAG qui permet de séparer les différentes formes phosphorylées d'une protéine (Kinoshita *et al.*, 2009), nous avons validé l'existence au sein des VG de rats IC à 2 mois post-IDM de différentes formes phosphorylées de la Desmine (Figure 39).

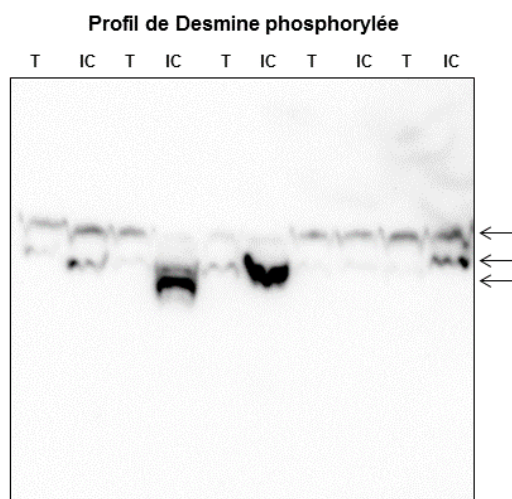


Figure 39. Mise en évidence de l'existence de différentes formes phosphorylées de la Desmine dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM grâce à la technologie Phos-TAG. T : témoin ; IC : Insuffisant cardiaque ; → : Desmine phosphorylée ou non.

De manière intéressante, nous avons mis en évidence, dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM, l'existence d'au moins 3 formes différentes de Desmine, correspondant à la Desmine non phosphorylée et phosphorylée sur 1 ou plusieurs résidus. Ces résultats ainsi que les résultats des analyses phosphoprotéomiques suggèrent que l'augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine dans le modèle d'IC chez le rat ferait intervenir plus d'une Ser.

IV. Discussion

Dans le modèle expérimental d'IC chez le rat, nous avons préalablement mis en évidence une augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM (Dubois *et al.*, 2011). Dans cette nouvelle étude, nous avons pu montrer que cette augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine dans les VG de rats IC implique uniquement les résidus Ser bien que la Desmine puisse être également phosphorylée sur les résidus Thr et Tyr. Cette modulation du niveau de phosphorylation de la Desmine semble par ailleurs faire intervenir plus d'une Ser.

La présence de la majorité de la Desmine dans la fraction protéique insoluble aussi bien dans les VG de rats témoins que dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM suggère que la Desmine phosphorylée, une fois polymérisée, s'accumulerait dans le cytoplasme des cellules sous forme d'agrégats insolubles comme cela a été décrit pour la Desmine mutée dans le cadre des desminopathies (Paulin *et al.*, 2004). En s'appuyant sur les données de la littérature, nous avons émis l'hypothèse que le clivage de la Desmine phosphorylée par les enzymes protéolytiques, en particulier les calpaïnes (Mellgren *et al.*, 2007 ; Baron *et al.*, 2004) permettrait de lutter contre l'accumulation d'agrégats cytosoliques de Desmine et serait à l'origine de la génération de ses produits de dégradation et de leur libération dans le sang. De manière intéressante, nous n'avons pas pu détecter de Desmine, ni de fragments de Desmine, aussi bien dans les plasmas de rats, de souris et d'homme contrairement à Chugh *et al.* (2013) et ce en dépit de l'utilisation de différentes techniques d'analyses plus ou moins sensibles (spectrométrie de masse et western blot). Bien que nos résultats suggèrent que la Desmine n'est pas un biomarqueur circulant de l'IC post-IDM, elle peut en être un marqueur tissulaire. Ainsi, l'identification des mécanismes moléculaires impliqués dans l'augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine au cours du RVG post-IDM nous semble importante. En effet, la Desmine, en connectant l'appareil contractile à la membrane cellulaire, au noyau ainsi qu'aux différents organites cellulaires, représente un facteur essentiel pour le maintien de la charpente du cytosquelette de la cellule. L'augmentation du niveau de phosphorylation en Ser de la Desmine au cours de l'IC pourrait entraîner la déstabilisation du réseau de Desmine ainsi que la formation d'agrégats de Desmine toxiques pour le cardiomyocyte (Agnetti *et al.* 2014). L'identification des enzymes mais aussi des Ser impliquées dans cette augmentation du niveau phosphorylation de la Desmine permettrait de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement RVG post-IDM et de l'IC. Ce travail permettrait également de développer des outils, tels que des anticorps dirigés contre les formes phosphorylées de la Desmine au cours de l'IC, plus sensibles et plus spécifiques qui pourraient potentiellement permettre de détecter la Desmine phosphorylée ou ses produits de dégradation au niveau du plasma.



Partie 3

Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine au cours de l'IC

I. Objectifs de l'étude

Au cours de ma thèse, nous nous sommes intéressés aux MPTs de la Desmine et plus particulièrement à l'augmentation de sa forme phosphorylée dans le modèle d'IC chez le rat à 2 mois post-IDM. Par diverses approches, nous avons montré que ni la Desmine, ni les fragments de Desmine, ne sont retrouvés dans les plasmas de rats de souris et d'homme et que par conséquent aucun d'entre eux ne peut être considéré comme biomarqueur circulant du RVG post-IDM et/ou de l'IC (Bouvet *et al.*, soumis) contrairement à ce qu'ont montré Chugh *et al.* (2013).

En revanche la Desmine est un potentiel marqueur tissulaire du RVG post-IDM et de l'IC et donc l'étude des MPTs de la Desmine au cours du RVG post-IDM et de l'IC présente néanmoins un intérêt majeur. En effet, une étude clinique a permis de mettre en évidence que l'évaluation de l'expression de la Desmine dans les VG de patients permettrait une meilleure stratification des patients en terme de survie (Pawlak *et al.*, 2012). La Desmine est la protéine des filaments intermédiaires majoritaire au sein des cellules musculaires et en ce sens, joue un rôle central dans le maintien de la charpente du cytosquelette des cardiomyocytes. Puisqu'elle relie physiquement l'appareil contractile par les disques Z aux différents organites cellulaires, la Desmine est décrite dans la littérature comme l'intégrateur des fonctions contractiles et métaboliques des cellules cardiaques par le cytosquelette (Kawajiri *et al.*, 2003). Il a été mis en évidence qu'une phosphorylation de la Desmine entraîne la dépolymérisation de ses filaments (Kawajiri *et al.*, 2003). L'augmentation du niveau de phosphorylation en Ser de la Desmine au cours de l'IC pourrait entraîner la déstabilisation du réseau de Desmine et favoriser la formation d'agrégats de Desmine toxiques pour le cardiomyocyte (Kawajiri *et al.*, 2003 ; Agnetti *et al.*, 2014). Cette altération de structure au niveau de la Desmine pourrait être déterminante pour la fonction locale du cardiomyocyte (Monreal, 2008) et pourrait participer au développement et/ou à l'aggravation du remodelage et de la dysfonction VG au cours de l'IC.

L'objectif de ce travail est d'identifier d'une part les Ser impliquées dans l'augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM et d'autre part d'identifier les kinases responsables de ces modulations de phosphorylation au niveau de la Desmine. Cette étude pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques sous-jacents au RVG post-IDM et à l'IC.

II. Résultats

A. Identification des Ser impliquées dans les modulations de phosphorylation de la Desmine

1. Compartimentation cellulaire de la Desmine

Pour comprendre l'impact d'une augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine dans la physiopathologie du RVG post-IDM et dans le développement de l'IC, l'identification de la ou des Ser impliquées s'avérait nécessaire. Pour ce faire nous avons dans un premier temps étudié le comportement de la Desmine dans les VG de rats du modèle expérimental d'IC à 2 mois post-IDM (Figure 40).

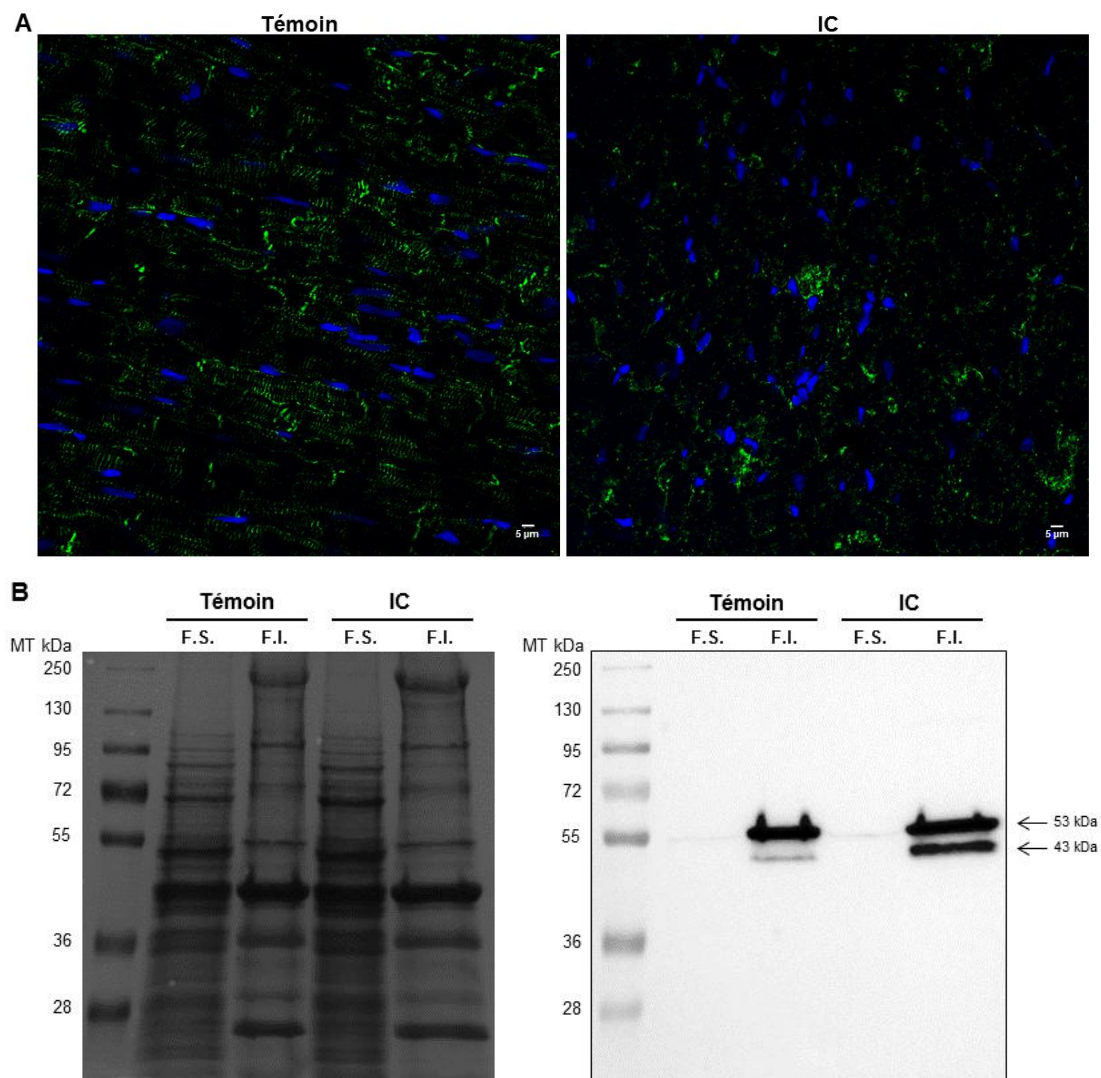


Figure 40. Immunolocalisation de la Desmine (vert) dans les VG de rats témoin (panel de gauche) et IC (panel de droite) du modèle expérimental à 2 mois post-IDM. Les noyaux des cellules sont représentés en bleu (A). Répartition de la Desmine au sein des fractions solubles et insolubles des VG de rats témoins et IC (panel de droite) par western blot. Le rouge ponceau témoigne qu'une même quantité de protéines a été déposée dans chaque puits (panel de gauche) (B). MT : marqueur de taille, kDa : kilodalton ; S.F. : fraction soluble fraction ; IC : insuffisant cardiaque ; I.F. : fraction insoluble.

Par immunofluorescence, nous avons mis en évidence une accumulation cytosolique de Desmine sous forme d'agrégats dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM (Figure 40A). Par western blot, nous avons montré que la Desmine est majoritairement retrouvée dans la fraction protéique insoluble aussi bien dans les VG de rats témoins que dans les VG de rats IC du modèle *in vivo* (Figure 40B). Dans ces mêmes VG, nous avons également mis en évidence la présence d'une forme clivée de la Desmine, majoritairement présente dans la fraction protéique insoluble, dont le poids moléculaire est proche de 43 kDa. Cette forme de Desmine pourrait résulter d'un clivage par les calpaïnes en réponse à l'augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine (Agnetti *et al.*, 2014 ; Blunt *et al.*, 2006 ; Geisler *et al.*, 1988).

Par la suite, nous avons mesuré le niveau d'expression de la Desmine dans les fractions protéiques solubles et insolubles de VG du modèle expérimental d'IC à 2 mois post-IDM (Figure 41).

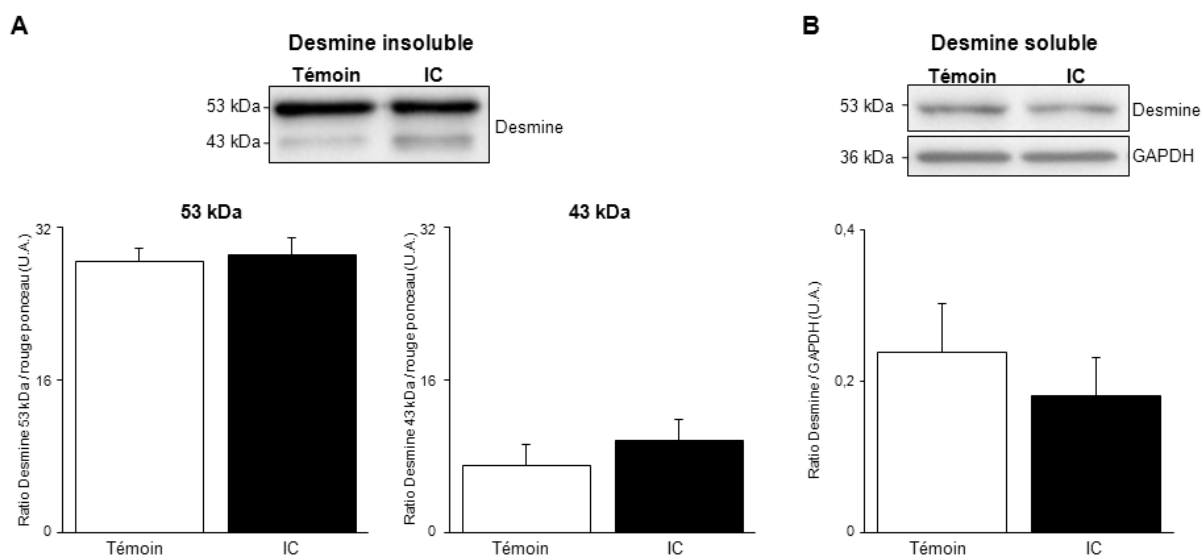


Figure 41. Quantification du niveau d'expression de la Desmine insoluble à 53 kDa (panel de gauche) et à 43 kDa (panel de droite) (A) ainsi que du niveau d'expression de la Desmine soluble (B) dans les VG de rats témoins (n=11) et IC (n=11) à 2 mois post-IDM. IC : insuffisant cardiaque ; U.A. : unités arbitraires \pm SEM. Mann Whitney.

Nos résultats mettent en évidence que le niveau de Desmine insoluble est environ 13 fois supérieur au niveau de Desmine soluble dans les VG de rats du modèle *in vivo*. De manière intéressante, nous avons montré que le niveau d'expression de la Desmine soluble à 53 et 43 kDa est inchangé entre les 2 groupes d'animaux (Figure 41A) tout comme le niveau d'expression de Desmine soluble (Figure 41B).

Au vu de ces résultats et en s'appuyant sur les données de la littérature, il semble qu'après phosphorylation, la Desmine transite de la fraction insoluble vers la fraction soluble mais ne s'y accumule pas. En effet, la mise en évidence de la présence d'agrégats de Desmine dans les VG de rats IC à 2 mois (Figure 41A) suggère que suite à sa phosphorylation la Desmine s'agrège en structures insolubles sous forme d'agrégats (Agnetti *et al.*, 2014). L'identification des Ser impliquées

dans l'augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine dans le modèle expérimental d'IC à 2 mois post-IDM a donc été réalisée à partir de la fraction protéique insoluble des VG de rats.

2. Identification des Ser phosphorylées de la Desmine dans le modèle *in vivo*

L'identification des différentes Ser phosphorylées de la Desmine dans le modèle *in vivo* a été réalisée en collaboration avec la Plateforme de Protéomique et Peptides modifiés (P3M) de Lille. L'identification a été réalisée par spectrométrie de masse à partir de lysats « bruts » de protéines insolubles des VG de rats témoins et IC à 2 mois post-IDM mais aussi à partir de ces mêmes lysats protéiques enrichis en Desmine par immunoprécipitation. La démarche expérimentale est résumée dans la figure 42.

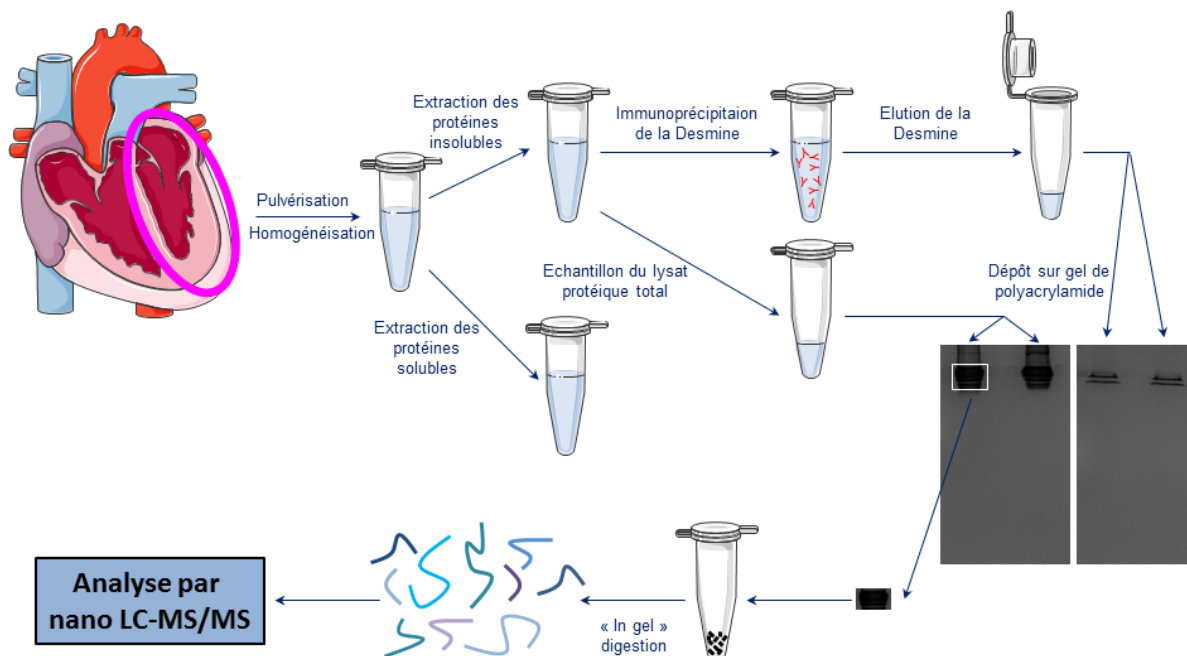


Figure 42. Représentation schématique de la démarche expérimentale ayant permis l'identification des Ser phosphorylées de la Desmine dans les VG de rats du modèle expérimental d'IC à 2 mois post-IDM.

Les lysats protéiques « bruts » ou enrichis en Desmine ont dans un premier temps été concentrés dans un gel de polyacrylamide puis colorés au bleu colloïdal afin de visualiser les protéines. La zone colorée, contenant les protéines, a été excisée du gel et découpée en morceaux de 1 mm^3 avant de digérer les protéines à l'aide de la trypsine. Les échantillons ont ensuite été analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (nano LC-MS/MS Orbitrap Q-Exacte).

Les analyses réalisées à partir des lysats « bruts » de protéines insolubles ont permis de montrer que dans le modèle *in vivo*, les Ser25, 28, 31, 32, 81 et 431 de la Desmine sont phosphorylées dans

les VG de rats témoins et IC à 2 mois post-IDM. L'enrichissement en Desmine a permis, quant à elle, de mettre en évidence que les Ser60 et 329 de la Desmine sont également phosphorylées dans ces VG. De manière intéressante, 5 des 7 Ser identifiées sont localisées au niveau de la tête de la Desmine. Toutes ces Ser, à l'exception de la Ser25, sont conservées chez la souris et chez l'homme (Figure 43).

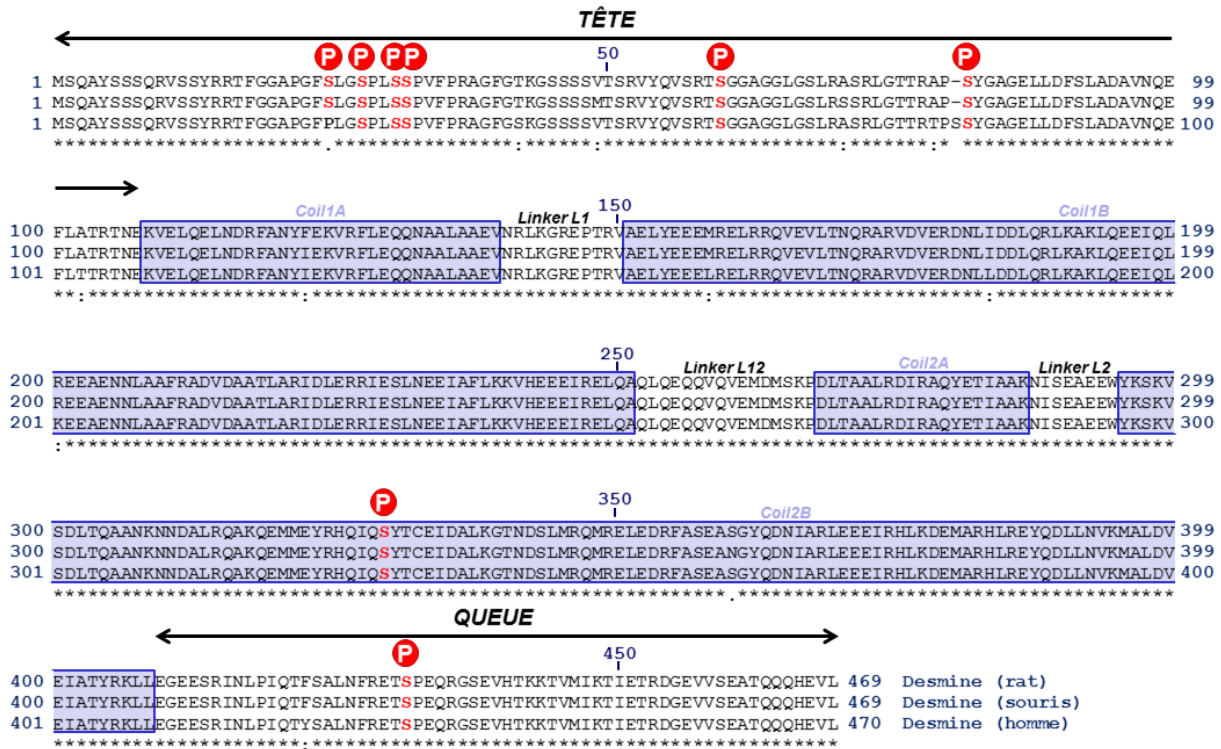


Figure 43. Localisation sur la séquence de la Desmine de rat, de souris et d'homme des différentes Ser identifiées comme étant phosphorylées dans les VG de rats du modèle expérimental d'IC à 2 mois post-IDM. Les Ser portant un groupement phosphate sont surmontées d'un cercle rouge portant la lettre P.

3. Quantification

Par la suite, nous avons cherché à quantifier le niveau de phosphorylation de chaque Ser de la Desmine précédemment identifiée afin de déterminer quelles sont les Ser impliquées dans l'augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine dans le modèle *in vivo*. L'existence d'un anticorps commercial permettant la détection de la Ser60 phosphorylée de la Desmine (Desmine p-S60) nous a permis de quantifier, dans les fractions protéiques solubles et insolubles des VG de rats témoins et IC à 2 mois pos-IDM, le niveau de phosphorylation de la Desmine sur cette Ser (Figure 44).

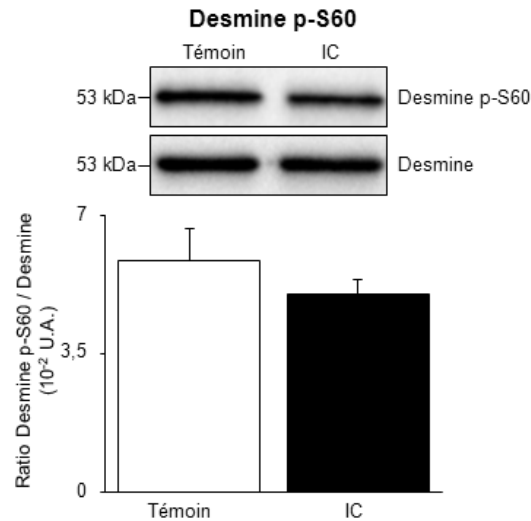


Figure 44. Quantification du niveau de phosphorylation en Ser60 de la Desmine dans la fraction protéique insoluble des VG de rats témoins (n=11) et IC (n=11) à 2 mois post-IDM. IC : insuffisant cardiaque ; U.A. : unités arbitraires ± SEM. Mann Whitney.

De manière intéressante, nous n’avons pas pu détecter la Desmine phosphorylée en Ser60 dans la fraction protéique soluble des VG de rats. En revanche, nous avons pu montrer que dans la fraction protéique insoluble, le niveau de phosphorylation en Ser60 de la Desmine n’est pas modulé entre les 2 groupes d’animaux à 2 mois post-IDM. Ces résultats suggèrent que la Ser60 n’est pas impliquée dans les modulations du niveau de phosphorylation de la Desmine dans le modèle d’IC chez le rat à 2 mois post-IDM et par conséquent dans la modulation de l’architecture du réseau de Desmine.

L’absence d’anticorps commerciaux dirigés contre les Ser25, 28, 31, 32, 81, 329 et 431 phosphorylées de la Desmine nous a incité à développer, en collaboration avec la plateforme de protéomique P3M de Lille, une méthode de quantification du niveau de phosphorylation de ces Ser de la Desmine par spectrométrie de masse. Cette quantification, actuellement en cours, nécessite de prendre en compte l’expression de la Desmine qui varie dans les VG de rats au sein d’un même groupe (Figure 45).

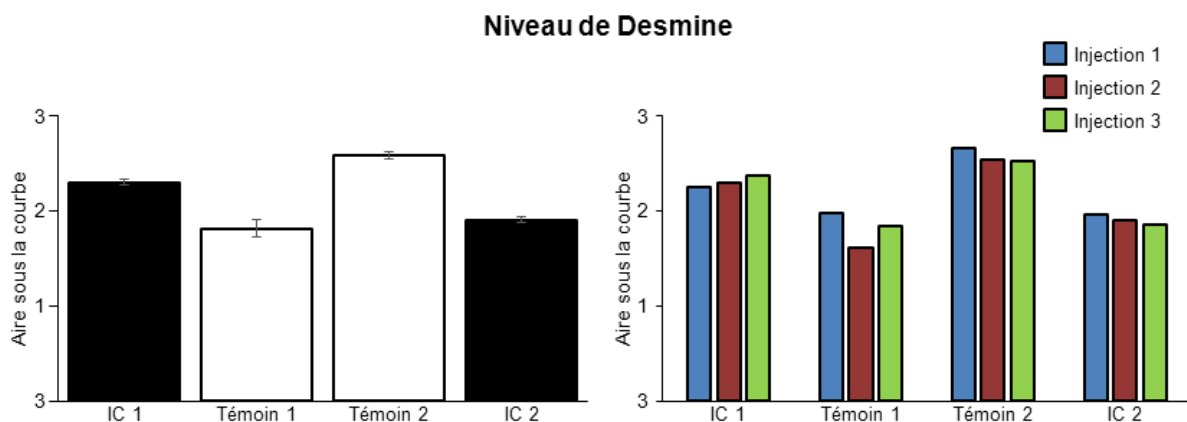


Figure 45. Quantification par spectrométrie de masse du niveau d’expression de la Desmine dans la fraction protéique insoluble des VG de rats témoins (n=2) et IC (n=2) à 2 mois post-IDM (panel de gauche). Le niveau de Desmine a été mesuré à 3 reprises pour chaque échantillon (panel de droite). IC : insuffisant cardiaque.

Parallèlement à ces analyses, nous étudions actuellement la fonctionnalité des mutants de Desmine par approche *in vitro* dans les cellules H9c2. Pour ce faire, nous avons muté individuellement par synthèse génique, chaque Ser de la Desmine identifiée comme étant phosphorylée dans le modèle *in vivo*. Chaque Ser a donc été remplacée par une alanine [Ala ou A] qui abolit la phosphorylation. Les constructions ont été insérées dans un vecteur d'expression pcDNA3.1 avec un épitope *c-myc* et un tag polyhistidine, permettant d'une part de détecter la Desmine mutante avec un anticorps anti-myc et d'autre part de purifier les différents mutants de Desmine grâce à une résine chélatant les métaux.

Nous avons d'ores et déjà mis au point les conditions de transfection des cellules H9c2 nous permettant d'exprimer les différents mutants de Desmine (Figure 46).

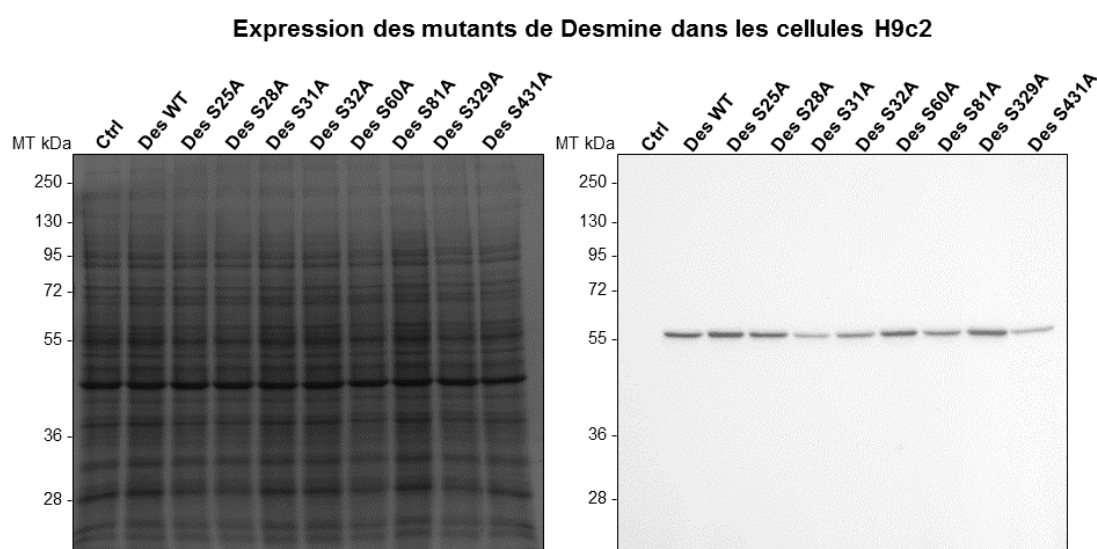


Figure 46. Détection des mutants de Desmine par western blot après 48h de transfection des cellules H9c2. A : alanine ; kDa : kilodalton ; MT : marqueur de taille ; S : sérine.

Les premiers résultats nous montrent que les différents mutants de phosphorylation de la Desmine, détectés à l'aide d'un Ac anti-Desmine, sont fortement exprimés dans les cellules H9c2 après 48h de transfection (Figure 46). Nous avons obtenu les mêmes résultats en utilisant un Ac anti-myc (résultats non présentés).

B. Sélection *in silico* des kinases potentiellement impliquées

Dans la suite du projet, nous avons cherché à identifier la ou les kinases responsables des modulations de phosphorylation au niveau de la Desmine dans le modèle d'IC chez le rat. Une analyse bioinformatique réalisée avec le logiciel GeneGo, qui est un logiciel d'analyse des voies de signalisation, a permis de sélectionner *in silico*, à l'aide des données des analyses phosphoprotéomiques, des données de la littérature, des sites consensus de phosphorylation des

kinases ou encore de leur localisation tissulaire, les kinases potentiellement impliquées dans la phosphorylation de la Desmine (Figure 47).

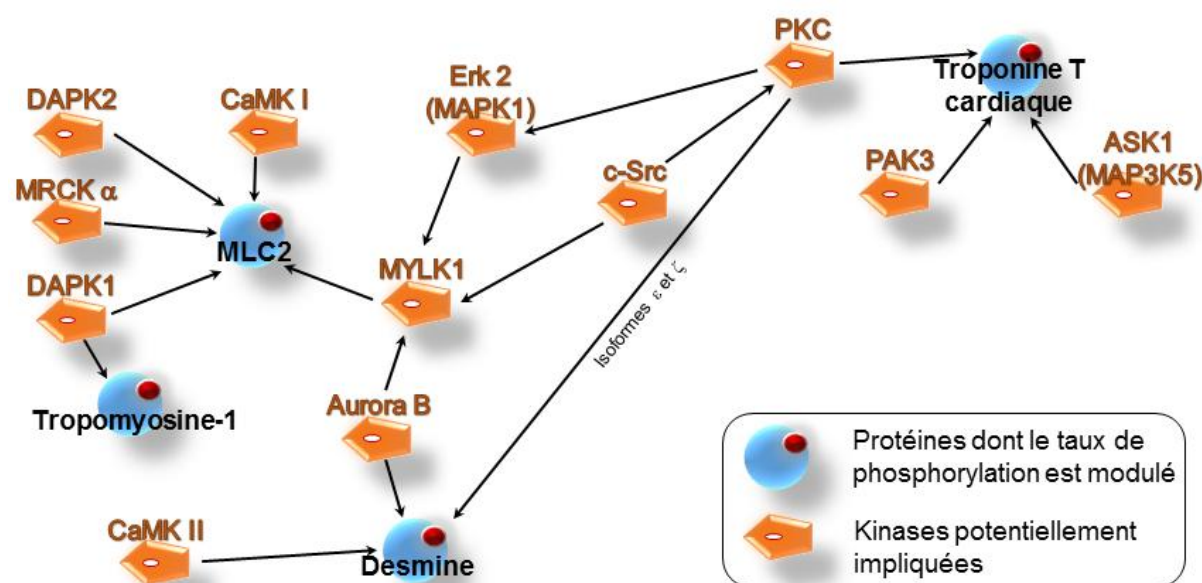


Figure 47. Sélection *in silico* des kinases potentiellement impliquées dans la phosphorylation de la Desmine par analyse bioinformatique avec le logiciel GeneGo.

Trois Ser/Thr kinases sont ressorties de l'analyse : la protéine kinase II Ca^{2+} /calmoduline dépendante (CaMK II), Aurora B et la PKC (isoformes ϵ et ζ).

La mise en évidence d'une part, d'une diminution de l'activité PKC_{ϵ} dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM (Dubois-Deruy *et al.*, 2015) et d'autre part que la modulation de PKC_{ϵ} *in vitro* et *ex vivo* n'a pas d'impact sur le niveau de phosphorylation de la Desmine (résultats non présentés) nous a amené à exclure cette kinase de l'analyse et à nous intéresser aux autres kinases sélectionnées par analyse bioinformatique (CaMK II, Aurora B et PKC_{ζ}). Les travaux d'Agnetti *et al.* (2014), parus au cours de ma thèse, suggèrent l'implication d'une autre kinase, la Glycogène Synthase Kinase-3 (GSK3), dans la phosphorylation de la Desmine au cours de l'IC. Les auteurs ont mis en évidence, dans un modèle expérimental d'IC chez le chien par désynchronisation cardiaque ainsi que dans des biopsies de VG de patients IC, une augmentation du niveau de phosphorylation en Ser28 et 32 de la Desmine qui semble dépendante de la GSK3.

Dans le modèle de rat IC à 2 mois post-IDM, nous avons donc quantifié l'expression et évalué l'activité enzymatique des 3 kinases sélectionnées par analyse bioinformatique comme étant potentiellement impliquées dans la phosphorylation en Ser de la Desmine mais aussi de la kinase GSK3.

1. Étude de la régulation de CaMK II, d'Aurora B, de PKC ζ et de GSK3 dans le modèle d'IC chez le rat

a) CaMK II

La CaMK II est une Ser/Thr kinase qui existe sous la forme de 4 isoformes codées par 4 gènes différents : α (54 kDa), β (60 kDa), δ (60 kDa) et γ (59 kDa). La fixation du complexe Ca²⁺/calmoduline sur le domaine régulateur de la CaMK II induit un changement conformationnel de l'enzyme qui permet la libération de son domaine catalytique et ainsi son autophosphorylation en Thr²⁸⁶ pour l'isoforme α et en Thr²⁸⁷ pour les autres isoformes de CaMK II (Couchonnal *et al.*, 2008)

Dans les VG de rats à 2 mois post-IDM, nous avons mesuré le niveau d'expression et évalué l'activité kinase des isoformes δ et γ de la CaMK II qui sont les isoformes cardiaques majoritaires de l'enzyme (Couchonnal *et al.*, 2008) (Figure 48).

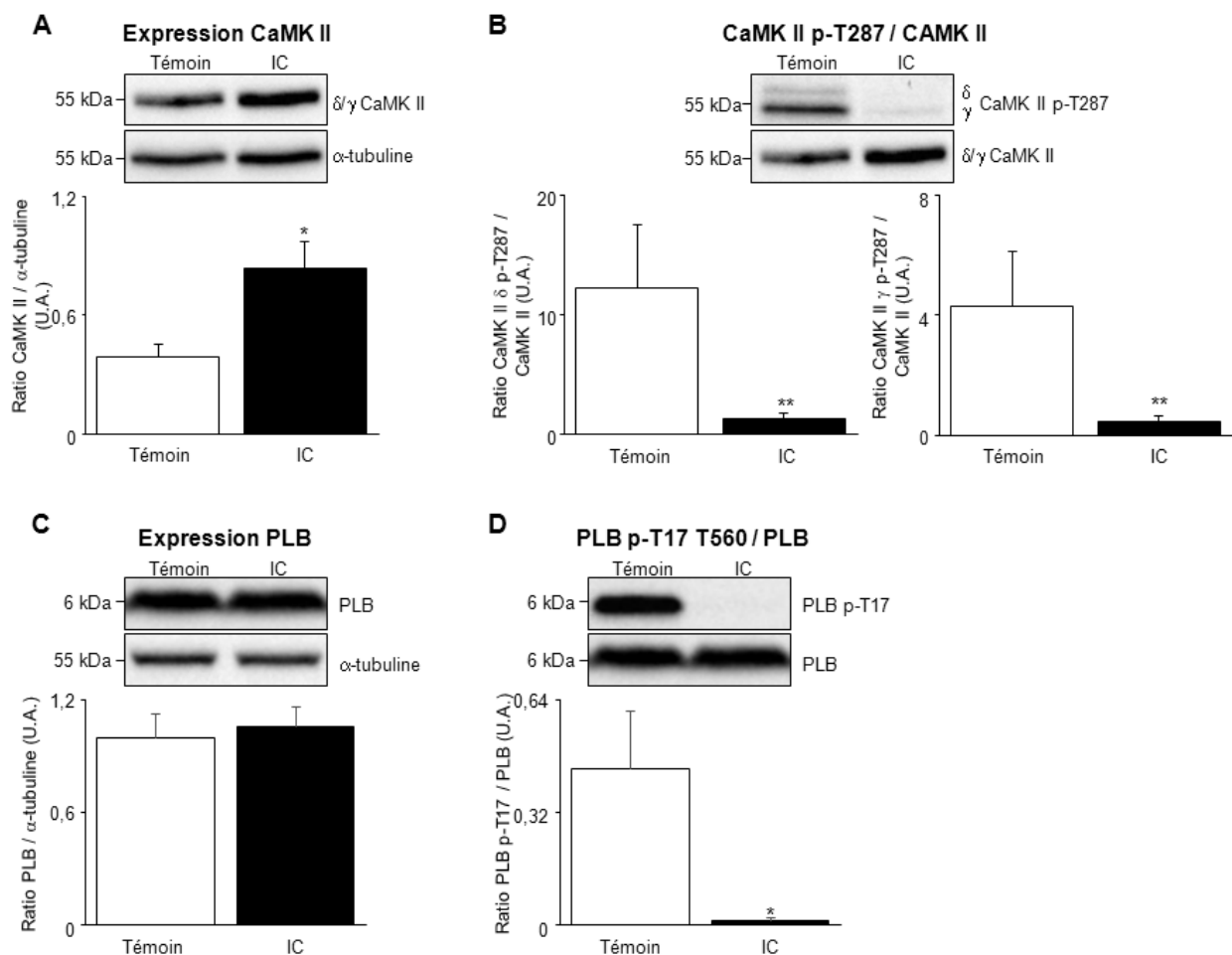


Figure 48. Quantification de l'expression des isoformes δ et γ de CaMK II (A), de leur activité enzymatique par mesure des ratios CaMK δ II p-T287 / CaMK II et CaMK γ II p-T287 / CaMK II (B) ainsi que de l'expression du PLB (C) et de son niveau de phosphorylation en Thr17 (D) dans les VG de rats témoins (n=11) et IC (n=11) à 2 mois post-IDM. IC : insuffisant cardiaque ; U.A. : unités arbitraires \pm SEM. Mann Whitney *p<0,05; **p<0,01.

Nous avons pu montrer que l'expression des isoformes δ et γ de la CaMK II augmente d'environ 2 fois dans les VG de rats IC par rapport aux VG contrôles (Figure 48A). En revanche, le nombre d'unités actives de CaMK II δ et γ , reflété par leur niveau de phosphorylation en Thr287 (CaMK II p-T287), diminue de manière significative dans ces mêmes VG (Figure 48B) suggérant que l'activité CaMK II diminue dans les VG de rats à 2 mois post-IDM. Ces résultats ont été renforcés par la mise en évidence, dans le modèle *in vivo*, d'une diminution significative du niveau de phosphorylation en Thr17 du PLB qui est un substrat connu de la CaMK II (Ji *et al.*, 2003) (Figure 48D) mais sans modulation de son niveau d'expression (Figure 48C).

L'ensemble de ces données suggère que la CaMK II (isoformes δ et γ) n'est pas impliquée dans l'augmentation de phosphorylation en Ser de la Desmine dans le modèle d'IC chez le rat à 2 mois.

b) Aurora B

La kinase Aurora B est une Ser/Thr kinase nucléaire impliquée dans le cycle cellulaire qui est particulièrement active pendant la phase de mitose (Kollareddy *et al.*, 2008). Cette kinase est impliquée dans l'attachement du kinétochore aux microtubules, dans la régulation de la condensation et de la ségrégation des chromosomes ainsi que dans la cytokinèse (Gavriilidis *et al.*, 2015). Dans la littérature, il a été mis en évidence que l'activité Aurora B est reflétée par son niveau d'autophosphorylation en Thr232. Cette phosphorylation est de plus indispensable à son activité enzymatique (Izawa *et al.*, 2006) (Figure 49).

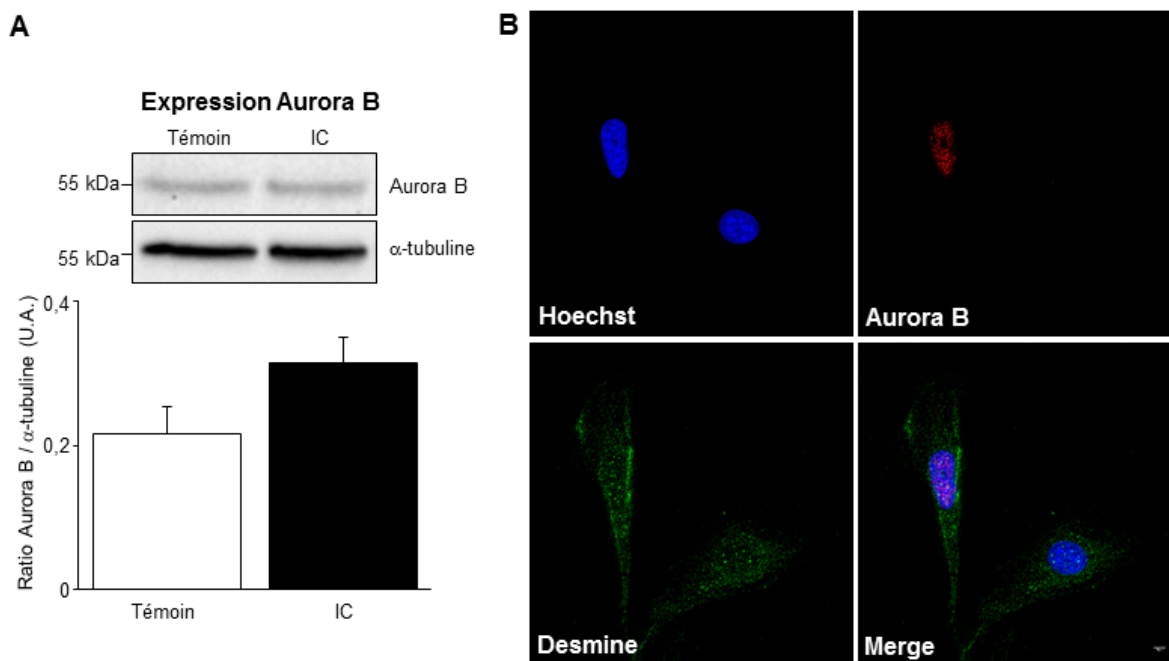


Figure 49. Quantification de l'expression d'Aurora B dans les VG de rats témoins (n=11) et IC (n=11) à 2 mois post-IDM. U.A. : unités arbitraires \pm SEM (A). Immunolocalisation d'Aurora B et de la Desmine dans les cellules H9c2 (B).

L'étude de la régulation de la kinase Aurora B dans les VG de rats à 2 mois post-IDM, a permis de mettre en évidence que l'expression d'Aurora B tend à augmenter dans les VG de rats IC par rapport aux témoins ($p=0,065$) (Figure 49A). En revanche, pour des raisons techniques, l'activité d'Aurora B n'a pas pu être quantifiée dans le modèle *in vivo*. Néanmoins des expériences d'immunolocalisation d'Aurora B et de la Desmine dans les cellules H9c2 ont permis de montrer que la kinase Aurora B est exprimée uniquement dans le noyau de certaines cellules et ce en fonction du cycle cellulaire. Plus précisément, Aurora B est exprimée durant la phase S et la transition G2/M (Kollareddy *et al.*, 2008) alors que la Desmine, exprimée de manière constante tout au long du cycle cellulaire, est localisée au niveau du cytoplasme des cellules (Figure 49B).

En dépit d'une tendance à l'augmentation du niveau d'expression d'Aurora B dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM, cette kinase, dont l'expression est restreinte aux noyaux des cellules, ne peut entrer en interaction avec la Desmine qu'au moment de la division cellulaire. Cependant, l'activité mitotique des cellules cardiaques étant quasiment inexistante (Bergmann *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2015 ; Linton *et al.*, 2015), une interaction entre la kinase Aurora B et la Desmine est peu envisageable.

Nos données *in vivo* et *in vitro* suggèrent donc que la kinase Aurora B n'est pas impliquée dans la modulation du niveau de phosphorylation en Ser de la Desmine dans le modèle d'IC chez le rat à 2 mois post-IDM.

c) PKC ζ

La kinase PKC ζ est une Ser/Thr kinase appartenant à la famille des PKCs composée de 10 membres. Les PKCs régulent un grand nombre de processus cellulaires tels que la migration, la polarité, la différenciation ou encore la mort cellulaire (Breitkreutz *et al.*, 2007). Par conséquent elles jouent un rôle majeur dans de nombreuses pathologies telles que le diabète, le cancer, l'IC d'origine ischémique ou non, certaines maladies autoimmunes ou encore la maladie de Parkinson et d'Alzheimer (Mochly-Rosen, 2012).

L'étude de la régulation de la kinase PKC ζ dans le modèle d'IC chez le rat à 2 mois a permis de montrer que l'expression de la kinase PKC ζ n'est pas modulée entre les 2 groupes d'animaux (Figure 50A). En revanche l'activité PKC ζ , évaluée par mesure de son niveau de phosphorylation en Thr560 (PKC ζ p-T560) qui est un site d'autophosphorylation de la kinase (Wu *et al.*, 2007), augmente de manière significative dans les VG de rats IC par rapport aux témoins (Figure 50B). La mise en évidence d'une augmentation de 1,5 fois de l'expression de RACK1 (pour *Receptor for Activated C Kinase 1*) dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM (Figure 50C) conforte ces résultats. En effet, RACK1 est connu pour stabiliser les PKCs activées et favoriser la phosphorylation de leurs substrats (David *et al.*, 2012).

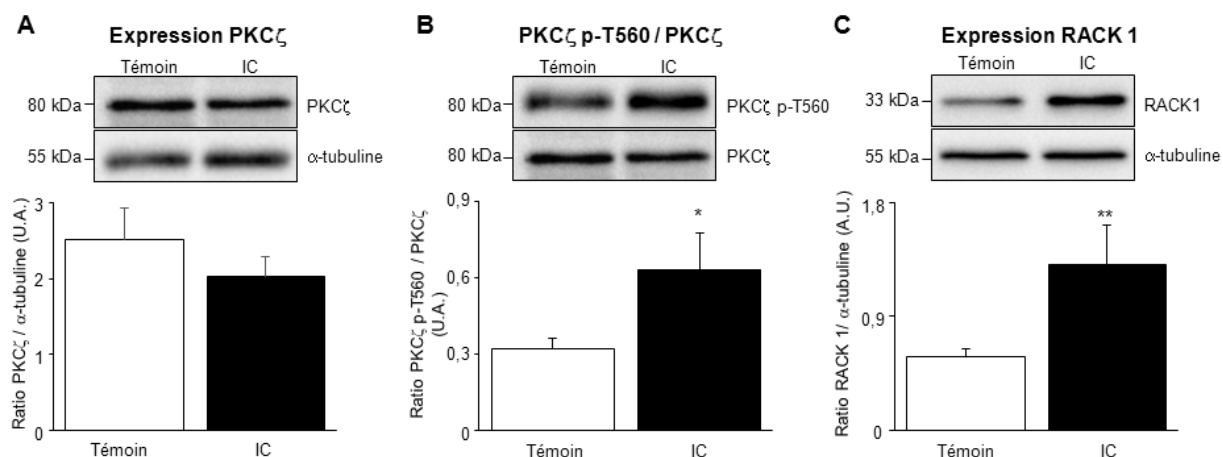
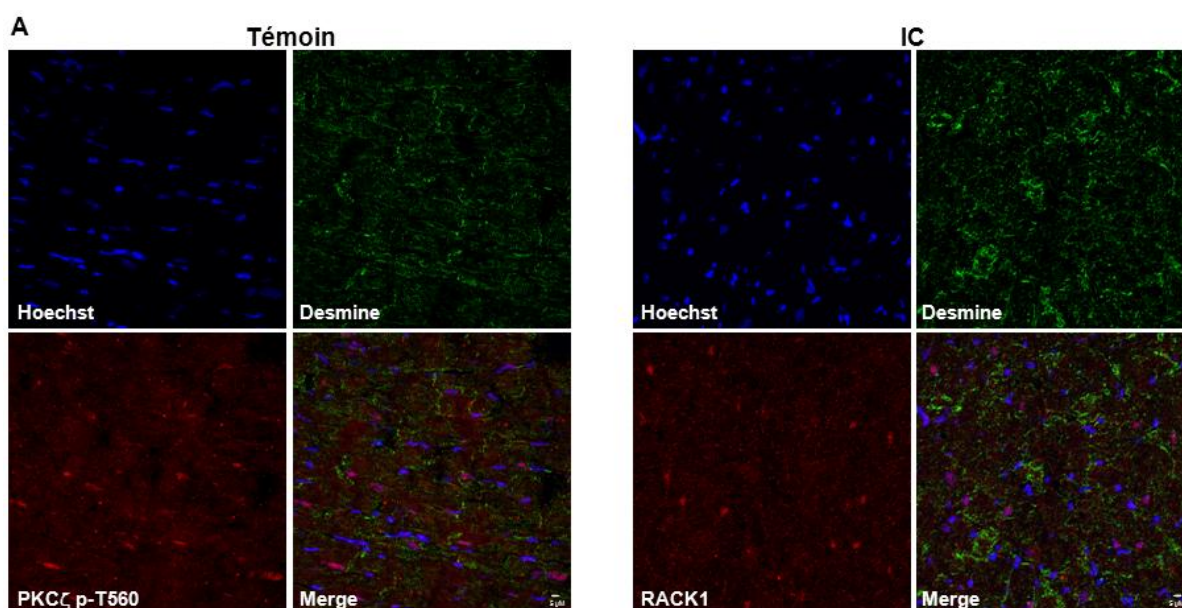


Figure 50. Quantification de l'expression de PKC ζ (A), de son activité enzymatique par mesure du ratio PKC ζ p-T560 / PKC ζ , de l'expression de son transporteur RACK1 (C) dans les VG de rats témoins (n=11) et IC (n=11) à 2 mois post-IDM. IC : insuffisant cardiaque ; U.A. : unités arbitraires \pm SEM. Mann Whitney * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

L'augmentation à la fois du niveau de phosphorylation en Thr560 de la PKC ζ et du niveau d'expression de RACK1 dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM suggère que l'activité de PKC ζ est augmentée dans ces VG. Par conséquent, la PKC ζ pourrait être la kinase responsable des modulations du niveau de phosphorylation en Ser de la Desmine mise en évidence dans le modèle d'IC chez le rat à 2 mois post-IDM.

Par immunomarquage, nous avons donc cherché à mettre en évidence une colocalisation entre la Desmine et la kinase PKC ζ et/ou son transporteur RACK1 dans les VG de rats IC du modèle expérimental à 2 mois post-IDM (Figure 51).



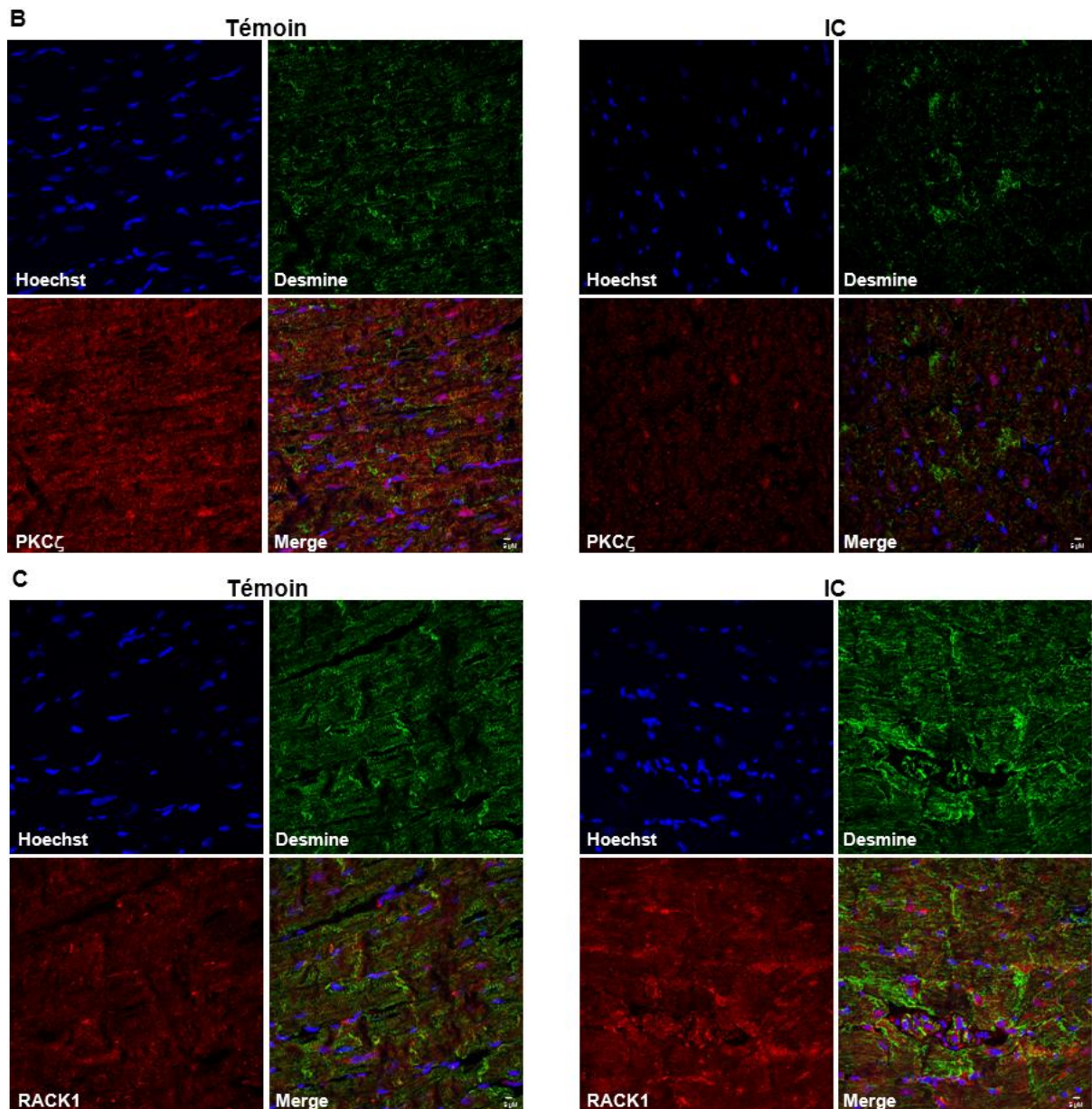


Figure 51. Immunolocalisation de la PKC ζ activée (PKC ζ p-T560 ; rouge) et de la Desmine (vert) (A), de PKC ζ totale (rouge) et de la Desmine (vert) (B) ainsi que de RACK1 (rouge) et de la Desmine (vert) dans les VG de rats témoins (panels de gauche) et IC (panels de droite) à 2 mois post-IDM.

De manière surprenante, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence par immunofluorescence classique de colocalisation entre la Desmine et la PKC ζ ni entre la Desmine et la protéine RACK1 dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM. La présence d'un marquage prééminent pour la Desmine présente au niveau des sarcomères, qui est la Desmine polymérisée et donc non phosphorylée, pourrait être à l'origine de cette absence de visualisation d'une colocalisation. Nous avons tenté, par la technique du PLA, de mettre en évidence une colocalisation entre la Desmine et PKC ζ et/ou RACK1 dans les VG de rats. Néanmoins, à ce jour nous n'avons pas réussi à mettre au point cette technique sur des coupes de tissu.

d) GSK3

La GSK3 est une Ser/Thr kinase ubiquitaire qui existe sous la forme de 2 isoformes (α et β) codées par 2 gènes différents. Ces 2 isoformes présentent 85% d'homologie au niveau de leurs séquences protéiques globales et plus de 98% d'homologie au niveau de leurs domaines kinases rendant difficile la synthèse d'inhibiteurs spécifiques à chaque isoforme (Lal *et al.*, 2015). La GSK3 est impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires tels que le métabolisme, la transcription des gènes ou encore le développement. De ce fait, la GSK3 intervient dans de nombreuses pathologies (cancer, troubles bipolaires, diabète, maladies inflammatoires ou IC). Depuis plusieurs années, l'implication de la GSK3 β dans la physiopathologie du cœur a été clairement mise en évidence. En effet, elle a été montrée impliquée dans les processus anti-hypertrophiques au niveau du cœur (Hardt *et al.*, 2002). En revanche, le rôle de l'isoforme α est nettement moins bien connu et les données actuelles suggèrent un rôle redondant de la GSK3 α par rapport à la GSK3 β (Lal *et al.*, 2015).

Dans les VG de rats du modèle d'IC, nous avons donc mesuré l'expression et l'activité de l'isoforme β de la GSK3 par mesure de son taux de phosphorylation en Ser9. La GSK3 β est l'une des seules kinases connues pour être inactivée par phosphorylation. En effet, lorsque la GSK3 β est phosphorylée en Ser9, son activité kinase est inhibée (Lal *et al.*, 2015) (Figure 52).

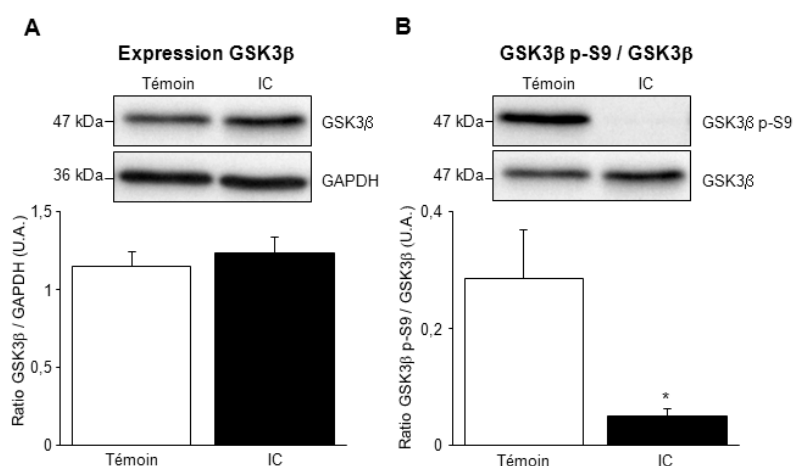


Figure 52. Quantification de l'expression de GSK3 β (A) et de son activité enzymatique (B) par mesure du ratio GSK3 β p-Ser9 / GSK3 β dans les VG de rats témoins (n=11) et IC (n=11) à 2 mois post-IDM. IC : insuffisant cardiaque ; U.A. : unités arbitraires \pm SEM. Mann Whitney *p<0,05.

Nous n'avons pas observé de modulation de l'expression de la GSK3 β dans les VG de rats à 2 mois post-IDM (Figure 52A). En revanche, nous avons mis en évidence une diminution de 5,6 fois du niveau de phosphorylation de la GSK3 β en Ser9 (GSK3 β p-S9) dans les VG de rats IC par rapport aux témoins (Figure 52B). Cette diminution du niveau de phosphorylation en Ser9 de GSK3 β dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM suggère que l'activité de cette kinase est augmentée dans ces VG. Par conséquent, tout comme PKC ζ , la GSK3 β pourrait être impliquée dans la phosphorylation de la Desmine au cours de l'IC. Il nous reste à déterminer si l'activité de ces 2 kinases dépend l'une de l'autre.

2. Validation de l'implication de PKC ζ et/ou de GSK3 β dans la phosphorylation de la Desmine

a) Inhibition pharmacologique de PKC ζ

Pour démontrer l'implication de la PKC ζ dans la phosphorylation en Ser de la Desmine nous avons inhibé l'activité de la kinase PKC ζ dans les NCM à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique spécifique, le myr PS (Figure 53).

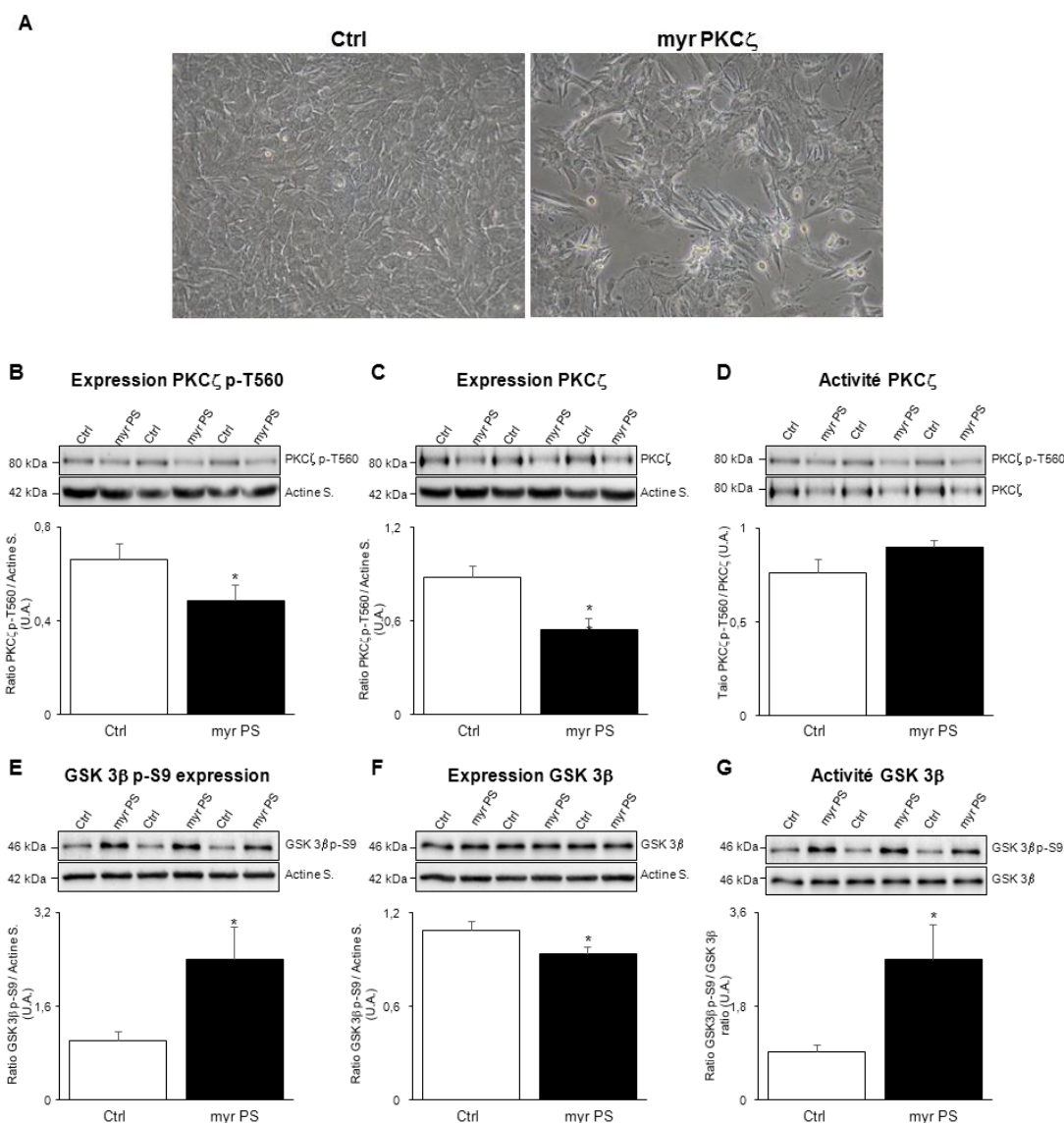


Figure 53. Analyse morphologique des NCM traitées pendant 1h avec 10 μ M de myr PS en microscopie à contraste de phase au grossissement x200 (A). Quantification de l'expression de PKC ζ p-T560 (B) et de PKC ζ (C), de l'activité PKC ζ par mesure du ratio PKC ζ p-T560/PKC ζ (D), de l'expression de GSK3 β p-S9 (E) et de GSK3 β (F) ainsi que de l'activité GSK3 β par mesure du ratio de GSK3 β p-S9/GSK3 β (G) dans les NCM traitées avec 10 μ M de myr PS pendant 1h (n=8) et les cellules contrôles (n=8). Actine S. : Actine sarcomérique ; U.A. : unités arbitraires \pm SEM. Mann Whitney *p<0,05.

Le myr PS entraîne une diminution significative du niveau d'expression de PKC ζ (Figure 53C) qui semble à l'origine de la diminution significative du niveau de phosphorylation en Thr560 de PKC ζ dans

les cellules traitées (Figure 53B). Ces résultats ont d'ailleurs été validés avec un autre anticorps dirigé contre la PKC ζ et reconnaissant un épitope différent (Figure 54).

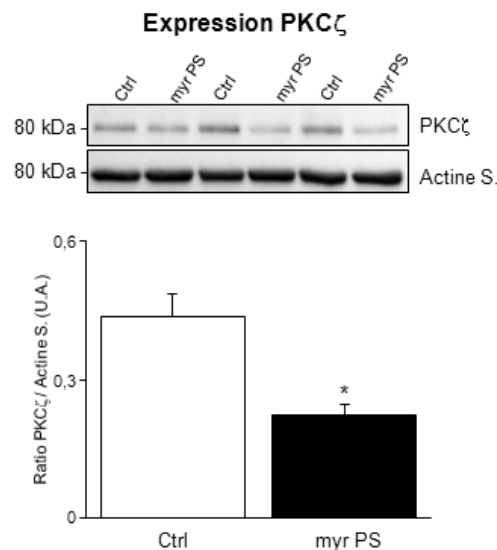


Figure 54. Quantification de l'expression de la PKC ζ (Ac Millipore) dans les NCM traitées avec 10 μ M de myr PS pendant 1h (n=3) et les cellules contrôles (n=3). Actine S. : Actine sarcomérique ; U.A. : unités arbitraires \pm SEM. Mann Whitney *p<0,05.

L'activité PKC ζ , évaluée par mesure du ratio PKC ζ p-T560/PKC ζ , n'est par conséquent pas modulée dans les NCM traitées par rapport aux NCM contrôles (Figure 53D). La diminution du niveau global de PKC ζ dans les NCM traitées avec le myr PS traduit néanmoins la présence d'une quantité moindre de PKC ζ active dans ces cellules.

Dans les NCM traitées, nous avons également mesuré l'expression de la kinase GSK3 β et son niveau de phosphorylation en Ser9 afin d'évaluer son activité kinase. Nous avons pu montrer que dans les NCM traitées avec l'inhibiteur de PKC ζ , l'expression de la kinase GSK3 β diminue d'environ 15% (Figure 53F) par rapport aux NCM contrôles alors que son niveau de phosphorylation en Ser9 est 2,3 fois plus élevé (Figure 53E). Ces modulations du niveau d'expression de GSK3 β et de GSK3 β p-S9 mettent en évidence une inhibition de l'activité GSK3 β matérialisée par l'augmentation du ratio GSK3 β p-S9/GSK3 β dans les cellules traitées avec le myr PS (Figure 53G). Ces résultats, suggèrent que PKC ζ pourrait être impliquée dans la régulation de l'activité GSK3 β dans les NCM.

b) Impact de l'inhibition de PKC ζ sur le niveau de phosphorylation de la Desmine

Une fois les conditions d'inhibition de PKC ζ *in vitro* établies, nous avons mesuré l'impact d'une telle inhibition sur le niveau d'expression de la Desmine soluble ainsi que sur le niveau global de phosphorylation en Ser de la Desmine. Pour ce faire nous avons réalisé un western blot dirigé contre

les Ser phosphorylées après immunoprécipitation de la Desmine à partir de la fraction protéique totale. Nous avons également analysé, grâce à la technologie Phos-Tag, le profil de phosphorylation de la Desmine soluble (Figure 55)

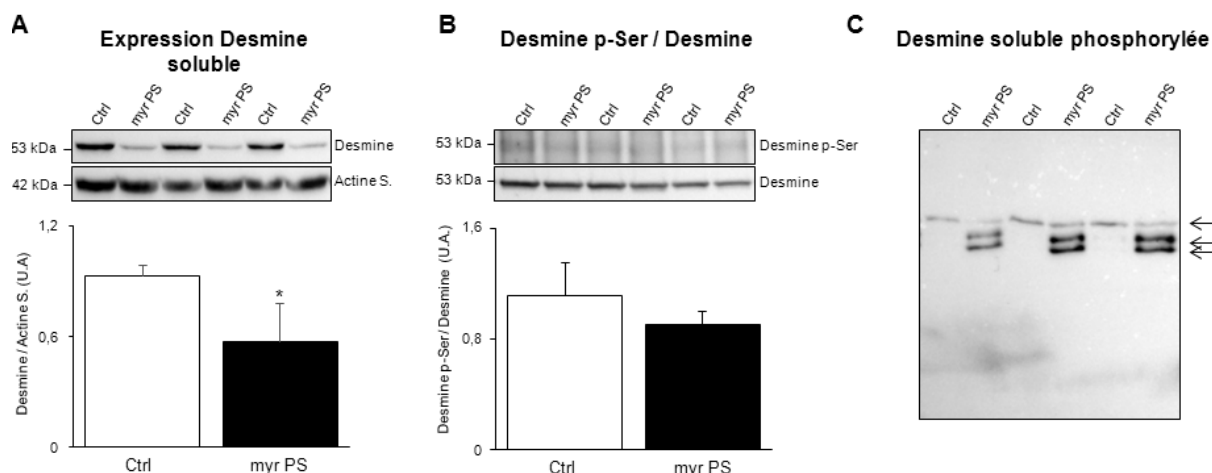


Figure 55. Quantification de l'expression de la Desmine soluble dans les NCM traitées pendant 1h avec 10 μ M de myr PS (n=7) et les NCM contrôles (n=8) (A). Quantification du niveau de phosphorylation en Ser de la Desmine par mesure du ratio Desmine p-Ser / Desmine dans lysats protéiques totaux des NCM traitées avec 10 μ M de myr PS pendant 1h (n=11) et les cellules contrôles (n=11). Analyse du profil de phosphorylation de la Desmine soluble dans les NCM traitées pendant 1h avec 10 μ M de myr PS (n=5) et les NCM contrôles (n=4) (A). Actine S. : Actine sarcomérique ; U.A. : unités arbitraires \pm SEM. Mann Whitney * p <0,05.

De façon intéressante, l'inhibition pharmacologique de la kinase PKC ζ (et par conséquent de GSK3 β) entraîne une diminution significative du niveau d'expression de la Desmine soluble dans les NCM traitées (Figure 55A). En revanche et de manière surprenante, nous n'avons pas pu mettre en évidence de modulation du niveau de phosphorylation en Ser de la Desmine entre les cellules traitées avec le myr PS et les cellules contrôles (Figure 55B). Néanmoins, l'analyse des différentes formes phosphorylées de la Desmine grâce à la technologie Phos-Tag a permis de montrer que l'inhibition pharmacologique de PKC ζ module considérablement le profil de phosphorylation de la Desmine (Figure 55C). En effet, sur le western blot dirigé contre la Desmine réalisé à partir d'un gel Phos-Tag, la bande la plus haute qui, d'après les données de la littérature correspond à la Desmine hyperphosphorylée (Agnetti *et al.*, 2014), est présente dans tous les échantillons. Néanmoins, son intensité semble moindre dans les NCM traitées avec le myr PS suggérant une diminution du niveau de phosphorylation de la Desmine en réponse à l'inhibition de PKC ζ . Ces résultats sont renforcés par la mise en évidence de la présence, dans les lysats protéiques de NCM traitées avec le myr PS sur ces mêmes western blot, de bandes correspondant à des formes de Desmine moins phosphorylées et/ou non phosphorylées (Figure 55C).

La modulation du profil de phosphorylation de la Desmine, visualisée grâce à la technologie Phos-Tag, consécutivement à l'inhibition pharmacologique de PKC ζ et à la diminution d'activité GSK3 β dans les NCM suggère fortement l'implication de ces 2 kinases dans la phosphorylation de la Desmine.

III. Discussion - Perspectives

Par analyse différentielle du phosphoprotéome des VG de rats du modèle expérimental d'IC, nous avons mis en évidence une augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine à 2 mois post-IDM (Dubois *et al.*, 2011). Nous avons également pu montrer que cette modulation du niveau de phosphorylation de la Desmine dans les VG de rats IC implique plusieurs résidus Ser (Bouvet *et al.*, soumis). Depuis les années 1980-90, il est connu que la phosphorylation de la Desmine altère sa capacité à polymériser en filaments intermédiaires (Geisler *et al.*, 1988) mais également la structure des filaments de Desmine existants et par conséquent celle des sarcomères (Schaper *et al.*, 1991 ; Winter *et al.*, 2014). Notre étude avait pour objectif d'identifier précisément les résidus Ser mais également les kinases impliquées dans l'augmentation de la forme phosphorylée de la Desmine dans le modèle d'IC chez le rat à 2 mois post-IDM et ceci dans le but de comprendre le rôle physiologique de la Desmine phosphorylée

A. Identification des Ser impliquées dans l'augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine *in vivo*

En accord avec les données de la littérature, nous avons pu montrer que la Desmine est majoritairement retrouvée dans la fraction protéique insoluble des VG de rats témoins et IC. En effet, la Desmine en tant que protéine des filaments intermédiaires polymérise en un réseau protéique insoluble nécessitant un tampon très stringent (contenant en moyenne 8 M d'urée) pour être solubilisé (Lazarides *et al.*, 1976). Dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM, au moment où le taux de phosphorylation en Ser de la Desmine augmente de manière significative, nous avons montré la présence d'agrégats de Desmine suggérant un lien de causalité entre l'augmentation de son niveau de phosphorylation et la formation d'agrégats de Desmine. Nous avons montré que dans les VG du modèle *in vivo*, le niveau d'expression de la Desmine soluble et insoluble est inchangé entre les 2 groupes d'animaux suggérant que les agrégats de Desmine seraient, comme le suggèrent les travaux Agnetti *et al.*, (2014), des structures insolubles comparables aux dépôts amyloïdes. Ainsi, dans le modèle d'IC chez le rat à 2 mois post-IDM, après phosphorylation, les filaments de Desmine dépolymériseraient et la Desmine soluble ainsi générée s'agrègerait rapidement en oligomères insolubles.

Fort de ce constat, nous avons identifié les Ser de la Desmine impliquées dans l'augmentation de sa forme phosphorylée dans le modèle *in vivo* à partir des fractions protéiques insolubles des VG de rats. Par spectrométrie de masse, nous avons pu montrer que 8 Ser de la Desmine (Ser25, 28, 31, 32, 60, 81, 329 et 431) sont phosphorylées dans ces VG. Toutes ces Ser, à l'exception de la Ser329, avaient déjà été montrées phosphorylées par criblage phosphoprotéomique chez le rat ou chez l'homme (Lundby *et al.*, 2012 ; Højlund *et al.*, 2009). A notre connaissance, nous sommes donc les premiers à rapporter une phosphorylation de la Desmine en Ser329 chez le rat. De manière intéressante, l'ensemble des Ser identifiées à l'exception de la Ser431, sont localisées au niveau de la

tête de la Desmine qui est connue pour jouer un rôle central dans sa capacité à polymériser en filaments intermédiaires (Winter *et al.*, 2014). Compte tenu des données de la littérature, nos résultats soutiennent l'hypothèse d'un lien de causalité entre l'augmentation du niveau de phosphorylation en Ser de la Desmine, observée dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM, la dépolymérisation des filaments de Desmine et son accumulation cytosolique sous forme d'agrégats protéiques insolubles. En effet, Kawajiri *et al.* (2003) ont montré par approche *in vitro* que la phosphorylation des protéines des filaments intermédiaires, en particulier la phosphorylation en Ser60 de la Desmine médiée par Aurora B, pourrait contribuer à la dépolymérisation des filaments intermédiaires favorisant ainsi leur ségrégation au moment de la cytodivision. Plus récemment, dans un modèle expérimental d'IC chez le chien par désynchronisation cardiaque, Agnetti *et al.*, (2014) ont mis en évidence une augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine, impliquant les Ser28 et 32, et qui pourrait promouvoir l'accumulation d'agrégats de Desmine insolubles. Dans les VG du modèle expérimental d'IC chez le rat à 2 mois post-IDM, la quantification du niveau de phosphorylation en Ser60 de la Desmine a permis de montrer que cette Ser n'est pas impliquée dans l'augmentation de la forme phosphorylée de la Desmine. En revanche, du fait de la non commercialisation d'anticorps dirigés contre les formes phosphorylées des autres Ser identifiées, nous n'avons pas pu quantifier par analyse biochimique leur niveau de phosphorylation. Ces Ser restent donc à l'heure d'aujourd'hui des candidates potentiellement impliquées dans l'augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine et dans l'altération de la structure de ses filaments dans le modèle *in vivo*.

Dans la suite du projet, la quantification par spectrométrie de masse du niveau de phosphorylation des différentes Ser de la Desmine identifiées, en prenant compte du niveau d'expression de la Desmine au sein de chaque échantillon, nous permettra d'identifier précisément lesquelles de ces Ser sont impliquées dans la modulation de phosphorylation de la Desmine dans le modèle *in vivo*. *In vitro*, l'étude de la fonctionnalité des mutants de Desmine, de manière individuelle dans un premier temps, pourra également permettre de déterminer quelles sont les Ser dont la phosphorylation est impliquée dans la dépolymérisation des filaments de Desmine et dans son agrégation sous forme d'oligomères insolubles dans le modèle d'IC chez le rat.

B. Identification des kinases impliquées dans l'augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine à 2 mois post-IDM

Dans le même temps, nous avons cherché à identifier la ou les kinases impliquées dans ces modulations du niveau de phosphorylation en Ser de la Desmine dans le modèle expérimental d'IC à 2 mois post-IDM. Une analyse bioinformatique, la revue de la littérature ainsi que les travaux menés au laboratoire nous ont amené à nous intéresser particulièrement à 4 kinases (CaMK II, Aurora B, PKC ζ et GSK3 β) pouvant potentiellement être impliquées dans la phosphorylation de la Desmine.

De manière surprenante nous avons montré qu'en dépit de l'augmentation de l'expression de la CaMK II dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM, son activité diminue de manière significative et par conséquent que CaMK II n'est pas la kinase impliquée dans l'augmentation du niveau de

phosphorylation de la Desmine dans le modèle *in vivo*. La plupart des études réalisées chez l'homme et dans des modèles expérimentaux d'IC ont permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression mais aussi de l'activité kinase de la CaMK II dans le cœur hypertrophié et le cœur IC qui semble liée à la perturbation de l'homéostasie calcique (Couchonnal *et al.*, 2008 ; Anderson, 2011 ; Fischer *et al.*, 2014 ; Zhao *et al.*, 2014). En effet, Sossala *et al.* (2010) ont mis en évidence une augmentation de l'expression de CaMK II dans les VD et VG des patients décédés d'IC d'origine ischémique ou de cardiomyopathie dilatée. Depuis plusieurs années, la CaMK II est reconnue comme un des principaux responsables des anomalies de contraction cardiaque dans l'IC systolique avancée notamment par son implication dans le couplage excitation-contraction (Fischer *et al.*, 2014). Néanmoins, plusieurs études ont également montré dans des modèles expérimentaux d'IC chez le chien et chez le rat, une diminution de l'activité de la CaMK II dans les VG des animaux qui pourrait être à l'origine d'un défaut de réabsorption du Ca^{2+} dans le RS (Mishra *et al.*, 2003 ; Huang *et al.*, 1999). Ces divergences concernant l'activité CaMK II pourraient être dues à des différences au niveau des espèces étudiées et de leur genre, de l'étiologie de l'IC (modèles expérimentaux d'IC par ligation de l'artère coronaire *versus* constriction de l'aorte) du conditionnement des échantillons (retrait ou non de la zone nécrosée après infarctus) ou encore du temps d'étude. En effet, dans un modèle d'IC induit par ligation de l'artère coronaire gauche chez des rats mâles pendant différents temps allant de 6h à 2 semaines, les auteurs ont mis en évidence que le niveau d'expression et de phosphorylation en Thr287 de la CaMK II diminue rapidement dans les VG de rats après l'infarctus pour atteindre son niveau le plus bas après 24h et remontent progressivement (Zhao *et al.*, 2014). Les auteurs proposent que cette diminution d'expression de CaMK II servirait de rétrocontrôle négatif permettant de réguler la libération de stocks calciques intracellulaires et ceci dans le but de limiter les dommages cellulaires liés à l'ischémie. Ces travaux soulignent la dynamique d'expression de la CaMK II en réponse à l'IDM et mettent en évidence qu'en fonction de la durée de ligation, les mécanismes moléculaires régulant son expression et son activité varient de façon significative.

L'étude d'Aurora B a permis de mettre en évidence que l'expression de cette kinase est restreinte aux noyaux des cellules. En effet, Aurora B est une protéine nucléaire abondamment exprimée durant la phase S et la transition G2/M du cycle cellulaire (Kollareddy *et al.*, 2008). Par conséquent, elle ne peut entrer en interaction avec la Desmine qu'au moment de la division cellulaire. Cependant, les cardiomyocytes en tant que cellules post-mitotiques (Bergmann *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2015 ; Linton *et al.*, 2015) ne se divisent que très peu voire pas du tout. En effet, il a été montré qu'en conditions physiologiques chez la souris adulte, la génération de cardiomyocytes à partir de cardiomyocytes pré-existants est d'environ 0,76% par an (Senyo *et al.*, 2012). Une interaction physique entre la kinase Aurora B et la Desmine est donc peu envisageable. Ces données, en plus de concourir à l'exclusion qu'Aurora B de notre étude, expliquent également notre incapacité à quantifier son niveau de phosphorylation en Thr232 dans les VG de rats du modèle *in vivo*. Enfin, la mise en évidence d'une absence de modulation du niveau de phosphorylation en Ser60 de la Desmine, connue pour être une cible d'Aurora B (Kawajiri *et al.*, 2003), a définitivement démontré qu'Aurora B n'est pas la kinase responsable des modulations du niveau de phosphorylation en Ser de la Desmine observées dans le modèle d'IC chez le rat à 2 mois post-IDM.

En revanche, nous avons montré que les kinases PKC ζ et GSK3 β sont activées dans le modèle *in vivo* à 2 mois post-IDM. Le rôle de PKC ζ dans le cœur est peu connu, néanmoins la PKC ζ semble impliquée dans la réponse hypertrophique des cardiomyocytes via la régulation de la réexpression de l'ANF (pour *atrial natriuretic factor*) (Decock *et al.*, 1994). Quant à GSK3 β , son rôle dans le cœur est en revanche bien mieux connu. En effet, cette kinase a été montrée impliquée dans les processus anti-hypertrophiques au niveau du cœur (Hardt *et al.*, 2002). Son inactivation via la phosphorylation de sa Ser9 en réponse aux stimuli hypertrophiques favorise l'hypertrophie cardiaque et le développement de l'IC (Matsuda *et al.*, 2008). Les travaux de Zhai *et al.* (2011) ont permis de montrer que dans le cœur, l'activité GSK3 β augmente de manière significative lors d'une ischémie prolongée, comme lors de la ligature permanente de l'ACG, puis diminue significativement au moment de la reperfusion.

La PKC ζ et la GSK3 β ont toutes 2 déjà été montrée impliquées dans la phosphorylation de la Desmine. En effet, par approche *in vitro*, la PKC ζ a été montrée impliquée dans la régulation du niveau de phosphorylation de plusieurs protéines sarcomériques dont la Desmine, la Tnl et la TnT (Wu *et al.*, 2007). Plus récemment, dans un modèle expérimental d'IC chez le chien par désynchronisation cardiaque, la GSK3 β a été montrée impliquée dans la phosphorylation en Ser28 et 32 de la Desmine (Agnetti *et al.*, 2014). De manière intéressante, dans le modèle d'IC chez le rat à 2 mois post-IDM, nous avons identifié les Ser28 et 32 de la Desmine comme potentiellement impliquées dans l'augmentation de sa forme phosphorylée. Par analyse bioinformatique, nous avons pu montrer que les Ser25, et 329 de la Desmine sont des cibles potentielles de PKC ζ (KinasePhos 2.0). Compte tenu de ces informations, les kinases PKC ζ et la GSK3 β pourraient médier l'augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine dans le modèle d'IC chez le rat.

Par approche *in vitro*, nous avons donc cherché à valider l'implication de ces kinases dans la phosphorylation de la Desmine. L'absence d'activateur spécifique connu de PKC ζ nous a amené à inhiber l'activité de cette kinase afin de mesurer l'impact sur la Desmine phosphorylée. Dans un premier temps nous avons tenté d'invalider l'expression la PKC ζ dans les NCM par siRNA mais en vain malgré le test de 4 siRNA individuels et d'un siRNA SMARTpool dirigés contre la PKC ζ . Par la suite, nous avons modulé l'activité PKC ζ à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique. De manière intéressante, nos résultats, comme ceux de Ballou *et al.* (2002), suggèrent que la PKC ζ pourrait être impliquée dans la régulation de l'activité GSK3 β puisque l'inhibition pharmacologique de la PKC ζ entraîne une inhibition de GSK3 β . Dans cette étude, les auteurs ont montré dans la lignée fibroblastique Rat-1 que l'inhibition de GSK3 β via la phosphorylation de sa Ser9 serait en partie dépendante de PKC ζ . Au sein des NCM, il est possible que la PKC ζ soit impliquée dans la régulation de l'activité GSK3 β de manière indirecte via d'autres partenaires.

Concernant la Desmine, nous avons mis en évidence que l'inhibition de PKC ζ entraîne une diminution du niveau d'expression de la Desmine soluble potentiellement liée à la modulation de son profil de phosphorylation. En effet, sur le western blot Desmine réalisé à partir d'un gel Phos-Tag, la mise en évidence de la présence de 2 bandes supplémentaires correspondant à des formes moins phosphorylées voire non phosphorylées de Desmine suggèrent que l'inhibition de PKC ζ diminue le niveau de phosphorylation de la Desmine. L'apparition de 2 bandes supplémentaires suggère

également que PKC ζ pourrait être impliquée dans la phosphorylation de plus d'une Ser au niveau de la Desmine. Cette diminution de phosphorylation de la Desmine permettrait de préserver la structure des filaments de Desmine et ainsi de diminuer le niveau de Desmine dépolymérisée et donc soluble. Notre incapacité à détecter une modulation de phosphorylation de la Desmine par mesure du niveau global de phosphorylation en Ser de la Desmine résulte sans doute d'un manque de sensibilité. En effet, la mesure du niveau global de phosphorylation en Ser de la Desmine ne permet pas de mettre en évidence la modulation du niveau de phosphorylation de quelques Ser parmi plus d'une quinzaine de Ser phosphorylables.

Finalement, nos données *in vivo* et *in vitro* mettent en évidence l'implication de la kinase PKC ζ dans la phosphorylation de la Desmine et suggèrent l'implication de GSK3 β . Les résultats obtenus dans les NCM en culture laissent également penser que la PKC ζ pourrait intervenir dans la régulation fonctionnelle de GSK3 β et que par conséquent l'effet de l'inhibition de PKC ζ sur la phosphorylation de la Desmine pourrait être médiée par GSK3 β . Néanmoins, il est également possible que ces 2 kinases agissent en parallèle sur des Ser différentes au niveau de la Desmine. En effet, de manière générale la protéine GSK3 est connue pour phosphoryler les Ser présentes 3 acides aminés en amont de Ser initialement phosphorylées par d'autres kinases. Ainsi, la phosphorylation de la Desmine par la GSK3 β pourrait être dépendante de sa phosphorylation par PKC ζ (Figure 56).

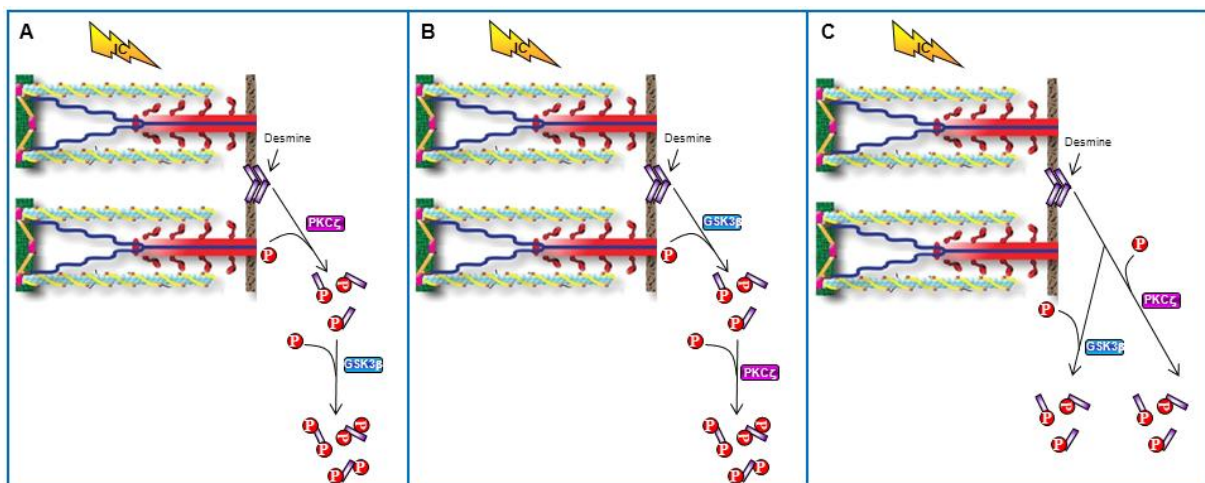


Figure 56. Schéma récapitulatif des différents scénarios menant à la phosphorylation de la Desmine dans le modèle d'IC chez le rat. La phosphorylation de la Desmine par PKC ζ pourrait être médiée par la kinase GSK3 β (A). La phosphorylation de la Desmine par GSK3 β pourrait dépendre de la phosphorylation initiale de Desmine par PKC ζ (B). Les kinases PKC ζ et GSK3 β agiraient en parallèle pour phosphoryler la Desmine au cours de l'IC (C).

Dans la suite du projet, nous mesurerons l'effet de l'inhibition et/ou l'activation de GSK3 β sur le niveau de phosphorylation de la Desmine mais aussi sur l'activité PKC ζ . Ces travaux permettront de déterminer d'une part si GSK3 β est impliquée dans la phosphorylation de la Desmine et d'autre part si cet effet est médié par PKC ζ ou au contraire si la phosphorylation de la Desmine par PKC ζ fait intervenir GSK3 β . Une fois les Ser impliquées dans l'augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine clairement identifiées, nous quantifierons l'effet de la modulation de l'activité PKC ζ et GSK3 β

sur leur niveau de phosphorylation afin de valider définitivement l'implication de ces kinases dans la phosphorylation de la Desmine sur ces Ser au cours du RVG post-IDM.



Partie 4

Identification des mécanismes
protéolytiques impliqués dans la
clairance de la Desmine
phosphorylée

I. Objectifs de l'étude

Dans le modèle d'IC chez le rat à 2 mois post-IDM, nous avons mis en évidence une augmentation du niveau de phosphorylation en Ser de la Desmine qui semble dépendante des kinases PKC ζ et GSK3 β . Cette hyperphosphorylation de la Desmine pourrait participer au développement et/ou à l'aggravation du RVG et de la dysfonction contractile en favorisant la dépolymérisation des filaments de Desmine et la formation d'agrégats dans les VG de rats IC à 2 mois comme cela a été montré dans un autre modèle d'IC chez le chien (Agnetti *et al.*, 2014).

Dans la littérature, il est décrit qu'au sein des cellules post-mitotiques telles que les cardiomyocytes (Bergamann *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2015 ; Linton *et al.*, 2015), les processus de contrôle qualité des protéines jouent un rôle central dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. En effet, un déséquilibre entre le taux de synthèse et de dégradation des protéines peut être à l'origine d'une accumulation cytosolique de protéines pouvant, à terme, former des agrégats responsables de l'apparition d'une protéotoxicité cellulaire (Wang *et al.*, 2015). Ainsi, les agrégats de Desmine mis en évidence dans les VG des animaux IC à 2 mois post-IDM pourraient être toxiques pour les cardiomyocytes. En s'appuyant sur les données de la littérature, nous avons émis l'hypothèse que les systèmes protéolytiques pourraient alors intervenir afin d'assurer la clairance de la Desmine phosphorylée dans le but d'assurer la survie cellulaire (Bakthisaran *et al.*, 2015).

Trois grands mécanismes que sont l'UPS, l'autophagie et la réponse UPR ont à ce jour été montrés impliqués dans le contrôle qualité des protéines au sein de la cellule cardiaque (Wang *et al.*, 2015). La réponse UPR se déclenche suite à l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE. Ce compartiment est celui dans lequel les protéines sécrétées, transmembranaires ou résidentes du RE sont repliées. Elles y subissent également une étape de maturation par ajout de MPTs avant d'être adressées à l'appareil de Golgi puis, dans le cas des protéines transmembranaires et sécrétées, à la membrane plasmique ou au milieu extracellulaire. La Desmine n'étant ni une protéine transmembranaire, ni une protéine sécrétée (Bouvet *et al.*, soumis), cette étude se propose d'étudier l'implication de l'UPS et de l'autophagie (macroautophagie et CMA) dans la clairance de la Desmine phosphorylée denvionnante

ans le modèle expérimental d'IC chez le rat. Pour ce faire, nous avons évalué dans un premier temps, l'activité de ces systèmes protéolytiques dans les VG de rats témoins et IC. Puis, dans un second temps, nous avons modulé ces mécanismes *in vitro* dans des cultures de cardiomyocytes contractiles et mesuré l'impact sur l'expression de la Desmine et de ses formes phosphorylées.

L'objectif de ce travail est de comprendre d'une part quels sont les mécanismes responsables de l'accumulation cytosolique de Desmine dans les VG de rats IC et d'autre part quels sont ceux activés pour tenter d'enrailler ce phénomène.

II. Résultats

A. Etude de la régulation des systèmes protéolytiques dans le modèle d'IC chez le rat

1. Système ubiquitine protéasome (UPS)

Afin d'évaluer, de manière indirecte, l'activité du protéasome tout au long du RVG, nous avons mesuré le niveau d'ubiquitinylation globale des protéines dans les VG de rats du modèle expérimental d'IC à 7 jours, 1 et 2 mois post-IDM (Figure 57).

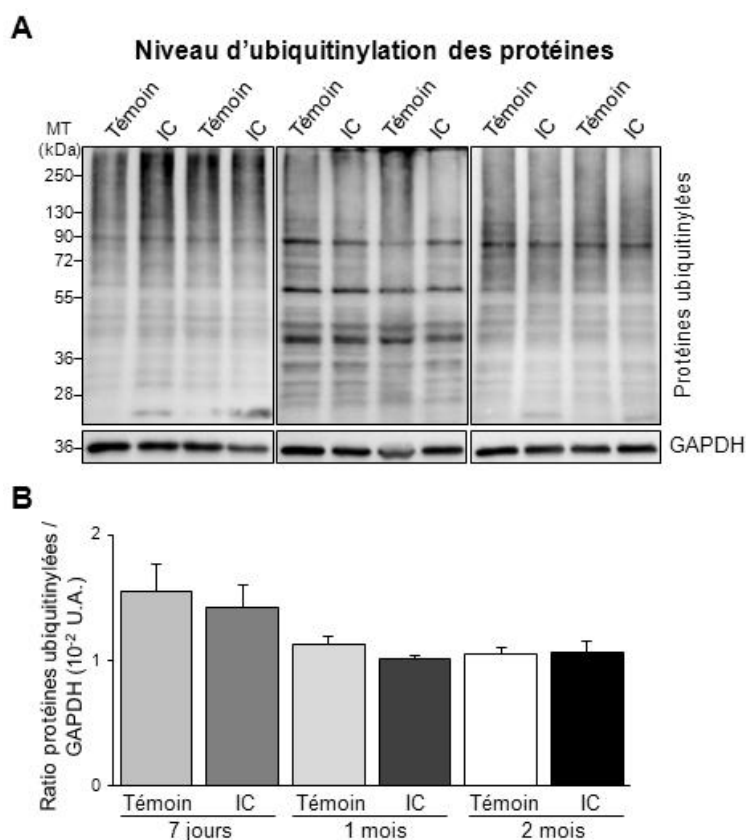


Figure 57. Evaluation de l'activité du protéasome dans le modèle d'IC chez le rat. Images représentatives du niveau d'ubiquitinylation des protéines dans la fraction protéique soluble des VG de rats à 7 jours (témoins n=8 ; IC n=8), 1 mois (témoins n=9 ; IC n=9) et 2 mois post-IDM (témoins n=11 ; IC n=11) (A) et quantification (B). IC : insuffisant cardiaque ; U.A. : unités arbitraires \pm SEM. Mann Whitney.

De manière intéressante, nous avons montré que, bien que le profil d'ubiquitinylation des protéines soit modulé dans les VG de rats au cours du développement du RVG (Figure 57A), le niveau global d'ubiquitinylation des protéines ne varie ni entre les 2 groupes d'animaux à chaque temps, ni au cours du temps (Figure 57B). Ces résultats suggèrent que l'activité du protéasome n'est pas modulée dans les VG de ce modèle expérimental.

Le niveau global d'ubiquitylation des protéines ne reflétant pas ce qui se passe spécifiquement au niveau de la Desmine, nous avons par la suite quantifié, à 2 mois post-IDM, au moment où le niveau de phosphorylation de la Desmine est significativement augmenté, le niveau d'ubiquitylation de la Desmine dans la fraction protéique insoluble des VG de rats. Nous avons également mesuré tout au long du RVG, l'expression de l'ubiquitine ligase TRIM32 qui est une enzyme ayant déjà été montrée comme impliquée dans l'ubiquitylation de la Desmine phosphorylée dans un modèle d'atrophie musculaire (Cohen *et al.*, 2012) et avons cherché à déterminer si cette enzyme colocalise avec la Desmine *in vivo* (Figure 58).

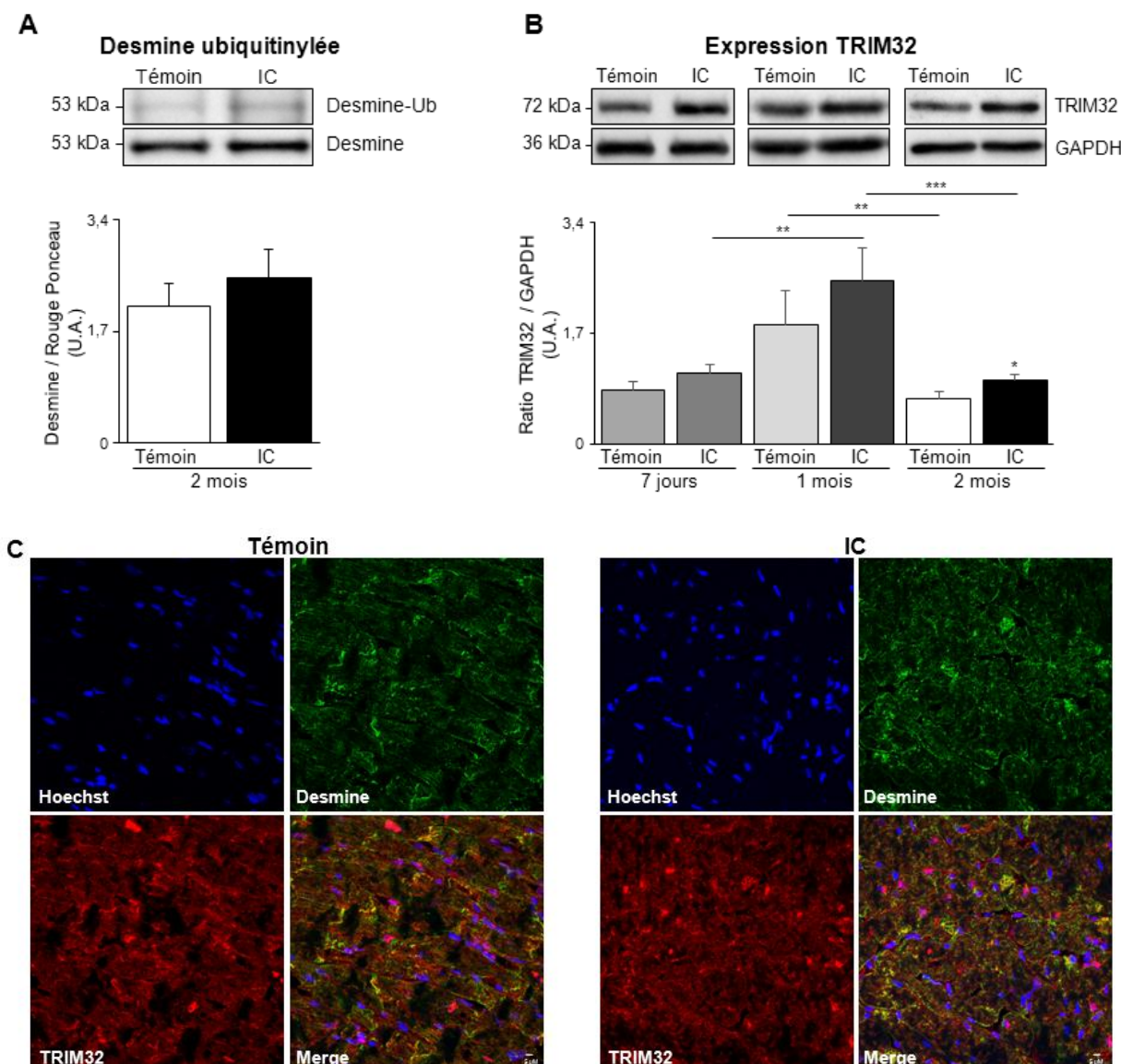


Figure 58. Quantification du niveau d'ubiquitylation de la Desmine dans la fraction protéique insoluble des VG de rats témoins (n=11) et IC (n=11) à 2 mois post-IDM (A) et de l'expression de TRIM32 dans la fraction protéique soluble des VG de rats à 7 jours (témoins n=8 ; IC n=8), 1 mois (témoins n=9 ; IC n=9) et 2 mois post-IDM (témoins n=11 ; IC n=11) (B). Immunolocalisation de la Desmine (vert) et de TRIM32 (rouge) dans les VG de rats témoin (panel de gauche) et IC (panel de droite) à 2 mois post-IDM. IC : insuffisant cardiaque ; U.A. : unités arbitraires ± SEM. Mann Whitney *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Nous n'avons pas observé de modulation du niveau d'ubiquitylation de la Desmine reste inchangé entre les 2 groupes d'animaux (Figure 58A). En revanche, nous avons mis en évidence une augmentation significative du niveau d'expression de l'ubiquitine ligase TRIM32 dans les VG de rats IC à 1 mois par rapport au VG de rats à 7 jours post-IDM (Figure 58B). Son expression diminue de manière significative aussi bien dans les VG de rats IC que témoins à 2 mois par rapport aux VG des animaux à 1 mois post-IDM (Figure 58B). A 2 mois post-IDM, l'expression de TRIM32 est significativement augmentée dans les VG des rats IC par rapport aux témoins (Figure 58B). Néanmoins, dans le même temps le.

Au vu de ces résultats, bien que l'ubiquitine ligase TRIM32 colocalise avec la Desmine dans les VG de rats témoins et IC à 2 mois post-IDM (Figure 58C), il semble qu'elle n'intervienne pas dans l'ubiquitylation de la Desmine phosphorylée comme cela a été montré dans le muscle squelettique (Cohen *et al.*, 2012). En effet, à 2 mois post-IDM, au moment où le niveau de phosphorylation de la Desmine augmente de manière significative dans les VG de rats IC, son niveau d'ubiquitylation reste inchangé entre les 2 groupes d'animaux.

L'ensemble de nos résultats suggèrent que, bien que l'UPS soit actif dans les VG de rats au cours du RVG post-IDM, il n'est pas impliqué dans la prise en charge et la dégradation de la Desmine phosphorylée à 2 mois post-IDM.

2. Macroautophagie

a) Mesure de l'expression des marqueurs de la macroautophagie

Afin d'évaluer l'activité de la macroautophagie au cours du RVG post-IDM, nous avons mesuré dans le modèle *in vivo*, le niveau d'expression de plusieurs de ces marqueurs. Ainsi, nous avons quantifié dans les VG de rats à 7 jours, 1 et 2 mois post-IDM, l'expression du LC3, de p62 et de Beclin 1 (Figure 59). La protéine Beclin 1 est impliquée dans l'initiation de la formation des autophagosomes alors que p62 est une protéine adaptatrice qui fixe les protéines cibles de la macroautophagie et favorise le recrutement de l'autophagosome. La forme cytosolique de LC3 (LC3 I) une fois conjuguée à la phosphatidyléthanolamine (PE, LC3-PE ou LC3 II) va s'insérer dans la double membrane de l'autophagosome jusqu'au moment de sa fusion avec le lysosome.

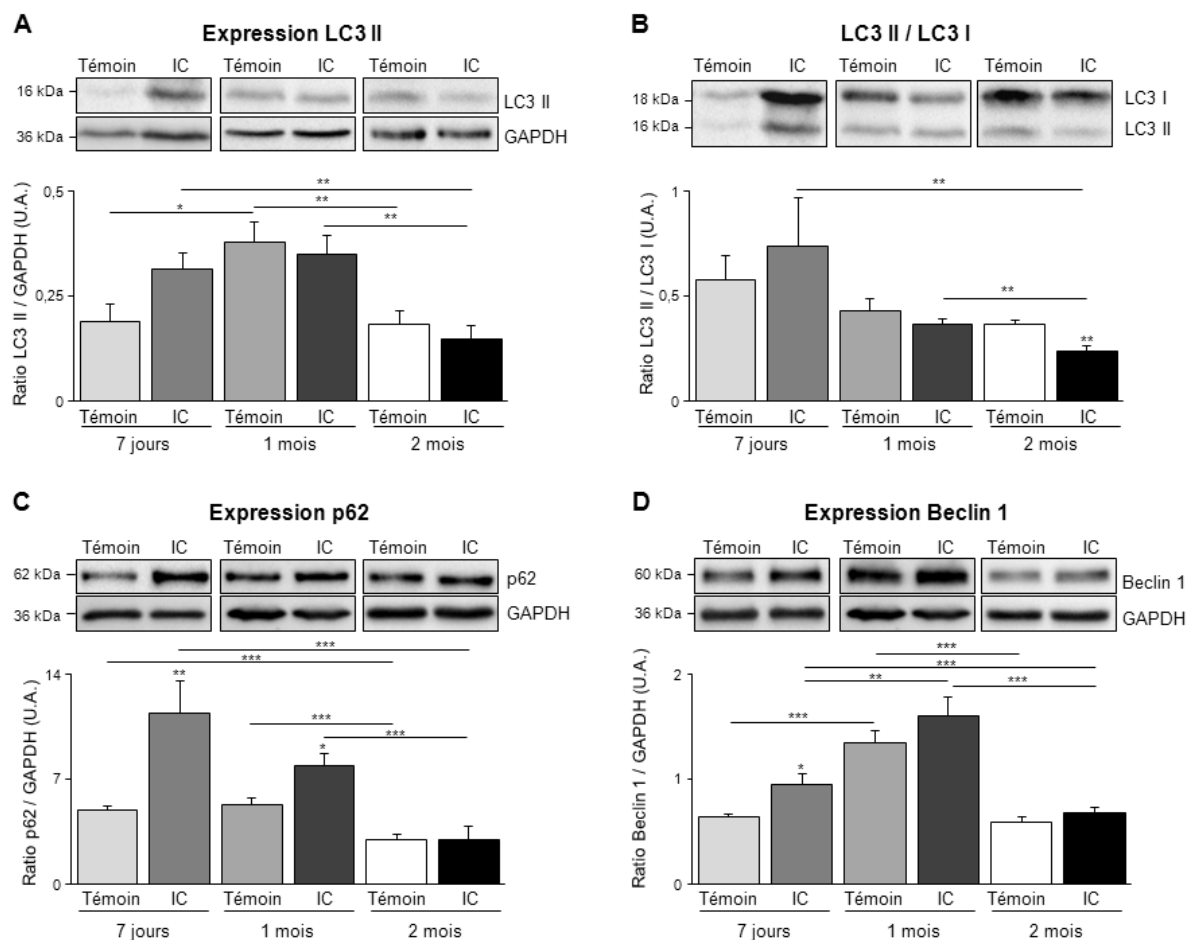


Figure 59. Mesure de l'expression des marqueurs de la macroautophagie dans le modèle d'IC chez le rat. Quantification du ratio LC3 II / LC3 I (A), de l'expression du LC3 II (B), de p62 (C) et de Beclin 1 (D) dans les VG de rats à 7 jours (témoins n=8 ; IC n=8), 1 mois (témoins n=9 ; IC n=9) et 2 mois post-IDM (témoins n=11 ; IC n=11) à 2 mois post-IDM. IC : insuffisant cardiaque ; U.A. : unités arbitraires ± SEM. Mann Whitney *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Nous avons mis en évidence que le niveau d'expression du LC3 II augmente de manière significative dans les VG des animaux témoins à 1 mois par rapport aux animaux à 7 jours (Figure 59A). Puis, son expression diminue aussi bien dans les VG de rats témoins qu'IC à 2 mois post-IDM par rapport aux animaux à 1 mois (Figure 59A). En revanche, le niveau d'expression du LC3 II reste inchangé entre les 2 groupes d'animaux aux 3 temps.

La mesure du ratio LC3 II / LC3 I, reflétant le taux de conversion du LC3 I en LC3 II et par conséquent le flux autophagique, a permis de mettre en évidence une diminution significative de ce ratio dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM par rapport aux animaux à 7 jours et à 1 mois (Figure 59B). De manière intéressante, nous avons pu montrer que le ratio LC3 II / LC3 I diminue de manière significative dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM par rapport aux témoins alors que ce ratio est inchangé entre les 2 groupes d'animaux à 7 jours et 1 mois (Figure 59B).

En ce qui concerne p62, son niveau d'expression augmente de manière significative dans les VG de rats à 7 jours et 1 mois post-IDM par rapport aux contrôles respectifs mais reste inchangé entre les

VG de rats témoins et IC à 2 mois (Figure 59C). Par ailleurs, le niveau d'expression de p62 diminue globalement dans les VG de rats au cours du RVG post-IDM (Figure 59C).

La mesure du niveau d'expression de Beclin 1 a permis de montrer que, de la même manière que pour le LC3 II, Beclin 1 augmente dans les VG de rats témoins à 1 mois par rapport aux animaux à 7 jours puis diminue dans les VG de rats témoins et IC à 2 mois post-IDM par rapport aux animaux à 1 mois (Figure 59D). De plus, l'expression de Beclin 1 augmente de manière significative dans les VG de rats à 7 jours post-IDM par rapport aux témoins alors qu'elle est inchangée entre les 2 groupes d'animaux à 1 et 2 mois.

L'ensemble de ces données suggèrent qu'à 7 jours post-IDM, la macroautophagie serait activée dans les VG de rats IC (augmentation de Beclin-1) mais ne serait pas effective (accumulation de p62). A 1 mois post-IDM, l'activité de la macroautophagie serait inchangée entre les 2 groupes d'animaux alors qu'à 2 mois post-IDM, la diminution significative du flux macroautophagique (ratio LC3 II / LC3 I) traduirait une diminution de ce système. Finalement, dans le modèle d'IC chez le rat, la macroautophagie serait activée en réponse à l'IDM mais diminuerait avec le temps pour être totalement inhibée à 2 mois post-IDM comme le suggèrent Zhu *et al.* (2007).

b) Étude de l'ultrastructure des VG de rats

Afin de compléter l'étude de la macroautophagie dans le modèle expérimental d'IC chez le rat, nous avons étudié, en collaboration avec la plateforme d'imagerie de Lille (BiCeL), l'ultrastructure des VG de rats à 7 jours, 1 et 2 mois post-IDM et recherché la présence de vésicules à double membranes : les autophagosomes, marqueurs d'une macroautophagie active (Figure 60).

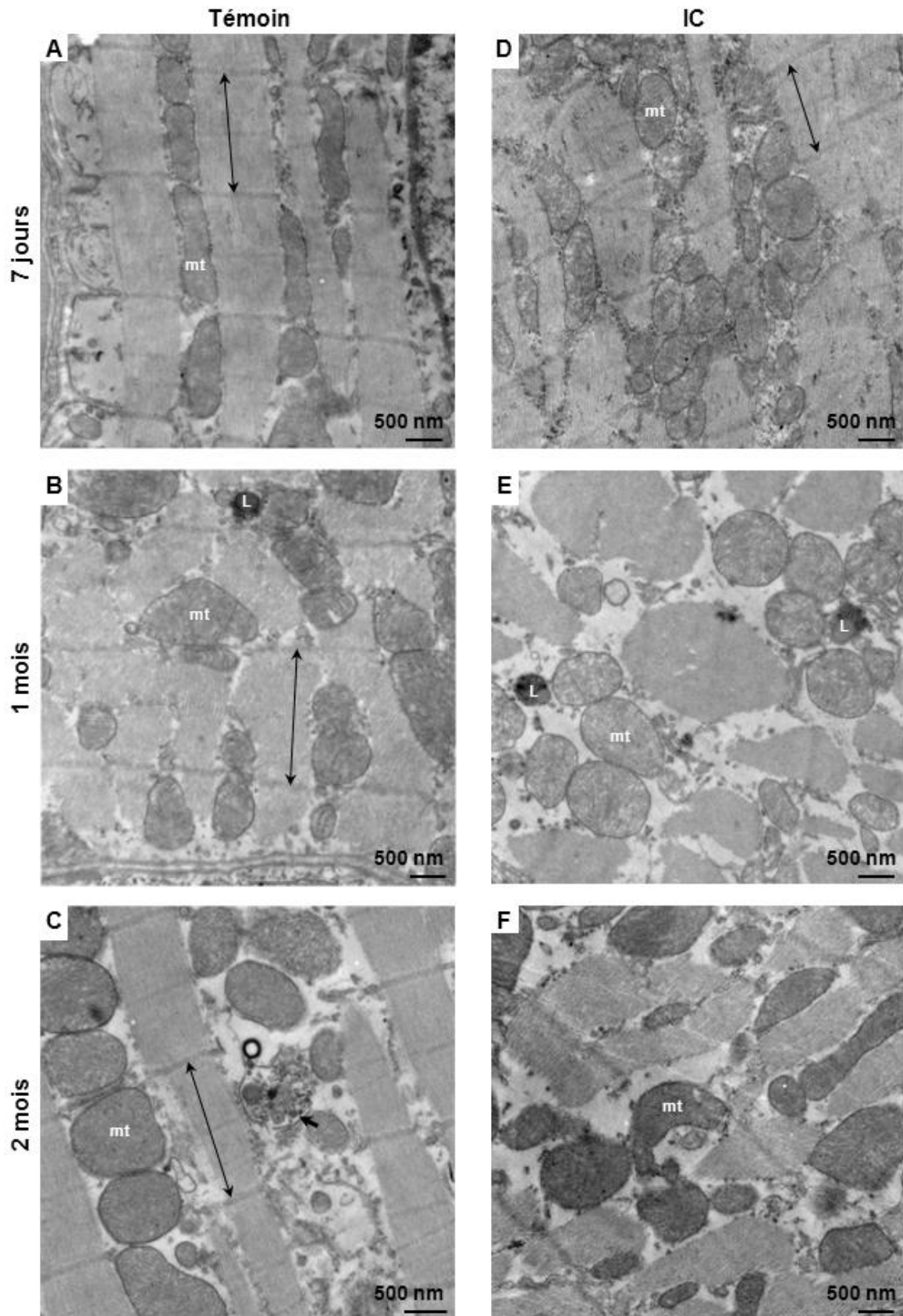


Figure 60. Ultrastructure des VG de rats du modèle expérimental d'IC au cours du RVG post-IDM. Analyse en microscopie électronique de l'ultrastructure des VG de rats témoins (A, B, C) et IC (D, E, F) à 7 jours (A et D), 1 mois (B et E) et 2 mois post-IDM (C et F). IC : insuffisant cardiaque ; mt : mitochondrie ; → : autophagosome ; ↔ : sarcomère ; L : lysosome.

L'analyse en microscopie électronique de l'ultrastructure des VG de rats a permis de mettre en évidence une très faible abondance de vésicules à double membranes, et donc d'autophagosomes, aussi bien dans les VG de rats témoins que dans les VG de rats à 7 jours, 1 et 2 mois post-IDM. De manière surprenante nous n'avons pas constaté de différence d'abondance d'autophagosomes entre les 2 groupes d'animaux aux 3 temps suggérant que dans les VG de rat, la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes n'est aucunement perturbée.

L'analyse de l'ultrastructure nous a également permis de montrer qu'au sein des VG de rats post-IDM, l'organisation et/ou la structure des myofibrilles et des sarcomères est significativement perturbée (Figure 60D-F). En effet, les sarcomères ne sont plus attachés les uns aux autres par les disques Z dans ces VG, en particulier à 1 et 2 mois post-IDM, et perturbent ainsi la structure des myofibrilles et probablement la contractilité des cellules.

Ces analyses nous ont également permis de mettre en évidence, dans les VG de rats à 7 jours, 1 et 2 mois post-IDM, une altération de la structure des mitochondries (Figure 60D-F). D'une part, dans les VG de rats à 7 jours, 1 et 2 mois post-IDM, les mitochondries sont plus nombreuses mais également plus petites que dans les VG de rats témoins. Ces mitochondries, au lieu de se situer entre les sarcomères adjacents comme dans les VG de rats témoins (Figure 60A-C) sont agglomérées les unes aux autres (Figure 60D-F). D'autre part, l'empilement régulier de la membrane mitochondriale interne sous forme de crêtes, visible dans les mitochondries des VG de rats témoins, laisse place dans certaines mitochondries des VG de rats en post-infarctus à des crêtes plus espacées. Ce phénomène est particulièrement bien illustré dans les VG de rats IC à 1 mois post-IDM (Figure 60E). Ces modulations topologiques des mitochondries traduisent la présence de mitochondries défectueuses au sein des VG de rats en post-infarctus qui pourraient avoir des conséquences sur la production d'ATP (Hoppel *et al.*, 2009). L'accumulation de telles mitochondries, d'ordinaire éliminées par les processus de macroautophagie (Shires *et al.*, 2015) pourrait traduire une altération et/ou une diminution de la macroautophagie dans les VG de rats.

c) Conclusion

Finalement, l'ensemble de ces résultats suggèrent que dans le modèle d'IC chez le rat, la macroautophagie serait perturbée dès 7 jours post-IDM. L'inefficacité de la macroautophagie en post-infarctus et la diminution de son activité au cours du temps pourraient contribuer à l'accumulation de protéines endommagées dans les VG de rats IC post-IDM en particulier à l'accumulation de la Desmine phosphorylée détectable à 2 mois post-IDM.

3. Étude de la CMA

a) Recherche de motifs pentapeptidiques KFERQ dans la séquence de la Desmine

Avant d'étudier la régulation de la CMA dans le modèle d'IC chez le rat, nous avons voulu déterminer si la Desmine pouvait être une de ses cibles potentielles. Pour ce faire, nous avons

recherché la présence de motifs pentapeptidiques KFERQ (ou une séquence proche) dans la séquence en acides aminés de la Desmine (Figure 61). Ce motif, obligatoirement bordé par une glutamine [Q], est composé d'un ou 2 acides aminés basiques (Lysine [K] ou Arginine [R]), d'un ou 2 acides aminés acides (acide aspartique [D] ou acide glutamique [E]), ainsi que d'un acide aminé hydrophobe (Phénylalanine [F], Isoleucine [I], Leucine [L] ou Valine [V]). L'association des différentes charges de ces acides aminés est indispensable à la reconnaissance de la protéine cible par la chaperonne Hsc70 et à la fixation de cette dernière. La présence de tels motifs dans la séquence de la Desmine est la condition requise et indispensable pour qu'elle soit prise en charge par la CMA.

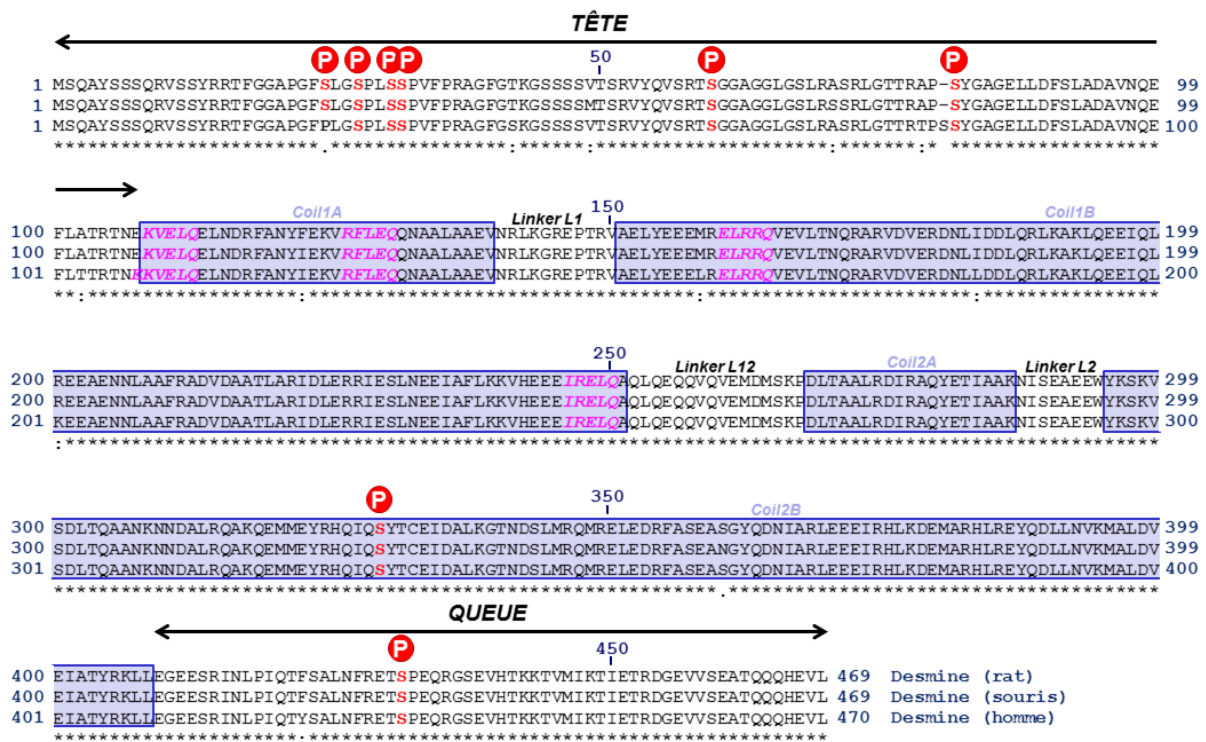


Figure 61. Localisation des motifs pentapeptidiques KFERQ dans la séquence en acides aminés de la Desmine de rat, de souris et d'homme. Les motifs pentapeptidiques sont représentés en rose et les Ser identifiées comme étant phosphorylées sont surmontées d'un cercle rouge portant la lettre P.

De manière intéressante, nous avons pu mettre en évidence, avec l'aide du Professeur Ana Maria Cuervo à New York, la présence de 4 motifs pentapeptidiques KFERQ dans la séquence en acides aminés de la Desmine de rat (Figure 61). La présence de tels motifs, qui par ailleurs sont conservés chez la souris et l'homme, suggère d'une part que la Desmine pourrait être une nouvelle cible potentielle de la CMA et d'autre part, que ce mécanisme protéolytique visant à la dégradation et/ou au recyclage de la Desmine pourrait être conservé entre espèces.

b) Mesure de l'expression des marqueurs de la CMA dans le modèle *in vivo*

Afin d'évaluer l'activité de la CMA dans le modèle d'IC chez le rat, nous avons mesuré l'expression de ses principaux marqueurs (LAMP2a, Hsc70 et Hsp90) dans les VG de rats à 7 jours, 1 et 2 mois post-IDM (Figure 62).

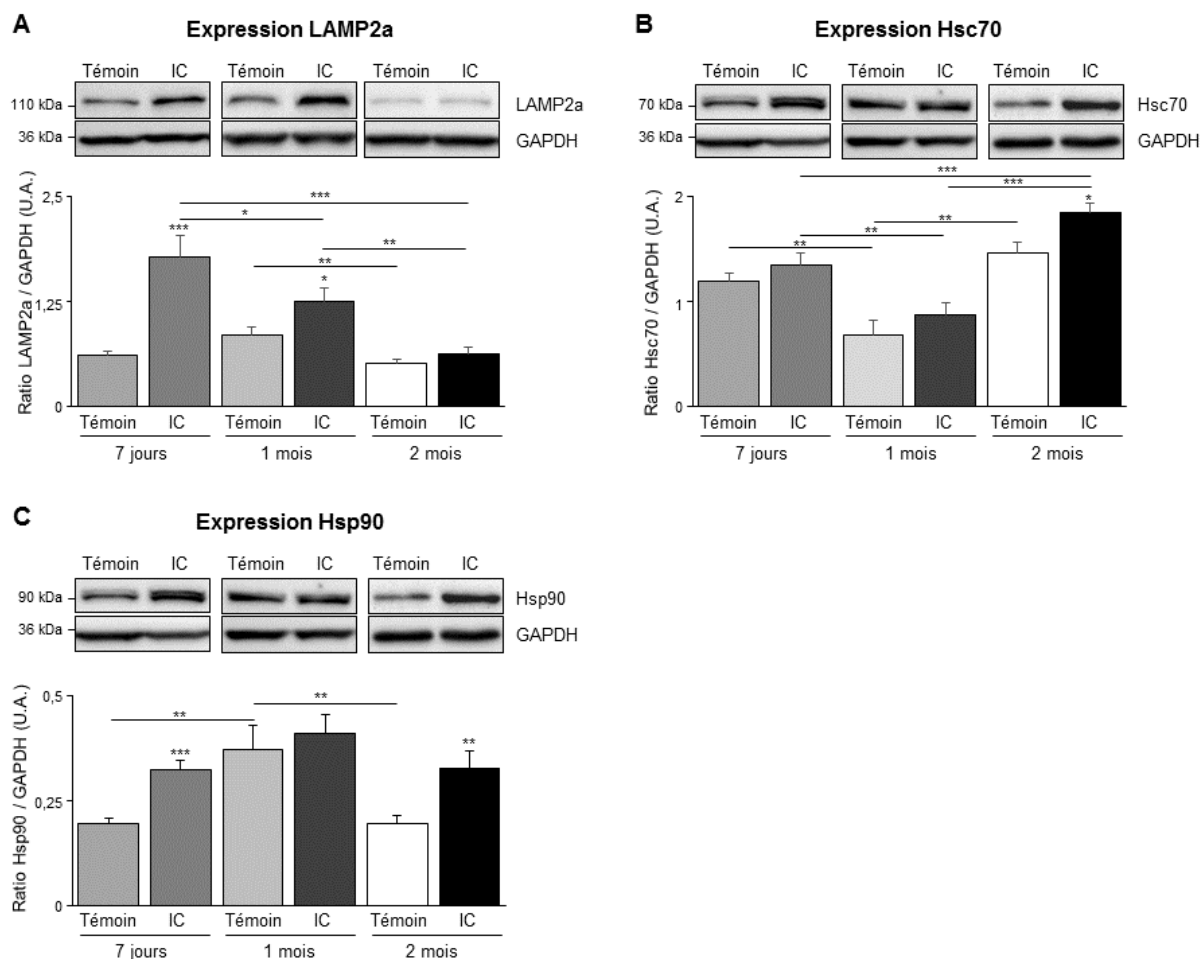


Figure 62. Mesure de l'expression des marqueurs de la CMA dans le modèle d'IC chez le rat. Quantification de l'expression du récepteur lysosomal LAMP2a (A) et des protéines chaperonnes Hsc70 (B) et Hsp90 (C) dans les VG de rats à 7 jours (témoins n=8 ; IC n=8), 1 mois (témoins n=9 ; IC n=9) et 2 mois post-IDM (témoins n=11 ; IC n=11) à 2 mois post-IDM. IC : insuffisant cardiaque ; U.A. : unités arbitraires ± SEM. Mann Whitney *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Nous avons pu montrer que tout au long du RVG le niveau d'expression de la protéine LAMP2a augmente significativement dans les VG de rats en post-IDM par rapport aux contrôles respectifs (Figure 62A). De manière intéressante, l'expression de LAMP2a semble diminuer de manière significative au cours du temps aussi bien dans les VG de rats témoins que dans les VG IC à 2 mois post-IDM par rapport aux animaux à 1 mois. Dans la littérature, il est décrit que le niveau d'expression de la protéine LAMP2a à la membrane des lysosomes corrèle positivement avec l'activité de la CMA (Kaushik *et al.*, 2009). Les résultats obtenus dans le modèle *in vivo*, bien que l'expression de LAMP2a n'est pas été quantifiée spécifiquement à la membrane des lysosomes, suggèrent que l'activité de la

CMA serait augmentée dans les VG de rat post-infarctus tout au long du RVG. Cette activation de la CMA serait massive puisque l'augmentation du niveau d'expression de LAMP2a est détectable dans les lysats protéiques totaux. Néanmoins, et en accord avec les données de la littérature, dans les VG de rat l'activité de la CMA décline avec le temps (Cuervo *et al.*, 2014).

Dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM, nous avons également mis en évidence une augmentation significative de l'expression de la protéine chaperonne Hsc70. En revanche, son expression reste inchangée entre les 2 groupes d'animaux à 7 jours et 1 mois post-IDM (Figure 62B). De manière surprenante, il semble que l'expression de Hsc70 diminue à 1 mois post-IDM aussi bien dans les VG de rats témoins que dans les VG de rats IC par rapport aux animaux à 7 jours puis augmente à nouveau à 2 mois post-IDM.

La quantification de l'expression de la protéine Hsp90 dans les VG de rats du modèle expérimental d'IC a permis de montrer une augmentation significative de Hsp90 dans les VG de rats à 7 jours et 2 mois post-IDM par rapport au contrôles (Figure 62C). Par ailleurs, et contrairement à ce qui a été observé pour Hsc70, dans les VG de rats témoins à 1 mois, l'expression de Hsp90 semble augmenter par rapport aux animaux à 7 jours puis diminuer à nouveau dans les VG de rats témoins à 2 mois.

Finalement, la quantification du niveau d'expression des marqueurs de la CMA suggère pour la première fois, que la CMA serait activée dans les VG de rats en réponse à l'infarctus et que son activité persisterait tout au long du RVG.

c) Conclusion

L'étude de la régulation de l'UPS, de la macroautophagie et de la CMA dans le modèle d'IC chez le rat, nous a permis de mettre en évidence que l'activité de l'UPS est inchangée au cours du RVG post-IDM. La macroautophagie, quant à elle, semble activée en réponse à l'IDM dans les VG de rats à 7 jours mais ne semble pas effective en raison de la mise en évidence d'une accumulation de la protéine adaptatrice p62. Par ailleurs, il semble que la macroautophagie décroît progressivement au cours du RVG pour devenir totalement inhibée dans les VG de rats à 2 mois post-IDM (diminution du flux autophagique ; présence accrue de mitochondries endommagées dans les VG de rats IC à 1 et 2 mois post-IDM). L'inefficacité de la macroautophagie dans les VG de rats à 7 jours post-infarctus ainsi que la diminution progressive de son activité au cours du RVG post-IDM pourrait être à l'origine de l'accumulation de protéines mal conformées, dont la Desmine phosphorylée en Ser, dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM. Dans ces conditions, la CMA serait activée pour tenter d'éliminer les protéines solubles endommagées portant un motif KFERQ, dont la Desmine phosphorylée soluble et ainsi éviter qu'elle ne s'agrège en structures insolubles et perturbe la contractilité cellulaire.

Dans la seconde partie de mon travail, nous avons donc cherché à valider l'implication de la CMA dans la prise en charge et la dégradation de la Desmine phosphorylée soluble par une approche *in vitro*.

B. Etude de l'implication de la CMA dans la clairance de la Desmine phosphorylée soluble

1. Mise au point de l'induction de la CMA par un sevrage en sérum

Afin de valider l'implication de la CMA dans la clairance de la Desmine phosphorylée, nous avons dans un premier temps tenté d'induire la CMA *in vitro* par sevrage en sérum des NCM pendant 15 et 30h (Cuervo *et al.*, 2000) (Figure 63).

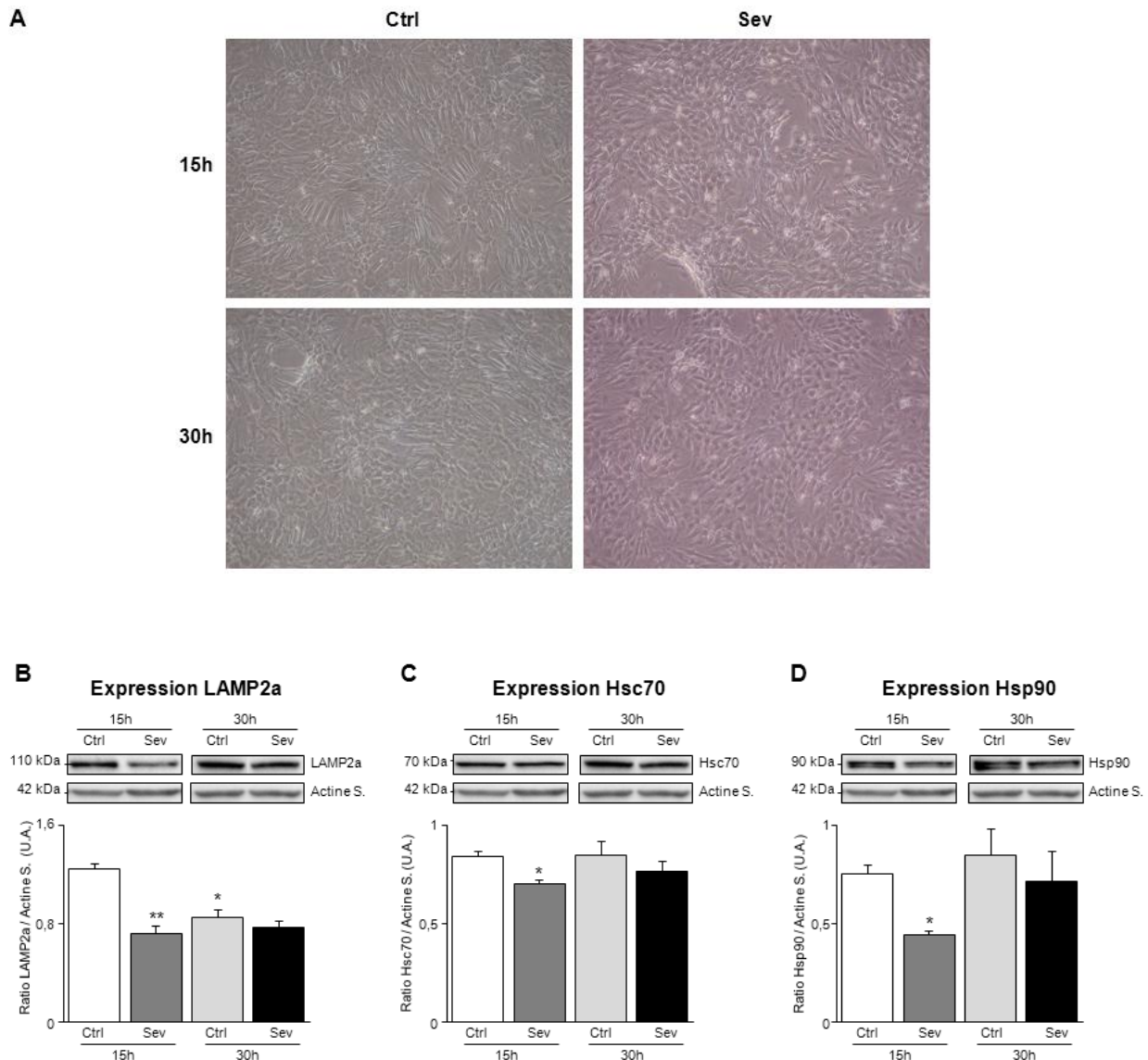


Figure 63. Effet d'un sevrage prolongé en sérum des NCM sur les marqueurs de la CMA. Analyse de la morphologie des NCM sevrées en sérum pendant 15 (panel du haut) et 30h (panel du bas) en microscopie à contraste de phase au grossissement x100 (A). Quantification de l'expression de LAMP2a (B), de Hsc70 (C) et de Hsp90 (D) dans les NCM contrôles (n=3) et les NCM sevrées en sérum pendant 15 et 30h (n=3). Actine S. : Actine sarcomérique ; Sev : sevrage en sérum ; U.A. : unités arbitraires ± SEM. Mann Whitney *p<0,05 ; **p<0,01.

De manière surprenante, et contrairement aux résultats attendus, un sevrage en sérum des cellules pendant 15h induit une diminution significative de l'expression de LAMP2a dans les NCM sevrées par rapport aux NCM contrôles (Figure 63B). En revanche, après 30h de sevrage, le niveau d'expression de LAMP2a mesuré dans la fraction protéique soluble, est inchangée entre les cellules contrôles et les cellules sevrées (Figure 63B). Dans la littérature, il a été montré que le niveau d'expression de LAMP2a, mesuré à la membrane des lysosomes, corrèle positivement avec l'activité de la CMA (Kaushik *et al.*, 2009). Néanmoins, la difficulté technique à isoler de manière spécifique les lysosomes compétents pour la CMA (Cuervo *et al.*, 1997 ; Kaushik *et al.*, 2009) nous a amené à quantifier son niveau d'expression dans la fraction protéique RIPA soluble. Nous avons pu mettre en évidence, que dans les NCM cultivées dans un milieu complétement en sérum, l'expression de LAMP2a décroît au cours du temps alors que dans un milieu sans sérum, elle reste inchangée (Figure 63B). Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait qu'en conditions de carence en nutriments tel qu'un sevrage en sérum, la dégradation de LAMP2a serait diminuée (Cuervo *et al.*, 2000). En ce qui concerne Hsc70 et Hsp90, leur expression diminue de manière significative dans les NCM sevrées en sérum pendant 15h par rapport aux contrôles alors qu'elle n'est pas modulée après 30h de sevrage en sérum (Figure 63C et 63D). Nous avons également pu montrer qu'au cours du temps, l'expression de Hsc70 et de Hsp90 est inchangé aussi bien dans les NCM cultivées dans un milieu complétement en sérum que dans les NCM cultivées dans un milieu sans sérum (Figure 63C et 63D).

L'ensemble de ces résultats mettent en évidence qu'un sevrage en sérum n'est pas suffisant pour induire la CMA dans les NCM. Dans la suite du projet, en s'appuyant sur les données de la littérature, nous avons développé un modèle *in vitro* d'induction de la CMA par traitement des NCM avec la geldanamycine (GA) (Finn *et al.*, 2005 ; Pedrozo *et al.*, 2013).

2. Induction de la CMA par la GA

a) Validation de l'activation de la CMA

Afin d'induire la CMA dans les NCM, nous avons incubé les cellules pendant 17h avec 2 et 5 μ M de GA qui est un antibiotique connu pour inhiber l'activité chaperonne de Hsp90 en se logeant dans sa poche de liaison à l'ATP (Kamal *et al.*, 2004). A l'issue de 17h de traitement, nous avons mesuré l'expression des marqueurs de la CMA (LAMP2a, Hsc70 et Hsp90) dans les NCM contrôles et les NCM traitées (Figure 64).

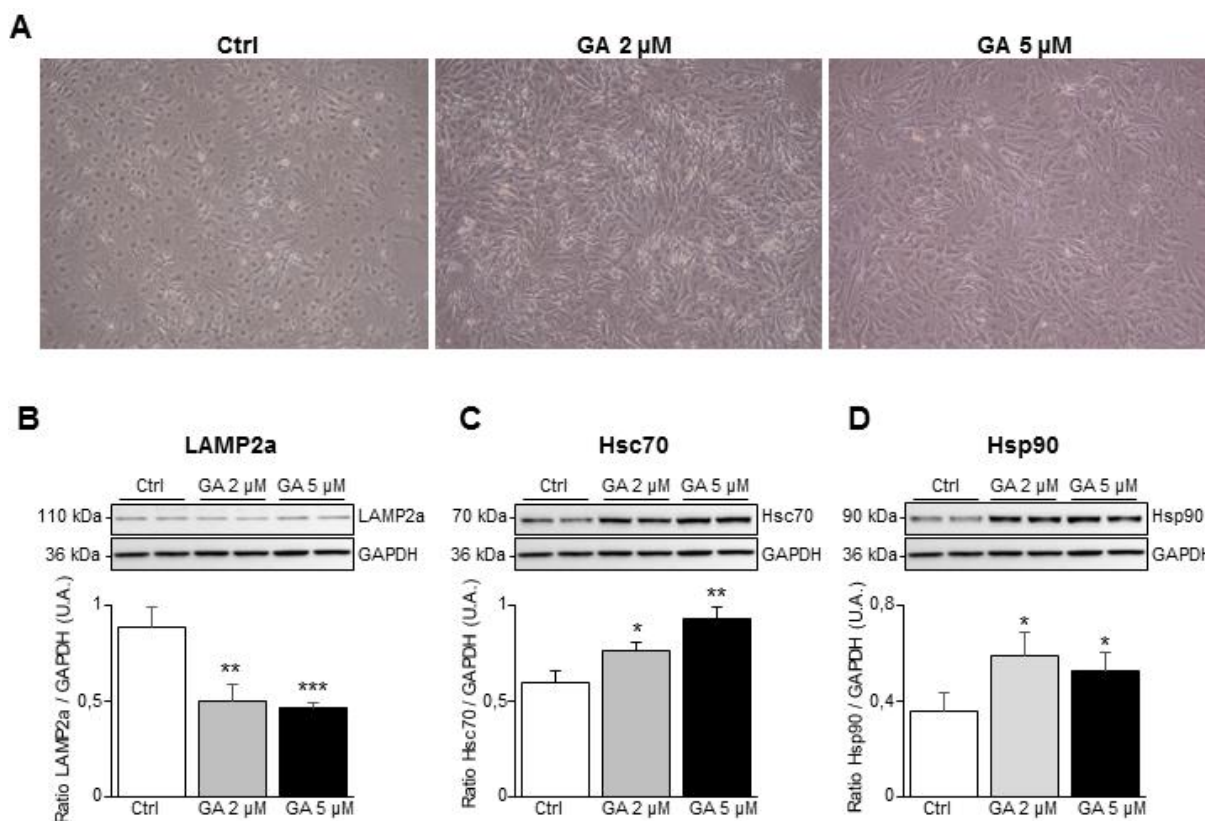


Figure 64. Impact d'un traitement des NCM avec la GA pendant 17h sur les marqueurs de la CMA. Analyse en microscopie à contraste de phase au grossissement x100 de la morphologie des NCM traitées pendant 17h avec 2 et 5 μ M de GA (A). Quantification de l'expression de LAMP2a (B), de Hsc70 (C) et de Hsp90 (D) dans les NCM traitées pendant 17h avec 2 μ M (n=10) et 5 μ M (n=10) de GA et les NCM contrôles (n=8). U.A. : unités arbitraires \pm SEM. Mann Whitney * p <0,05 ; ** p <0,01 ; *** p <0,001.

Nous avons pu mettre en évidence qu'un traitement des NCM pendant 17h avec 2 et 5 μ M de GA entraîne une diminution significative du niveau d'expression de LAMP2a (Figure 64B). En revanche, le niveau d'expression des autres marqueurs de la CMA, c'est à dire Hsc70 et Hsp90, est significativement augmenté dans les NCM traitées (Figure 64C et 64D).

Ces résultats suggèrent une activation de la CMA dans les NCM traitées avec la GA pendant 17h.

b) Impact de l'induction de la CMA sur la Desmine et sa protéine chaperonne l' α B crystalline

Par la suite, nous avons donc cherché à mettre en évidence, dans les cellules traitées avec la GA, une colocalisation de la Desmine avec le récepteur lysosomal LAMP2a impliqué dans la translocation des cibles de la CMA au lysosome (Figure 65).

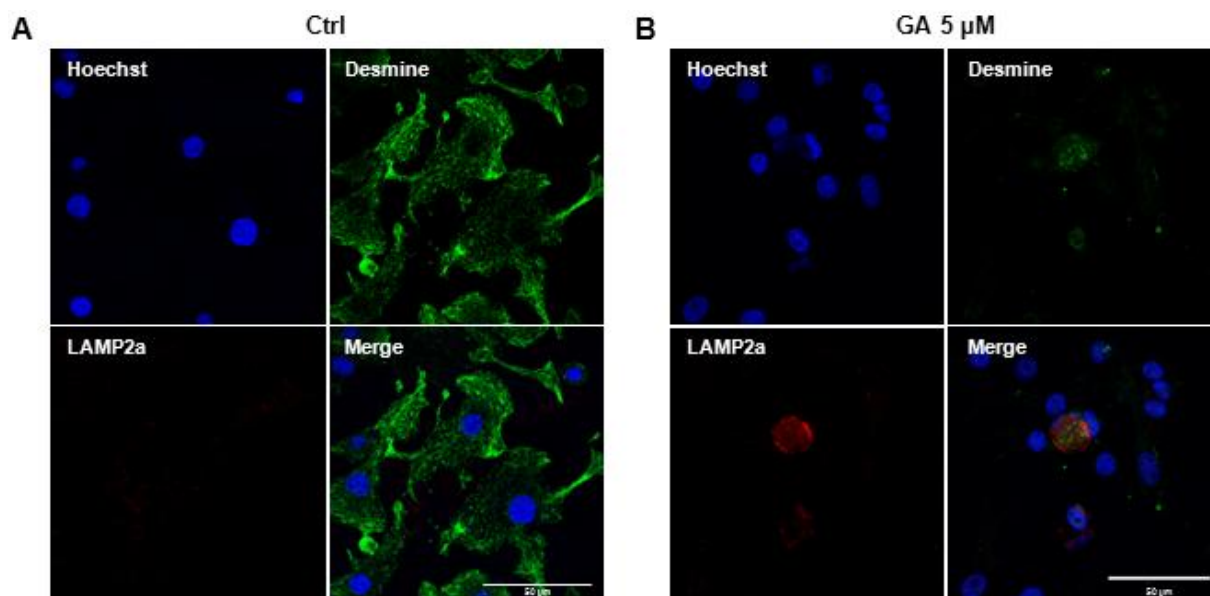


Figure 65. Recherche d'une colocalisation de la Desmine et de LAMP2a dans les NCM traitées avec la GA pendant 17h. Immunolocalisation de la Desmine (vert) et de LAMP2A (rouge) dans NCM non traitées (A) et traitées avec 5 μ M de GA pendant 17h (B).

L'Ac anti-LAMP2a utilisé pour notre étude est un anticorps commercial dirigé contre la partie C-terminale de la protéine LAMP2a qui est la seule partie permettant de discriminer l'isoforme a de la protéine LAMP2 des autres isoformes (b et c) (Cuervo *et al.*, 2000). De manière intéressante, dans les NCM non traitées avec la GA, le marquage LAMP2a est très faible voire inexistant (Figure 65A). En revanche, dans les NCM traitées avec la GA, au sein desquelles la CMA semble activée, le marquage péri-nucléaire LAMP2a est nettement plus intense suggérant une augmentation de l'expression de la protéine LAMP2a à la membrane des lysosomes (Figure 65B). Ces résultats valident l'induction de la CMA en réponse à la GA dans les NCM.

Nous avons montré que dans les NCM au sein desquelles la CMA est activée, la structure des filaments de Desmine est complètement altérée (Figure 65B). De plus, une partie de la Desmine semble internalisée dans des vésicules marquées positivement pour la protéine LAMP2a. Ces résultats suggèrent une relocalisation lysosomale d'une partie de la Desmine suite à l'induction de la CMA.

Dans la suite du projet, nous avons mesuré l'impact de l'induction de la CMA par la GA dans les NCM sur le niveau de Desmine insoluble et soluble, sur le profil de phosphorylation de la Desmine soluble mais aussi sur l'expression de l' α B cristalline, la protéine chaperonne de la Desmine (Figure 66).

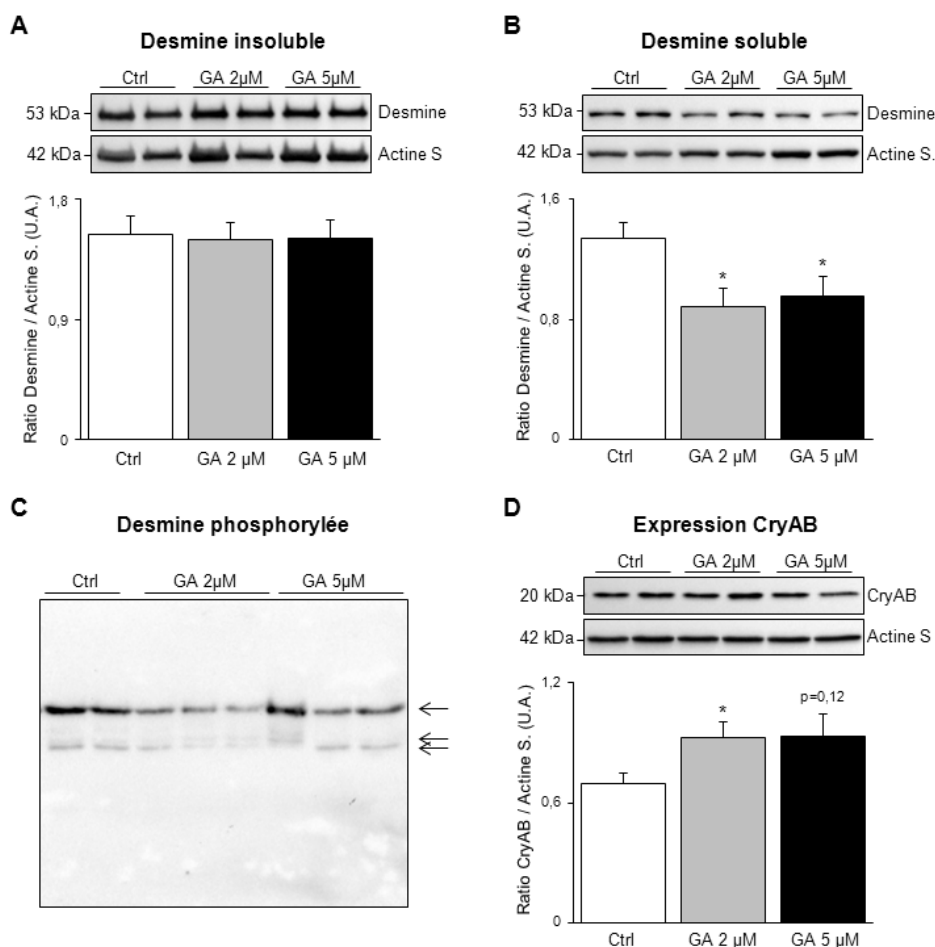


Figure 66. Impact de l'induction pharmacologique de la CMA par la GA sur la Desmine et sa chaperonne l' α B cristalline. Quantification du niveau d'expression de la Desmine insoluble (A) et soluble (B), visualisation du profil de phosphorylation de la Desmine soluble (C) et quantification de l'expression de l' α B cristalline (D) dans les NCM traitées pendant 17h avec 2 μ M (n=10) et 5 μ M (n=10) de GA et les NCM contrôles (n=8). Actine S. : Actine sarcomérique ; α B cristalline : CryAB ; U.A. = unités arbitraires \pm SEM. Mann Whitney *p<0,05.

De manière intéressante, nous avons pu montrer que l'induction de la CMA dans les NCM en réponse à la GA n'a pas d'impact sur le niveau d'expression de la Desmine insoluble (Figure 66A). En revanche, elle entraîne une diminution significative du niveau d'expression de la Desmine soluble (Figure 66B) et semble moduler son profil de phosphorylation en particulier lors d'une incubation avec 2 μ M de GA (Figure 66C). Nous avons également pu montrer que, dans les cellules traitées avec 2 μ M de GA, l'expression de la protéine chaperonne de la Desmine, l' α B-cristalline, augmente de manière significative (Figure 66C).

Finalement, dans les NCM traitées avec la GA, l'activation de la CMA concomitante avec l'altération du profil de phosphorylation de la Desmine soluble ainsi que la diminution de sa forme soluble suggèrent que la CMA pourrait être impliquée dans la prise en charge et la dégradation de la Desmine phosphorylée et donc soluble. L'augmentation du niveau d'expression d' α B-cristalline, mise en évidence lors de l'induction pharmacologique de la CMA, pourrait survenir dans le but de préserver et stabiliser la structure des filaments de Desmine et de la protéger de la dégradation. En effet, l' α B-cristalline est une petite protéine de choc thermique qui permet de maintenir l'intégrité du réseau de

filaments intermédiaires par stabilisation de la Desmine (Bakthisaran *et al.*, 2015). L'αB-crystalline, en se liant aux filaments d'actine et de Desmine lors d'un stress cellulaire tel que l'ischémie ou l'hyperthermie, semble également prévenir la formation d'agrégats de Desmine et d'actine (Bennardini *et al.*, 1992 ; Wang *et al.*, 2002 ; Bakthisaran *et al.*, 2015).

L'ensemble des résultats obtenu dans le modèle *in vitro* d'induction pharmacologique de la CMA par la GA soutiennent l'hypothèse d'une implication de la CMA dans la clairance de la Desmine et plus particulièrement de la Desmine phosphorylée et soluble. Néanmoins, la mise en évidence de l'existence d'un dialogue entre les différents systèmes protéolytiques (Park *et al.*, 2013) depuis quelques années nous a incité à mesurer l'impact de l'induction pharmacologique de la CMA sur l'UPS et la macroautophagie.

c) Impact de l'activation pharmacologique de la CMA sur l'UPS et la macroautophagie

Afin d'évaluer l'impact de l'induction de la CMA sur l'activité du protéasome et de la macroautophagie, nous avons mesuré dans les NCM traitées ou non avec la GA, le niveau d'ubiquitinylation global des protéines ainsi que le niveau d'expression des différents marqueurs de la macroautophagie (LC3, p62 et Beclin-1) (Figure 67).

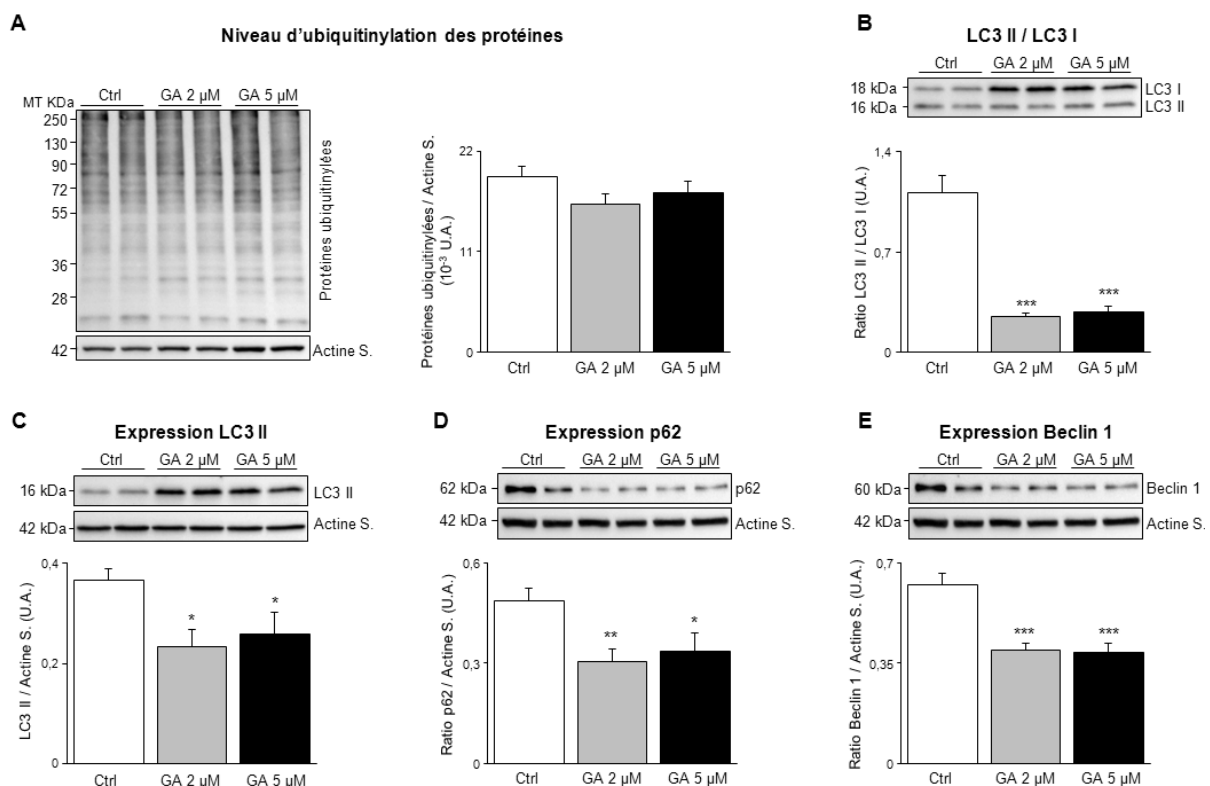


Figure 67. Impact de l'activation de la CMA sur l'UPS et la macroautophagie. Quantification du niveau d'ubiquitinylation des protéines (A), du ratio LC3 II / LC3 I (B) ainsi que de l'expression des protéines LC3 II (C), p62 (D) et de Beclin 1 (E) dans les NCM traitées pendant 17h avec 2 (n=10) et 5 μM (n=10) de GA et les NCM contrôles (n=8). Actine S. : Actine sarcomérique ; U.A. = unités arbitraires ± SEM. Mann Whitney *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Nous avons mis en évidence qu'un traitement des NCM pendant 17h avec 2 et 5 μM de GA n'a pas d'impact sur le niveau global d'ubiquitylation des protéines (Figure 67A). En revanche, un tel traitement entraîne une diminution significative du ratio LC3 II / LC3 I (Figure 67B) mais aussi du niveau d'expression du LC3 II (Figure 67C), de p62 (Figure 67D) et de Beclin 1 (Figure 67E) dans les cellules traitées par rapport aux cellules contrôles.

L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'une induction pharmacologique de la CMA par la GA, n'a pas d'impact sur l'activité de l'UPS mais en revanche diminue significativement l'activité de la macroautophagie.

d) Conclusion

Nous avons montré qu'un traitement des NCM pendant 17h avec 2 et 5 μM de GA entraîne à la fois, une activation de la CMA et une inhibition de la macroautophagie mais n'a pas d'impact sur l'activité du protéasome. Dans ces conditions, nous avons mis en évidence une modulation du profil de phosphorylation de la Desmine soluble et de son niveau d'expression sans modulation du niveau d'expression de la Desmine insoluble. Ces résultats suggèrent que la Desmine phosphorylée et donc soluble pourrait être dégradée par la CMA. Ces résultats ont été confortés par la mise en évidence d'une altération de la structure des filaments de Desmine ainsi que d'une localisation lysosomale de celle-ci en réponse à l'induction de la CMA par la GA. L'ensemble de ces données soutiennent l'hypothèse d'une implication de la CMA dans la clairance de la Desmine et plus particulièrement de la Desmine dépolymérisée et solubilisée suite à son hyperphosphorylation. Dans ces conditions, l'expression de la chaperonne de la Desmine, l' αB cristalline, pourrait être augmentée dans le but de protéger la Desmine de la dégradation mais aussi de la stabiliser au niveau des sarcomères afin de préserver leur structure (Bakthisaran *et al.*, 2015).

3. Développement d'un modèle d'induction de la CMA par inhibition du protéasome

L'induction de la CMA par la GA n'étant pas un modèle parfait puisque l'efficacité de ce traitement semble être cellule dépendant mais surtout biphasique (activation précoce puis inhibition de la CMA) (Patel *et al.*, 2015). Nous avons voulu, dans la suite du projet, valider l'implication de la CMA dans la clairance de la Desmine phosphorylée dans un autre modèle d'induction de la CMA *in vitro*.

L'existence d'un dialogue entre l'UPS, la macroautophagie et la CMA (Park *et al.*, 2013) nous a permis de développer un second modèle d'induction de la CMA par inhibition prolongée du protéasome. Pour ce faire, nous avons traité les NCM pendant 18h avec un inhibiteur pharmacologique du protéasome, le MG132 qui inhibe les activités peptidases multiples des sous-unités β du protéasome en particulier son activité chymotrypsine-like.

a) Validation de l'inhibition du protéasome

Afin de valider l'inhibition du protéasome dans les cellules traitées avec le MG132 pendant 18h, nous avons mesuré le niveau global d'ubiquitinylation des protéines (Figure 68).

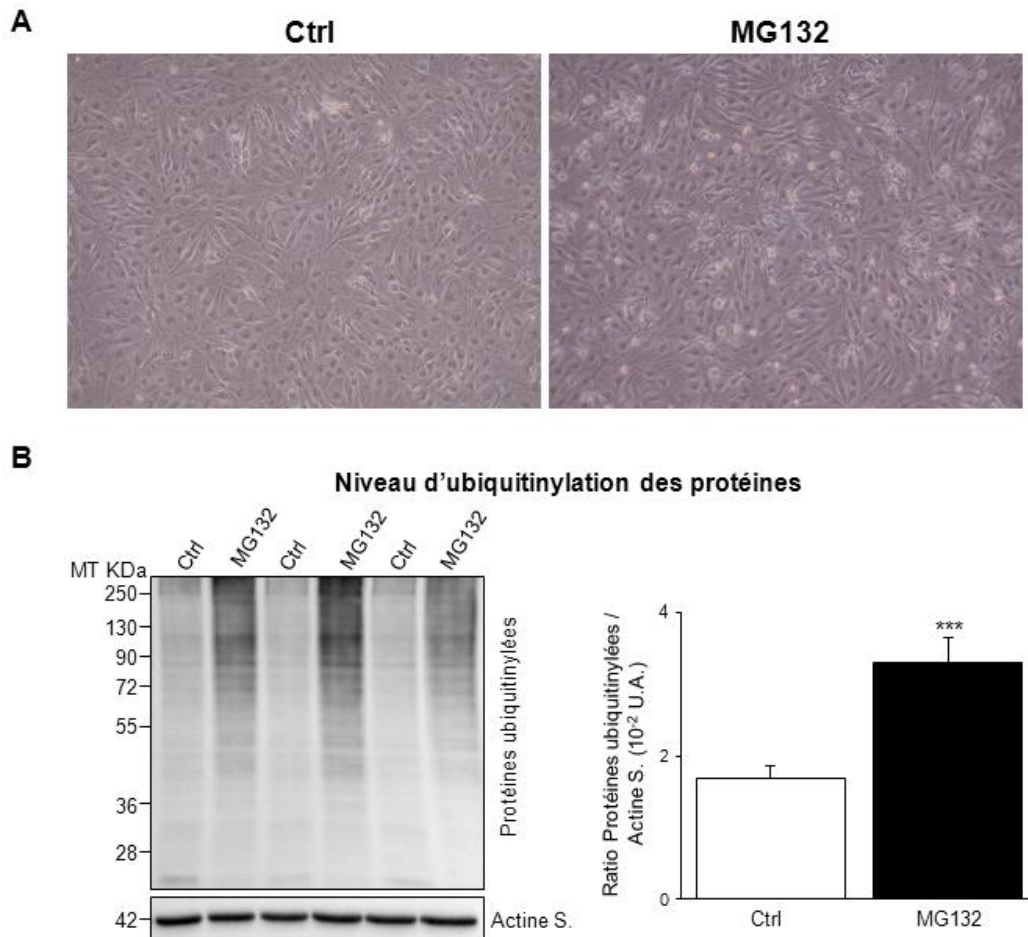


Figure 68. Validation de l'inhibition du protéasome dans les NCM traitées avec le MG132. Analyse morphologique des NCM traitées pendant 18h avec 10 μ M de MG132 en microscopie à contraste de phase au grossissement x100 (A). Analyse en microscopie à contraste de phase des NCM traitées avec 10 μ M de MG132 pendant 18h (A). Quantification du niveau d'ubiquitinylation des protéines dans les NCM traitées pendant 18h avec 10 μ M de MG132 (n=13) et les NCM contrôles (n=13) (B). Actine S. : Actine sarcomérique ; U.A. : unités arbitraires \pm SEM. Mann Whitney ***p<0,001.

Nous avons pu montrer qu'en réponse au MG132, le niveau global d'ubiquitinylation des protéines augmente d'environ 2 fois dans les NCM traitées par rapport aux NCM contrôles (Figure 68B). Ces résultats valident l'inhibition du protéasome dans les NCM traitées pendant 18h avec le MG132.

b) Impact de l'inhibition du protéasome sur la macroautophagie et sur la CMA

Par la suite, nous avons évalué l'impact de l'inhibition du protéasome sur la macroautophagie par mesure de l'expression de ses marqueurs (LC3 II, p62 et Beclin 1) (Figure 69).

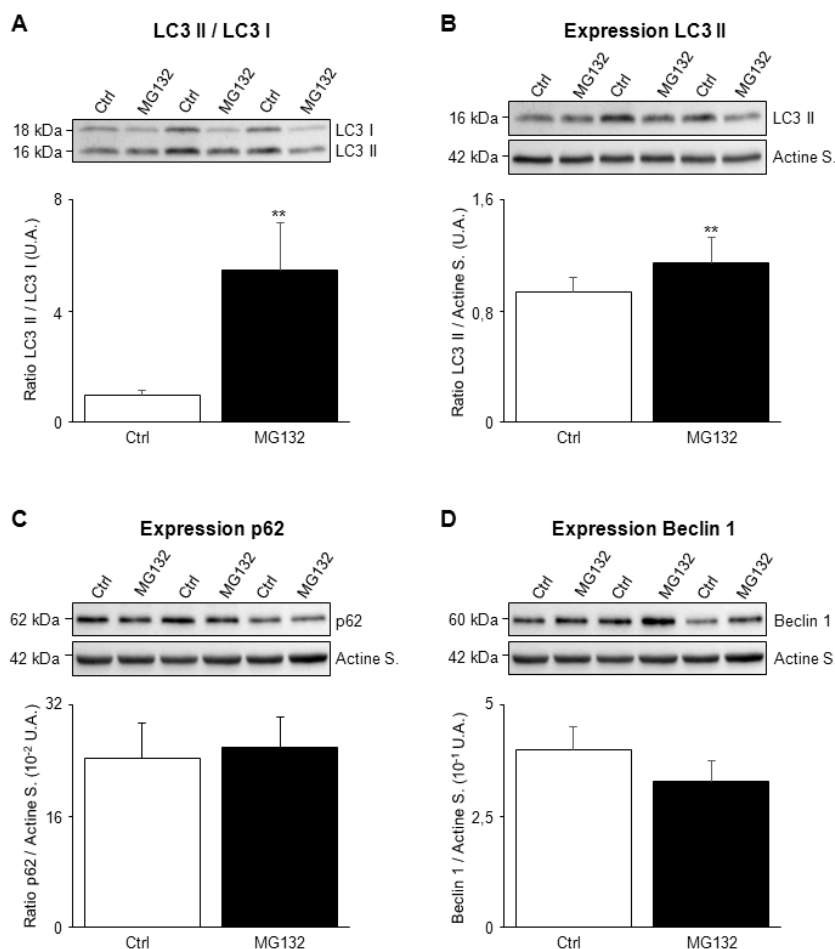


Figure 69. Impact de l'inhibition du protéasome sur la macroautophagie. Quantification du ratio LC3 II / LC3 I (A), de l'expression du LC3 II (B), de p62 (C) et de Beclin 1 (D) dans les NCM traitées pendant 18h avec 10 µM de MG132 (n=13) et les NCM contrôles (n=12). Actine S. : Actine sarcomérique ; U.A. : unités arbitraires ± SEM. Mann Whitney ***p<0,001.

Nous avons pu mettre en évidence qu'un traitement des NCM pendant 18h avec le MG132 entraîne une augmentation significative du ratio LC3 II / LC3 I (Figure 69A) et du niveau d'expression du LC3 II (Figure 69B) suggérant une activation de la macroautophagie. En revanche, ce traitement ne module ni l'expression de Beclin-1 (Figure 69C) ni celle de p62 (Figure 69D). La protéine p62 est connue pour être dégradée à la fois par le protéasome et par la macroautophagie. L'activation de la macroautophagie en réponse à l'inhibition du protéasome pourrait permettre de maintenir un niveau de p62 constant. (Zheng *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'induction de la macroautophagie dans ce contexte pourrait s'opérer de manière Beclin 1 indépendante puisque son expression n'est pas modulée entre les NCM contrôles et traitées (Scarlatti *et al.*, 2008).

L'ensemble de ces résultats, en accord avec les données de la littérature, suggèrent que l'inhibition du protéasome entraîne une activation de la macroautophagie (Park *et al.*, 2013).

Par la suite, nous avons mesuré l'impact de l'inhibition du protéasome dans les NCM sur la CMA par mesure de l'expression de LAMP2a, Hsc70 et Hsp90 (Figure 70).

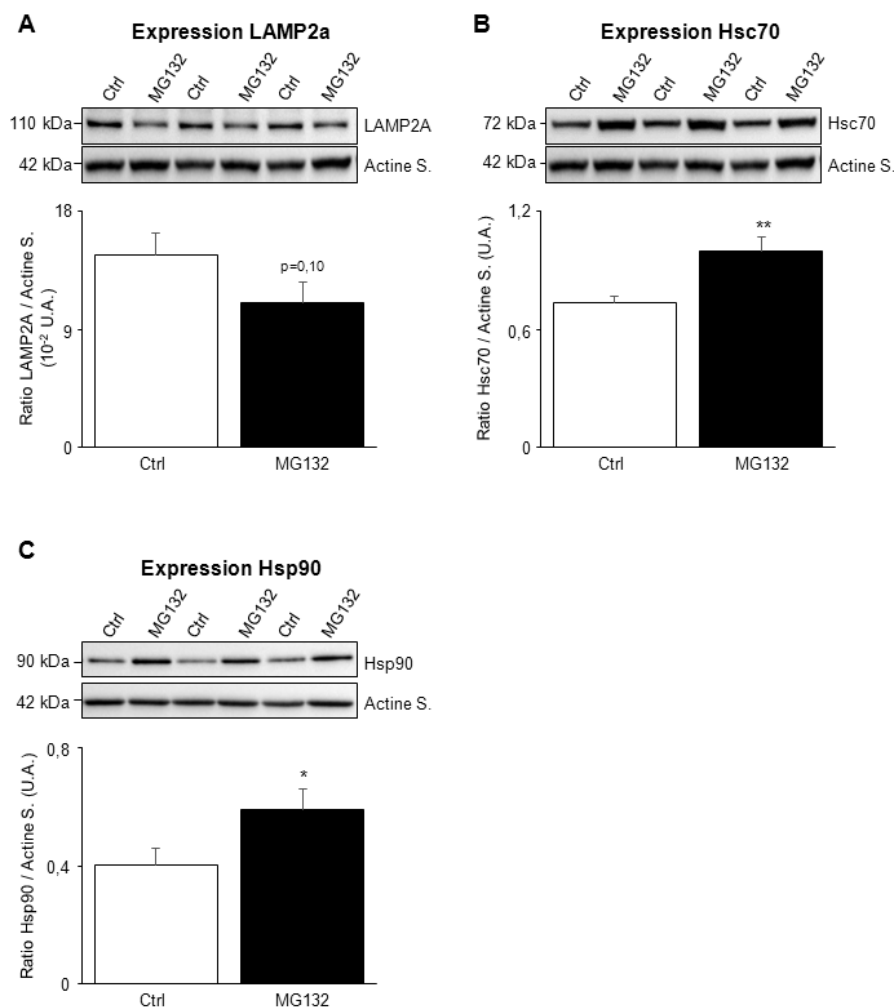


Figure 70. Impact de l'inhibition du protéasome sur la CMA. Quantification de l'expression de LAMP2a (A), de Hsc70 (B) et de Hsp90 (C) dans les NCM traitées pendant 18h avec 10 μ M de MG132 (n=13) et les NCM contrôles (n=12). Actine S. : Actine sarcomérique ; U.A. : unités arbitraires \pm SEM. Mann Whitney ***p<0,001.

De manière similaire à ce qui a été observé dans les NCM traitées avec la GA, le niveau d'expression de Hsc70 (Figure 70B) et de Hsp90 (Figure 70C) augmente de manière significative et le niveau d'expression de LAMP2a tend à diminuer dans les cellules traitées avec l'inhibiteur du protéasome par rapport aux cellules contrôles (Figure 70A). De la même manière que pour les cellules traitées avec la GA, le niveau d'expression de LAMP2a a été mesuré dans la fraction protéique soluble et par conséquent ne reflète pas l'activité de la CMA.

Ces résultats mettent en évidence qu'une inhibition prolongée du protéasome, en l'occurrence 18h dans nos conditions expérimentales, en plus d'induire la macroautophagie entraîne une activation de la CMA.

c) Impact de l'inhibition du protéasome sur la Desmine

Dans ce modèle *in vitro* où la CMA et la macroautophagie sont activées, nous avons analysé à la fois le comportement de la Desmine *in vitro* par immunofluorescence (Figure 71) et le niveau d'expression de la Desmine insoluble et soluble, le profil de phosphorylation de la Desmine mais aussi l'expression de l' α B-crystalline (Figure 72).

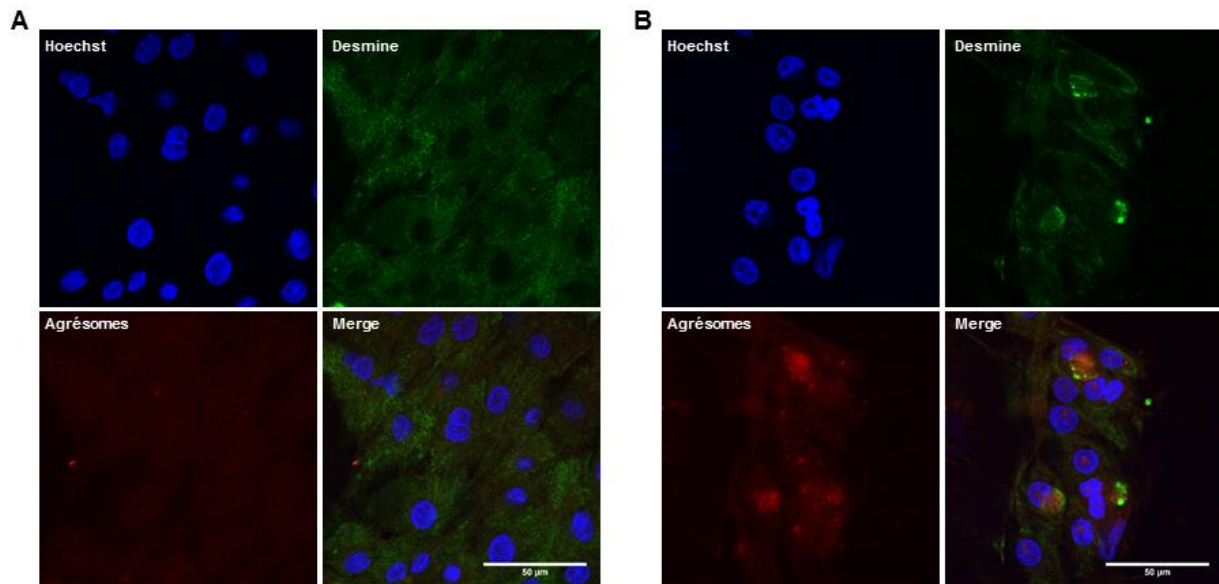


Figure 71. Impact de l'inhibition du protéasome sur la structure de la Desmine. Immunolocalisation de la Desmine (vert) et des agrésomes (rouge) dans les NCM contrôles (A) et les NCM traitées (B) pendant 18h avec 10 μ M de MG132.

L'inhibition du protéasome provoque une accumulation cytosolique de protéines sous forme d'agrésome (Figure 71B). Ces agrésomes perturbent l'architecture cellulaire puisque le marquage Desmine n'est plus sous formes de stries, comme dans les cellules contrôles (Figure 71A). De manière intéressante, ces agrésomes sont pour la plupart marqués positivement pour la Desmine (Figure 71B) suggérant qu'en temps normal, une partie de la Desmine est dégradée par le protéasome comme l'ont montré Cohen *et al.* (2012).

Dans les NCM traitées avec le MG132, nous avons montré, comme lors de l'induction de la CMA par la GA, que le niveau d'expression de la Desmine insoluble n'est pas modulé dans les NCM traitées avec le MG132 (Figure 72A) alors que le niveau de Desmine soluble diminue de manière significative (Figure 72B) et que son profil de phosphorylation est considérablement modulé. En effet, le niveau de phosphorylation de la Desmine soluble semble diminuer dans les cellules traitées avec le MG132 (Figure 72C).

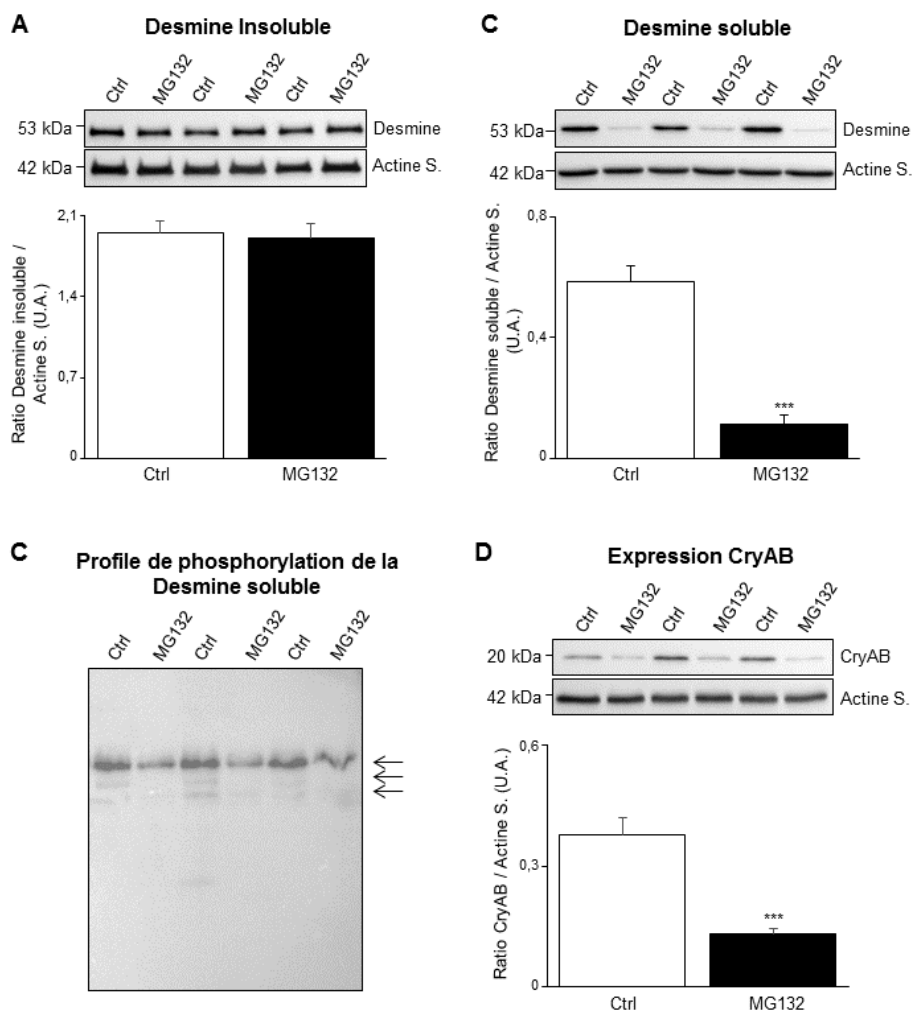


Figure 72. Impact de l'inhibition du protéasome sur la Desmine et sa chaperonne l' α B cristalline. Quantification du niveau d'expression de la Desmine insoluble (A) et soluble (B), visualisation du profil de phosphorylation de la Desmine soluble (C) et quantification de l'expression de l' α B cristalline (D) dans les NCM contrôles (n=13) et les NCM traitées pendant 18h avec 10 μ M de MG132 (n=13). Actine S. : Actine sarcomérique ; CryAB : α B cristalline ; U.A. : unités arbitraires \pm SEM. Mann Whitney *** $p < 0,001$.

Concernant la chaperonne de la Desmine, nous avons mis en évidence que contrairement à ce qui a été observé dans les NCM traitées avec la GA, l'expression de l' α B cristalline diminue d'environ 3 fois dans les cellules traitées avec le MG132 (Figure 72D). Nous avons par ailleurs pu montrer que dans les cellules traitées avec le MG132 l'interaction entre la Desmine et l' α B cristalline est totalement abolie (Figure 73).

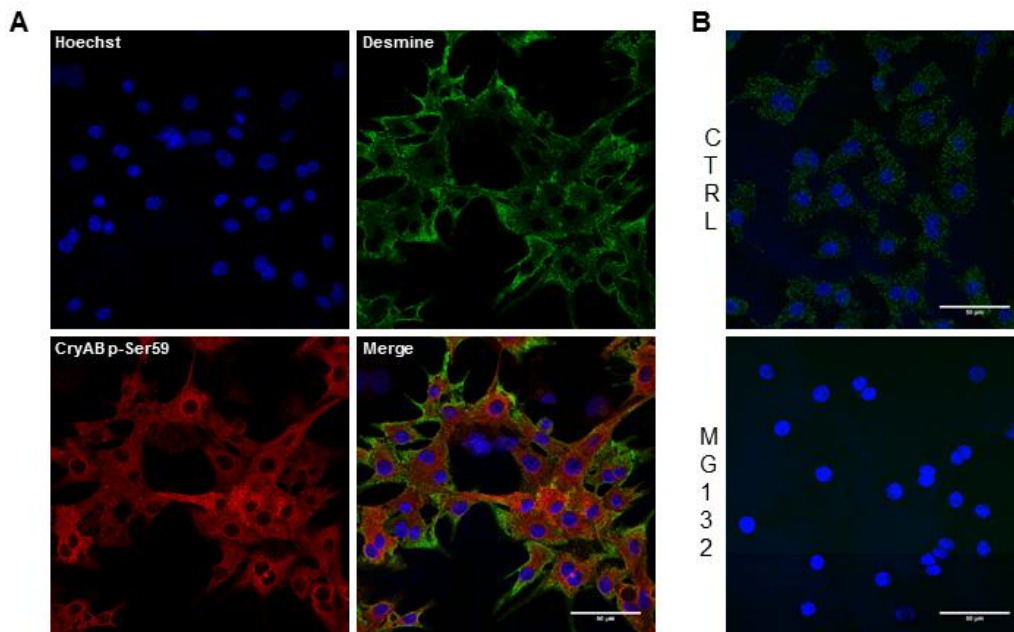


Figure 73. Immunolocalisation de la Desmine et de l' α B cristalline dans les NCM traitées avec le MG132. Immunolocalisation de la Desmine (vert) et de l' α B cristalline phosphorylée en Ser59 (rouge) dans les NCM contrôles (A). Mise en évidence d'une interaction entre la Desmine et sa chaperonne l' α B cristalline phosphorylée en Ser59 par PLA dans les NCM contrôles (B) et les NCM traitées avec 10 μ M de MG132 pendant 18h (C).

Alors que dans les NCM contrôles, conformément aux données de la littérature, la Desmine colocalise avec l' α B cristalline phosphorylée en Ser59 (Figure 73A) (Diguët *et al.*, 2011), lors du traitement des NCM avec le MG132, l'interaction entre la Desmine et sa chaperonne semble totalement abolie (Figure 73B). Cette abolition d'interaction pourrait résulter de la diminution du niveau d'expression de l' α B cristalline dans ces conditions (Figure 72D) pouvant résulter d'une activation de la macroautophagie (Zhang *et al.*, 2010).

Néanmoins, l'ensemble de ces données suggèrent une nouvelle fois que la Desmine phosphorylée et donc soluble pourrait être prise en charge par les protéines de la CMA qui est activée en réponse à l'inhibition du protéasome, afin d'être dégradée.

Pour étayer cette hypothèse, nous avons cherché à mettre en évidence une colocalisation de la Desmine avec la chaperonne Hsc70 et le récepteur lysosomal LAMP2a dans les NCM traitées avec le MG132 (Figure 74).

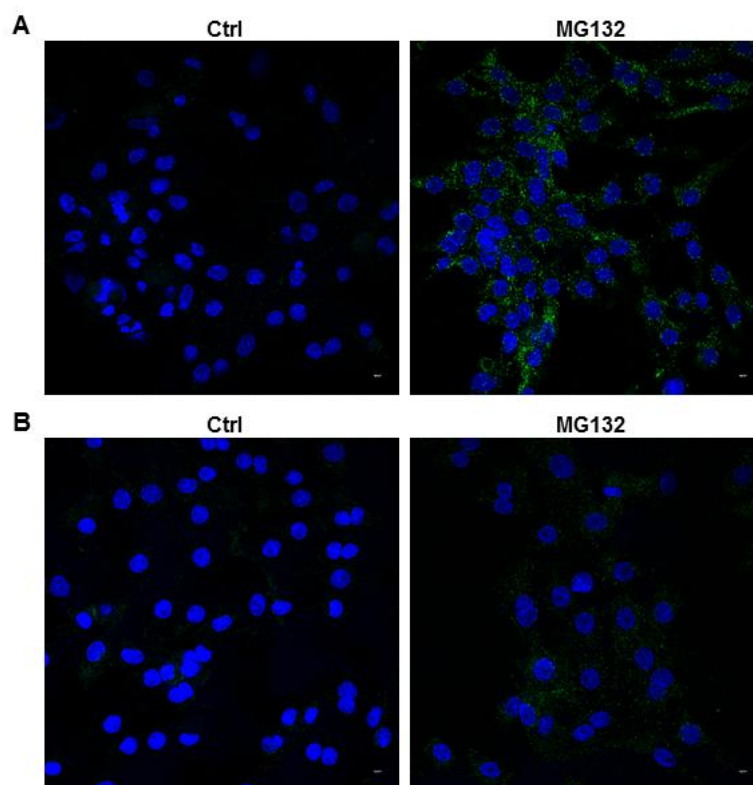


Figure 74. Recherche d'une colocalisation entre la Desmine et les acteurs de la CMA dans les NCM traitées avec le MG132. Mise en évidence par PLA d'une colocalisation entre la Desmine et LAMP2a (A) ainsi qu'entre la Desmine et Hsc70 (B) dans les NCM contrôles (panel de gauche) et les NCM traitées avec 10 μ M de MG132 pendant 18h (panel de droite).

De manière intéressante, nous avons pu montrer par PLA que la Desmine colocalise avec les acteurs majeurs de la CMA (LAMP2a et Hsc70) aussi bien dans les NCM contrôles que les NCM traitées. Néanmoins, il semble que cette colocalisation soit accentuée lors d'une activation de la CMA en réponse à l'inhibition du protéasome ce qui conforte l'hypothèse d'une implication de la CMA dans la clairance de la Desmine phosphorylée qui est la Desmine soluble.

d) Conclusion

Finalement, nous avons développé 2 modèles *in vitro* d'induction de la CMA permettant d'étayer notre hypothèse d'une implication de la CMA dans la clairance de la Desmine phosphorylée et soluble. Néanmoins, ces 2 modèles semblent faire intervenir des voies de signalisation et des mécanismes différents dans le sens où l'induction pharmacologique de la CMA par la GA entraîne une diminution de la macroautophagie et une augmentation de l'expression de l' α B cristalline alors que l'induction de la CMA en réponse à l'inhibition du protéasome (MG132) a un effet contraire (augmentation de la macroautophagie et diminution de l'expression de l' α B cristalline). Par ailleurs, l'existence d'une relation inverse entre le niveau d' α B cristalline et l'activité de la macroautophagie suggère que ce mécanisme protéolytique pourrait être impliqué dans la dégradation de l' α B cristalline, plus particulièrement en cas d'inhibition du protéasome (Zhang *et al.*, 2010).

Dans le modèle *in vitro* d'induction de la CMA en réponse à l'inhibition du protéasome, l'activation simultanée de la macroautophagie soulève la question de son implication dans la clairance de la Desmine phosphorylée et soluble. Pour répondre à cette question, nous avons, dans ce modèle, évalué l'impact d'une inhibition de la macroautophagie sur le niveau de Desmine insoluble et soluble ainsi que sur le profil de phosphorylation de la Desmine.

4. Impact de l'inhibition du protéasome et de la macroautophagie sur la CMA et la Desmine

a) Validation de l'inhibition du protéasome et de la macroautophagie

L'inhibition de la macroautophagie a été réalisée par prétraitement des NCM pendant 1h avec 10 mM de 3MA. Les cellules ont ensuite été co-traitées pendant 18h avec 10 μ M de MG132 et 10 mM de 3MA. Nous avons dans un premier temps validé l'efficacité du traitement par mesure de l'expression des marqueurs de la macroautophagie et l'impact sur le protéasome par mesure du niveau global d'ubiquitylation des protéines (Figure 75).

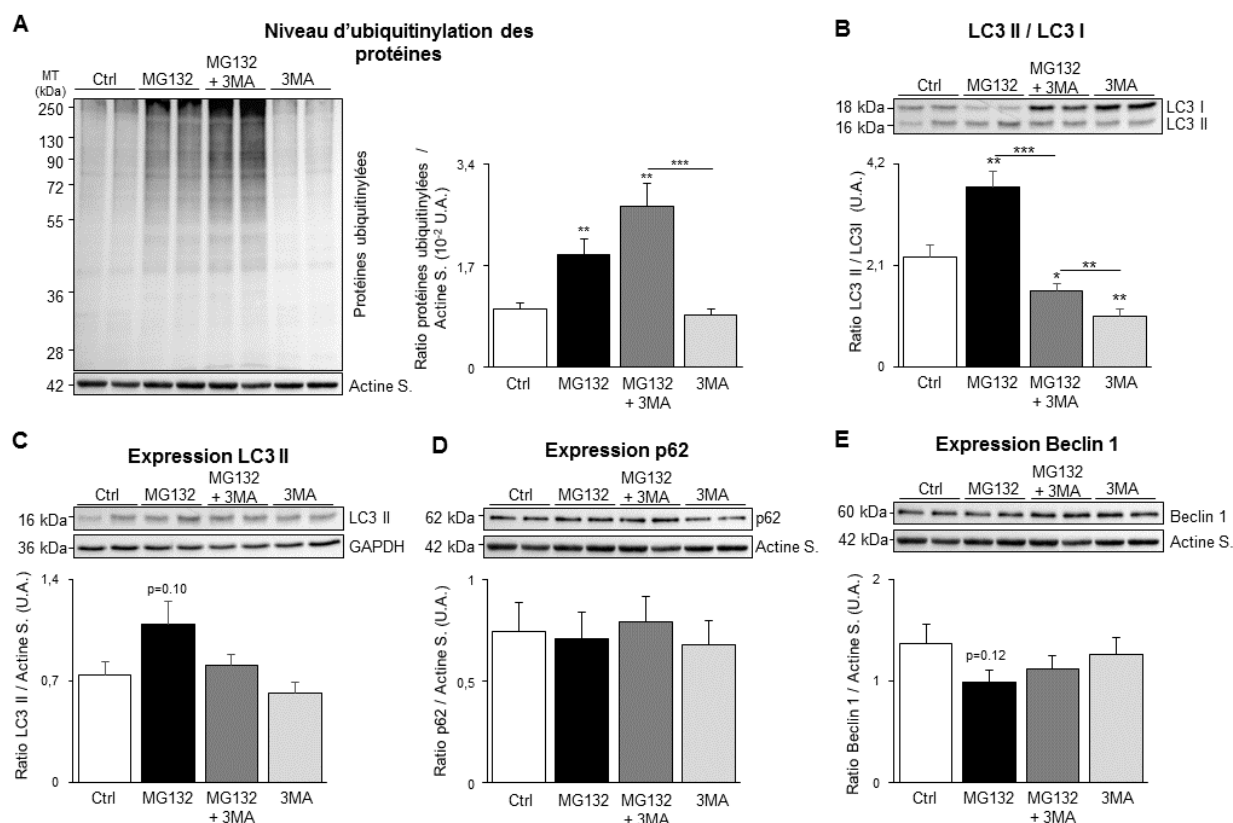


Figure 75. Evaluation de l'activité du protéasome et de la macroautophagie dans les NCM co-traitées avec la 3MA et le MG132. Quantification du niveau d'ubiquitylation des protéines (A), du ratio LC3 II / LC3 I (B), de l'expression du LC3 II (C), de p62 (D) et de Beclin 1 (E) dans les NCM contrôles (n=12), traitées avec le MG132 (n=12), la 3MA (n=12) et les NCM co-traitées avec la 3MA et de MG132 pendant 18h (n=12). Actine S. : Actine sarcomérique ; U.A. : unités arbitraires \pm SEM. Mann Whitney **p<0,01 ; ***p<0,001.

L'inhibition du protéasome entraîne, comme nous l'avons montré précédemment, une augmentation significative du niveau d'ubiquitinylation des protéines (Figure 75A) ce qui traduit l'efficacité de l'inhibition du protéasome. Le co-traitement des NCM avec la 3MA et le MG132 augmente de manière significative le niveau d'ubiquitinylation des protéines contrairement au traitement des NCM avec la 3MA seule (Figure 75A). Nous avons mis en évidence que ce co-traitement abolit l'augmentation significative du ratio LC3 II/LC3 I induit par le MG132 (Figure 75B) et tend à diminuer l'augmentation du LC3 II (Figure 75C). En revanche, il n'a aucun effet sur les autres marqueurs de la macroautophagie (Figure 75D-E). Ces résultats, en particulier la diminution du ratio LC3II/LC3 I dans les NCM co-traitées avec la 3MA et le MG13, reflétant le flux de la macroautophagie, valident l'inhibition de cette voie de dégradation dans ces conditions.

b) Impact sur la CMA

Dans les NCM au sein desquelles le protéasome et la macroautophagie sont inhibées, nous avons mesuré l'expression de la protéine Hsc70 qui dans notre modèle reflète le mieux l'activité de la CMA (Figure 76).

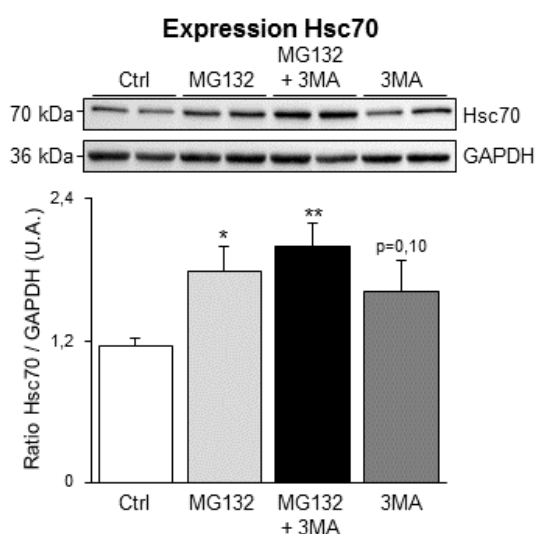


Figure 76. Evaluation de la CMA dans les NCM co-traitées avec la 3MA et le MG132. Quantification du niveau d'expression de Hsc70 dans les NCM contrôles (n=12), traitées avec le MG132 (n=12), la 3MA (n=12) et les NCM co-traitées avec la 3MA et de MG132 pendant 18h (n=12). U.A. : unités arbitraires \pm SEM. Mann Whitney * $p < 0,05$.

Nous avons pu mettre en évidence qu'un co-traitement des NCM avec la 3MA et le MG132 accroît d'avantage l'expression la chaperonne Hsc70 tout comme l'inhibition de la macroautophagie tend à l'augmenter (Figure 76). Ces résultats en accord avec les données de la littérature suggèrent que l'activité de la CMA est augmentée en réponse à l'inhibition de la macroautophagie et/ou du protéasome (Park *et al.*, 2013).

c) Impact sur la Desmine

Nous avons ensuite évalué l'impact de l'inhibition conjointe du protéasome et de la macroautophagie sur le niveau de Desmine insoluble et soluble (Figure 77).

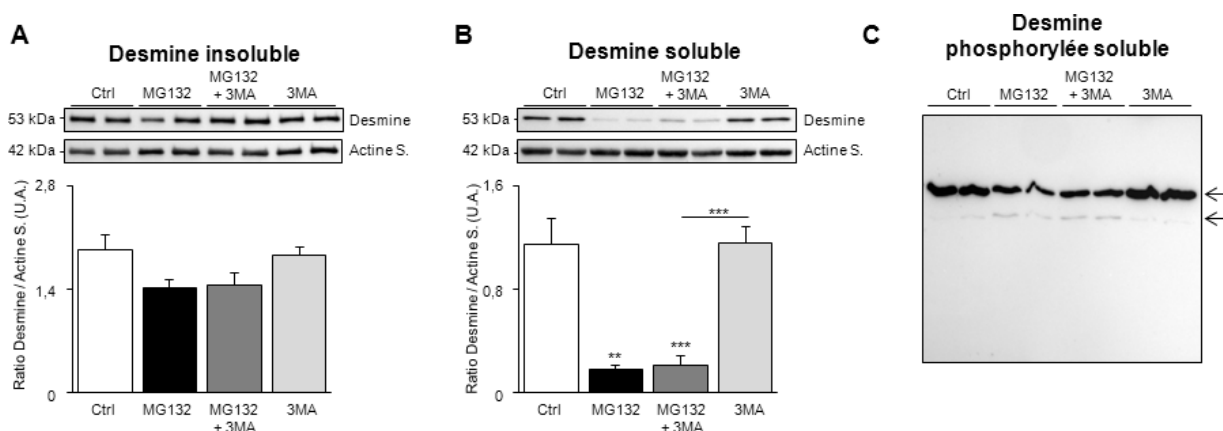


Figure 77. Impact de l'inhibition du protéasome et de la macroautophagie sur la Desmine. Quantification du niveau de Desmine insoluble (A), la Desmine soluble (B) et le profil de phosphorylation de la Desmine (C) dans les NCM contrôles (n=12), traitées avec le MG132 (n=12), la 3MA (n=12) et les NCM co-traitées avec la 3MA et de MG132 pendant 18h (n=12). Actine S. : actine sarcomérique ; U.A. : unités arbitraires \pm SEM. Mann Whitney ***p<0,001.

Dans les NCM, l'inhibition du protéasome et de la macroautophagie n'a pas d'impact sur le niveau de Desmine insoluble (Figure 77A) suggérant que dans ces conditions, l'expression de la Desmine n'est pas modulée. De manière intéressante, l'inhibition de la macroautophagie ne restaure pas le niveau de Desmine soluble (Figure 77B) ni son niveau de phosphorylation (Figure 77C) tous 2 diminués en réponse à l'inhibition du protéasome. L'ensemble de ces données suggèrent que la macroautophagie n'est pas impliquée dans la dégradation de la Desmine phosphorylée et soluble. En revanche, la CMA, qui dans ces conditions est le seul système protéolytique actif, pourrait être responsable de la dégradation de la Desmine soluble.

d) Conclusion

Dans les NCM, nous avons montré que l'inhibition du protéasome entraîne une activation de la macroautophagie et de la CMA. Dans ces conditions, nous avons mis en évidence une altération du profil de phosphorylation de la Desmine, une diminution drastique de son niveau d'expression dans la fraction protéique, sans modulation du niveau de Desmine insoluble, suggérant une dégradation de la protéine. L'inhibition conjointe du protéasome et de la macroautophagie ne permet de restaurer ni le niveau de phosphorylation de la Desmine ni son niveau d'expression dans la fraction protéique soluble. Dans ces conditions, la CMA toujours active pourrait être responsable de la prise en charge et de la dégradation de la Desmine soluble.

L'ensemble de nos résultats suggèrent que la CMA serait le mécanisme protéolytique impliqué dans la prise en charge et la dégradation de la Desmine dépolymérisée suite à son hyperphosphorylation.

III. Discussion - Perspectives

Dans le modèle d'IC chez le rat à 2 mois post-IDM, nous avons pu mettre en évidence la présence d'agrégats de Desmine possiblement formés suite à son hyperphosphorylation et à la dépolymérisation de ses filaments. Les MPTs de la Desmine pourraient ainsi participer au développement et/ou à l'aggravation du RVG et de la dysfonction contractile observés au cours de l'IC. L'objectif de cette étude était d'identifier les mécanismes responsables de l'accumulation cytosolique de Desmine phosphorylée dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM et mais aussi d'identifier le ou les mécanismes activés pour tenter d'enrailler ce phénomène.

Dans la littérature, il est décrit que la Desmine peut être dégradée par le protéasome en conditions physiopathologiques comme lors d'une atrophie musculaire (Cohen *et al.*, 2012) ou d'une cardiomyopathie dilatée (Thottakara *et al.*, 2015). Néanmoins, l'accumulation cytosolique de Desmine sous forme d'agrégats a également été montrée impliquée dans l'inhibition du protéasome (Liu *et al.*, 2005 ; Thottakara *et al.*, 2015). Dans le modèle d'IC, nous avons montré qu'en dépit de la présence d'agrégats de Desmine dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM, l'activité de l'UPS ne semble pas perturbée à ce temps ni aux temps plus précoces (à 7 jours et 1 mois post-IDM). La mesure du niveau d'ubiquitinylation de la Desmine dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM nous a permis de montrer que cette protéine n'est pas ubiquitinylée suite à son hyperphosphorylation comme l'ont suggéré Cohen *et al.* (2012) à partir d'un modèle d'atrophie musculaire chez la souris. La mise en évidence d'une augmentation de l'expression de TRIM32 à 2 mois post-IDM suggère que cette absence de modulation du niveau d'ubiquitinylation de la Desmine phosphorylée ne serait pas due à un défaut d'activité de cette ubiquitine ligase mais bien au fait que l'UPS lui-même n'est pas impliqué dans la dégradation de la Desmine phosphorylée dans notre modèle d'IC chez le rat. Nos résultats sont en adéquation avec les données de la littérature puisque le protéasome est connu pour dégrader les protéines monomériques mais ne peut pas prendre en charge les complexes protéiques de haut poids moléculaire ou encore les agrégats protéiques (Nishida *et al.*, 2015) du fait même du diamètre de la sous-unité catalytique du protéasome qui est de 10 nm environ (Coux *et al.*, 1996).

L'étude de la macroautophagie dans le modèle d'IC chez le rat, nous a permis de montrer qu'à 7 jours post-IDM ce système protéolytique est activé mais ne semble pas effectif du fait de l'accumulation de la protéine adaptatrice p62. Dans ces VG, nous n'avons néanmoins pas mis en évidence d'accumulation d'autophagosomes. L'induction de la macroautophagie particulièrement forte dans la zone bordant l'infarctus (Kanamori *et al.*, 2010) pourrait expliquer qu'en observant l'ultrastructure des VG en zones non bordantes nous n'ayons pas observé de différence entre les 2 groupes d'animaux. Nous avons pu montrer que 7 jours après l'IDM, la macroautophagie semble décroître pour devenir totalement inhibée à 2 mois. Nos données sont en accord avec la littérature puisqu'en effet Wu *et al.* (2014) ont mis en évidence dans un modèle d'IC par ligature permanente de l'ACG chez la souris, une activation précoce de la macroautophagie en réponse à l'IDM (dès 12h) qui décroît progressivement à partir de 5h pour devenir totalement inhibée 14 jours après l'infarctus. Des résultats similaires ont été obtenus par Kanamuri *et al.* (2010) dans un modèle d'IC par ligature

permanente de l'ACG chez la souris pendant 24h. Notre étude, complémentaire à celles de Wu et Kanamuri, met en évidence que cette inhibition de la macroautophagie perdure dans le temps au moins encore pendant 2 mois après l'infarctus. En revanche, le rôle de la macroautophagie en condition d'ischémie-reperfusion fait encore débat. En effet, en fonction du modèle expérimental, de la sévérité ou encore de la durée de l'ischémie l'induction de la macroautophagie pourrait participer à la survie cellulaire et ainsi être bénéfique ou alors induire la mort cellulaire et auquel cas être délétère (Chen-Scarabelli *et al.*, 2014). Dans le modèle d'IC chez le rat, l'induction précoce de la macroautophagie permettrait de lutter contre l'apoptose cellulaire, de limiter l'extension de la zone infarctée et ainsi de préserver les capacités contractiles du myocarde (Yan *et al.*, 2005, Wu *et al.*, 2014). En effet, l'infarctus, en diminuant l'apport sanguin au niveau du cœur, va contribuer à la diminution des stocks d'ATP. En maintenant un pool d'acides aminés, la macroautophagie permet la synthèse de protéines nécessaires à la survie cellulaire mais également la synthèse d'énergie sous forme d'ATP (Kanamori *et al.*, 2010). La diminution de la macroautophagie au cours du temps puis son inhibition complète à 2 mois post-IDM pourraient contribuer au RVG post-IDM et à la dysfonction contractile (Wu *et al.*, 2014). En effet, il a été montré qu'une inhibition de la macroautophagie 30 min en amont de l'IDM entraîne, après 24h de ligature, une augmentation de 31% de la taille de l'infarctus, que l'on sait déterminante pour la progression du RVG. En revanche, une activation de la macroautophagie en amont de la ligature, entraîne une diminution de 23% de la taille de l'infarctus (Kanamori *et al.*, 2010). La macroautophagie ayant déjà été montrée impliquée dans la lutte contre l'accumulation de protéines mal endommagées et d'agrégats protéiques en particulier dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson et d'Huntington (Shintani *et al.*, 2004), l'inefficacité de la macroautophagie dès 7 jours post-IDM et son inhibition progressive au cours du temps pourrait être impliquée dans l'accumulation de Desmine phosphorylée dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM ayant pour conséquence la formation d'agrégats. La mise en évidence de l'existence d'un relais entre la macroautophagie et la CMA pour la dégradation des protéines et le maintien de l'homéostasie cellulaire (Kaushik *et al.*, 2008 ; Kiffin *et al.*, 2004) ainsi que la présence de 4 motifs pentapeptidiques KFERQ dans la séquence de la Desmine de rat, de souris et humaine nous a amené à étudier la régulation de cet autre processus protéolytique dans le modèle d'IC chez le rat.

De manière intéressante nous avons mis en évidence une augmentation du niveau d'expression de la protéine LAMP2a dans les VG de rats à 7 jours, 1 et 2 mois post-infarctus, et ce en dépit de la quantification de son niveau d'expression dans les lysats protéiques totaux. Ces résultats suggèrent une activation massive de la CMA. La quantification de l'expression des 2 autres acteurs principaux de la CMA, Hsc70 et Hsp90 (Dice *et al.*, 2004 ; Patel *et al.*, 2015), a permis de conforter ces résultats puisque leur expression est également augmentée dans les VG de rats au cours du RVG post-IDM. Dans la littérature, il est connu que la CMA est activée en réponse à un sevrage en sérum prolongé (Cuervo *et al.*, 2000) ainsi qu'à l'inhibition de la macroautophagie et/ou du protéasome (Park *et al.*, 2013). L'infarctus, en mimant des conditions de sevrage extrême ainsi que l'inefficacité de la macroautophagie dans les VG de rats dès 7 jours post-IDM pourrait contribuer à l'activation de la CMA. Cette induction de la CMA pourrait permettre de lutter contre l'accumulation de protéines

endommagées, telle que la Desmine phosphorylée, et la formation d'agrégats protéiques afin d'assurer l'homéostasie cellulaire.

In vitro, nous avons donc testé l'impact de l'activation de la CMA sur le niveau de Desmine phosphorylée et soluble. Par 2 approches (activation pharmacologique de la CMA ou en réponse à l'inhibition du protéasome), nous avons montré qu'une activation de la CMA entraîne une altération du profil de phosphorylation de la Desmine soluble ainsi qu'une diminution de son niveau d'expression sans altération du niveau d'expression de la Desmine insoluble. De plus, la mise en évidence d'une part, d'une colocalisation de la Desmine avec LAMP2a et Hsc70 et d'autre part, que l'inhibition de la macroautophagie ne permet pas de restaurer le niveau de Desmine soluble suggère que les effets observés sur la Desmine sont spécifiques à la CMA. Ces 2 modèles d'induction de la CMA semblent néanmoins faire intervenir des mécanismes cellulaires différents puisqu'une induction pharmacologique de la CMA par la GA entraîne une augmentation significative de l'expression de sa chaperonne l' α B cristalline alors qu'une activation de la CMA en réponse à l'inhibition prolongée du protéasome entraîne une diminution significative de son expression. Dans le contexte d'un traitement des NCM avec la GA, nous avons pu montrer que la macroautophagie est activée alors que lors de l'inhibition du protéasome, elle est inhibée. Ces résultats suggèrent d'une part que l' α B cristalline ne participerait pas au chaperonnage et au transport de la Desmine vers les lysosomes en vue de sa dégradation par les processus de CMA et d'autre part que la macroautophagie pourrait être impliquée dans la dégradation de l' α B cristalline.

Finalement, l'ensemble des résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* suggèrent que dans le modèle d'IC chez le rat, la phosphorylation en Ser de la Desmine par les kinases PKC ζ et/ou GSK3 β entraînerait la dépolymérisation de ses filaments, la solubilisation de la protéine et l'exposition de ses motifs KFERQ. La Desmine ainsi phosphorylée et solubilisée, serait libérée dans le cytoplasme des cellules où elle serait reconnue et prise en charge, de façon individuelle, par Hsc70 et ses co-chaperonnes pour être transportée vers le lysosome en vue de sa dégradation. La Desmine phosphorylée échappant à ce contrôle qualité orchestré par la CMA formerait des agrégats rapidement éliminés par la macroautophagie. Ainsi, dans un premier temps, la phosphorylation de la Desmine en réponse à l'IDM passerait inaperçu. Au cours du RVG post-IDM, le déclin progressif de la macroautophagie provoquerait l'accumulation d'agrégats de Desmine phosphorylée détectables à 2 mois post-IDM au moment où la macroautophagie est totalement inhibée. Ces agrégats de Desmine, potentiellement toxiques pour le cardiomyocyte (Agnetti *et al.*, 2014) pourraient participer à l'aggravation du RVG et de la dysfonction contractile.

Nos résultats mettent en évidence l'existence d'un dialogue entre les différents systèmes protéolytiques permettant d'assurer l'homéostasie cellulaire. Ainsi, une protéine, telle que le RyR2, peut être prise en charge par différents systèmes protéolytiques en fonction du stress cellulaire subi et des MPTs portées par la protéine (Pedrozo *et al.*, 2013)

Dans la suite du projet, il serait intéressant de valider l'implication de la CMA dans la clairance de la Desmine soluble et phosphorylée en mettant en évidence, par co-immunoprécipitation, une

interaction physique entre la Desmine et LAMP2a et/ou Hsc70. La mesure de l'impact d'une inhibition des lysosomes ou de la CMA (par invalidation du récepteur lysosomal LAMP2a ; Kaushik *et al.*, 2009) dans un contexte d'induction de la CMA, sur le niveau de Desmine soluble permettrait de compléter notre démonstration. *In vitro*, l'incubation de lysosomes compétents pour la CMA, purifiés à partir de foie de rat ou de cellules en culture (Kaushik *et al.*, 2009), avec de la Desmine recombinante et la protéine Hsc70 permettrait de montrer que Hsc70 est capable de reconnaître et de fixer la Desmine, de la transporter jusqu'aux lysosomes et de promouvoir sa dégradation après translocation dans la lumière des lysosomes via le récepteur lysosomal LAMP2a. La mutation de la glutamine [Q] des sites pentapeptidiques KFERQ de la Desmine, bien qu'elle ne soit pas toujours suffisante pour abolir l'interaction avec la protéine Hsc70, permettrait également de valider que la Desmine est un de substrat de la CMA (Patel *et al.*, 2015).

Afin de faire le lien entre la phosphorylation de la Desmine et sa dégradation par la CMA, la surexpression de PKC ζ et/ou de GSK3 β mutées constitutivement actives (pour PKC ζ , mutation de sa région pseudo-substrat (PKC ζ^{A119E}) ou de son site de phosphorylation par PDK1 (pour 3'-phospho-inositide-dependent kinase-1) (PKC ζ^{T410E}) (Wu *et al.*, 2007) ; pour GSK3 β , mutation de sa Ser9 (GSK3 β^{S9A}) (MacAulay *et al.*, 2005)) dans les NCM permettrait d'induire une hyperphosphorylation de la Desmine et ainsi de mesurer son impact sur le devenir de la Desmine.



Conclusion

Conclusion

Actuellement, l'IC est l'une des causes les plus fréquentes de morbi-mortalité dans les pays développés. Avec le vieillissement de la population et l'augmentation de l'espérance de vie, l'incidence de l'IC ne cesse d'augmenter et représente aujourd'hui un problème majeur de Santé Publique. Malgré les avancées thérapeutiques ces dernières années et les efforts continus pour trouver des nouveaux traitements, l'IC reste un syndrome clinique mortel, ce qui est principalement dû au fait que les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la survenue et le développement de l'IC sont encore largement inconnus. Le diagnostic des patients à risque ainsi que le développement de thérapeutiques capables de soigner les causes de l'IC plutôt que les symptômes nécessitent d'identifier d'une part de nouveaux biomarqueurs du RVG post-IDM et d'autre part les mécanismes physiopathologiques sous-jacents à l'IC post-IDM. C'est dans ce contexte que s'est inscrit mon projet de thèse.

A partir d'un modèle expérimental d'IC chez le rat par ligature permanente de l'ACG, l'équipe a pu mettre en évidence, en comparant les phosphoprotéomes des VG de rats témoins et IC à 2 mois post-IDM, une modulation du niveau de phosphorylation de 30 protéines dont 5 protéines contractiles parmi lesquelles la Desmine et la TnT ont été identifiées (Dubois *et al.*, 2011).

L'équipe s'est intéressée dans un premier temps à caractériser la régulation post-traductionnelle de la TnT et a ainsi mis en évidence l'implication de la Ser208 dans la diminution de son niveau de phosphorylation dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM. De manière intéressante, l'équipe a pu montrer que le niveau de phosphorylation de TnT en Ser208 était également diminué non seulement dans les plasmas de ces mêmes animaux mais aussi dans les plasmas des patients en post-infarctus (Dubois *et al.*, 2011). Par ailleurs, le niveau de TnT p-Ser208 a été montré corrélé au degré de RVG post-IDM (Dubois-Deruy *et al.*, 2013). L'ensemble de ces résultats nous ont permis de proposer la TnT p-Ser208 comme nouveau biomarqueur pronostique du RVG post-IDM. Par la suite, l'étude *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* des mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation du niveau de TnT p-Ser208 au cours du RVG post-IDM et de l'IC nous a permis de mettre en évidence l'implication de la PKC ϵ dans cette diminution de TnT p-Ser208. Par diverses approches, nous avons montré qu'une diminution du niveau de TnT p-Ser208, médiée par l'inhibition pharmacologique de la PKC ϵ , entraîne une diminution de la contractilité cardiaque suggérant qu'*in vivo*, la diminution du niveau de TnT p-Ser208 observée pourrait altérer les capacités contractiles des cardiomyocytes. La phosphorylation et la O-GlcNAcylation étant des MPTs compétitives puisqu'elles interviennent sur des résidus Ser et/ou Thr identiques ou adjacents au sein d'une même protéine, nous nous sommes également attachés à déterminer l'existence d'une balance phosphorylation/O-GlcNAcylation de la TnT. Par approches *in vitro* et *ex vivo*, nous avons validé son existence et montré que cette balance phosphorylation/O-GlcNAcylation de la TnT implique les Ser208 et 190 respectivement. Ces travaux nous ont permis de souligner l'importance des MPTs dans la régulation fonctionnelle des protéines mais également l'importance d'identifier les acteurs de ces MPTs. En effet, la modulation de leur activité permettrait de moduler le niveau de phosphorylation et d'O-GlcNAcylation des protéines d'intérêt et ainsi leur fonction biologique voire un mécanisme plus général tel que la contractilité cardiaque.

Conclusion

Au cours de ma thèse, je me suis principalement intéressée à l'étude des MPTs de la Desmine et plus particulièrement à l'identification des mécanismes moléculaires impliqués dans l'augmentation de sa forme phosphorylée dans le modèle d'IC chez le rat à 2 mois post-IDM.

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer si tout comme la TnT p-Ser208, la Desmine pouvait être un nouveau biomarqueur pronostique du RVG post-IDM et/ou de l'IC comme l'ont suggéré Chugh *et al.* (2013). Par diverses approches, nous avons montré que contrairement à la TnT p-Ser208, la Desmine n'est pas un biomarqueur circulant du RVG post-IDM et de l'IC puisqu'elle n'est retrouvée ni dans les plasmas de rats IC à 2 mois post-IDM, ni dans les plasmas de souris contrôles, ni dans les plasmas de patients IC (Bouvet *et al.*, soumis). Néanmoins, la mise en évidence de la présence d'agrégats de Desmine insolubles dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM possiblement formés suite à son hyperphosphorylation (Agnetti *et al.*, 2014) et la mise en évidence de l'existence d'une corrélation entre le degré de remodelage du cytosquelette de Desmine et la fonction cardiaque chez les patients atteints de cardiomyopathies dilatées idiopathiques (Pawlak *et al.*, 2012) nous a amené à suggérer l'existence d'un lien de causalité entre l'augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine, son agrégation et la dysfonction contractile observée au cours de l'IC. Ainsi, à défaut d'être un biomarqueur circulant d'IC post-IDM, nous avons suggéré que la Desmine pouvait en être un marqueur tissulaire.

Notre étude s'est donc attachée, dans un deuxième temps à identifier les résidus et kinases impliqués dans l'augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine au cours du RVG post-IDM et de l'IC. Nous avons pu montrer que bien que la Desmine soit phosphorylée sur les résidus Ser, Thr et Tyr, l'augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine, mise en évidence dans les VG rats IC, implique plusieurs résidus Ser (Bouvet *et al.*, soumis) que sont potentiellement les Ser25, 28, 31, 32, 60, 81, 329 et 431. Néanmoins, les Ser précisément impliquées dans cette augmentation de phosphorylation de la Desmine ne sont pas encore connues. La quantification du niveau de phosphorylation des différentes Ser de la Desmine identifiées comme étant phosphorylées dans le modèle *in vivo*, ainsi que l'analyse des différents mutants de la Desmine pour chaque site de phosphorylation nous permettra très prochainement d'identifier les Ser impliquées/importantes. Par approche *in vivo* et *in vitro*, nous avons pu montrer que la modulation du niveau de phosphorylation en Ser de la Desmine semble dépendante des kinases PKC ζ et GSK3 β . Des expériences complémentaires comme l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de GSK3, de siRNA dirigés contre les kinases PKC ζ et GSK3 β ainsi que la surexpression de formes constitutivement actives de ces 2 enzymes *in vitro* permettront de renforcer ces conclusions mais également de déterminer s'il existe un dialogue entre PKC ζ et GSK3 β pour la phosphorylation de la Desmine. Il nous restera à étudier le rôle de la O-GlcNAcylation de la Desmine, qui *a priori* pourrait être localisée à la membrane plasmique et être impliquée dans l'internalisation des protéines relarguées par les cellules en apoptose et nécrose (Ise *et al.*, 2010). Pour ce faire, l'identification des sites impliqués dans la diminution de la forme O-GlcNAcyliée de la Desmine dans le modèle d'IC chez le rat est requise. Afin de déterminer l'existence d'une balance phosphorylation/O-GlcNAcylation de la Desmine, nous mesurerons par approche *in vitro* et/ou *ex vivo*, comme pour la TnT, l'impact d'une modulation de la O-GlcNAcylation de la Desmine sur sa forme phosphorylée et réciproquement.

Conclusion

La dernière partie de mon travail de thèse a été centrée sur la compréhension des causes et conséquences d'une augmentation du niveau de phosphorylation de la Desmine au cours de l'IC. La phosphorylation de la Desmine impactant sa capacité à former des filaments intermédiaires et entraînant la dépolymérisation de filaments de Desmine existant, nous avons émis l'hypothèse qu'un défaut de clairance de la Desmine hyperphosphorylée pourrait être à l'origine de l'accumulation cytosolique de Desmine sous forme d'agrégats et ainsi participer à la dysfonction contractile du myocarde. Nous avons donc cherché à identifier les mécanismes protéolytiques impliqués dans la clairance de la Desmine phosphorylée lors de l'IC. Pour ce faire, nous avons étudié la régulation des systèmes protéolytiques impliqués dans l'homéostasie des cardiomyocytes (UPS, macroautophagie et CMA) afin de comprendre lesquels étaient responsables de l'accumulation cytosolique de Desmine phosphorylée et lesquels étaient activés pour assurer la survie cellulaire. De manière intéressante, nous n'avons pas trouvé de modulation du niveau d'ubiquitylation de la Desmine dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM, au moment où le niveau de Desmine p-Ser est significativement augmenté suggérant que l'UPS n'est pas impliqué dans la clairance de la Desmine p-Ser. En revanche, nos résultats suggèrent que, dans le modèle d'IC chez le rat, l'activation précoce de la CMA, dès 7 jours post-IDM, permettrait d'éliminer la Desmine phosphorylée soluble afin d'éviter qu'elle ne s'agrège en structures insolubles (Figure 78). Ces résultats ont été renforcés par la mise en évidence de la présence de 4 motifs KFERQ dans la séquence en acides aminés de la Desmine, non accessibles à la chaperonne Hsc70 lorsque la Desmine est polymérisée en filaments intermédiaires, puisque situés au niveau des hélices 1A et 1B du corps de la Desmine, mais lors de la dépolymérisation de la Desmine induite par sa phosphorylation. Par approche *in vitro*, en utilisant 2 modèles différents, nous avons pu montrer que l'induction de la CMA entraîne une diminution de Desmine soluble sans modulation du niveau de Desmine insoluble validant ainsi notre hypothèse. *In vivo*, l'ensemble de nos résultats suggèrent que les agrégats de Desmine observés pourraient résulter d'une accumulation de monomères de Desmine p-Ser ayant échappé au contrôle-qualité exercé par la CMA. Au cours du RVG post-IDM, le déclin progressif de la macroautophagie, sensée prendre en charge et éliminer les agrégats protéiques puisque la CMA n'en n'est pas capable, et son inhibition complète à 2 mois post-IDM pourraient être responsables de l'accumulation d'agrégats de Desmine phosphorylée (Figure 78). Ces agrégats, en perturbant l'architecture cellulaire, notamment l'agencement des sarcomères, pourraient participer au développement et/ou à l'aggravation du remodelage et de la dysfonction VG au cours de l'IC.

Conclusion

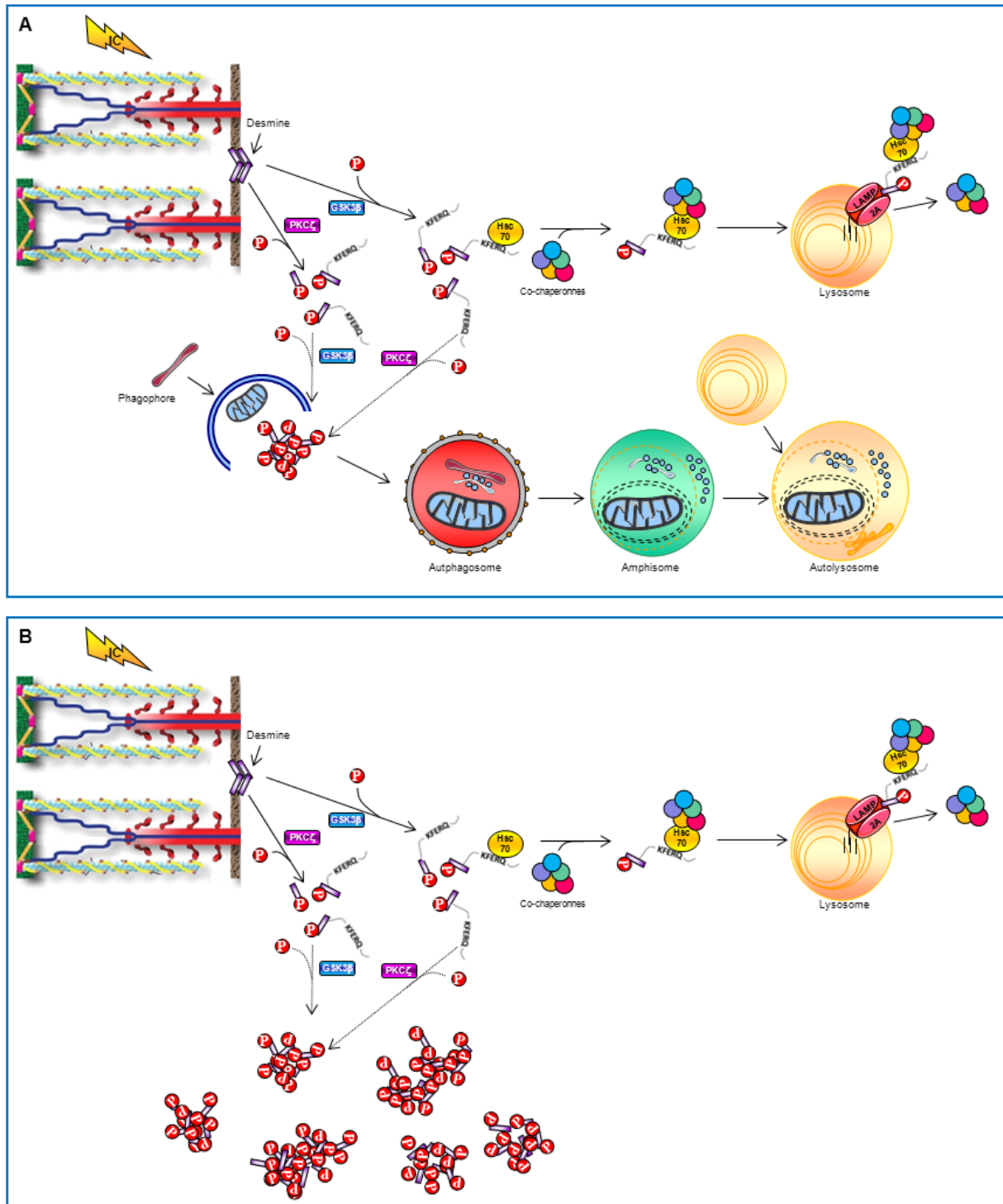


Figure 78. Schéma présentant les différents systèmes protéolytiques impliqués dans la clairance de la Desmine phosphorylée en conditions physiologiques (A) et physiopathologiques (B).

Ces données, en cours de validation chez l'homme, pourraient ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement de l'IC d'origine ischémique. Ainsi, l'inhibition de la phosphorylation de la Desmine, le maintien de l'activité de la macroautophagie et/ou la suractivation de la CMA en post-infarctus sont autant de pistes qui pourraient potentiellement permettre de préserver la fonction VG en post-IDM.

Conclusion

La présence, dans d'autres organes du corps ou dans d'autres pathologies, d'agrégats protéiques formés suite au mauvais repliement des protéines, induit pas des MTPs, suggère que la modulation de l'activité des systèmes protéolytiques est une option thérapeutique qui n'est pas restreinte au traitement de l'IC post-IDM (Del Monte *et al.*, 2014). En particulier, l'activation de la CMA, permettant de cibler spécifiquement les protéines portant un motif KFERQ sans perturber les protéines environnantes semble ouvrir des perspectives thérapeutiques prometteuses.



Références bibliographiques

- A -

- Agnetti, G. et al., 2014. Desmin modifications associate with amyloid-like oligomers deposition in heart failure. *Cardiovascular Research*, 102(1), pp.24–34.
- Anderson, M.E., Brown, J.H. & Bers, D.M., 2011. CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 51(4), pp.468–473.
- Aouba, A., 2011. Données sur la mortalité en France : principales causes de décès en 2008 et évolutions depuis 2000. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, 22, pp.249–255.
- Arai, M. et al., 1993. Alterations in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure. A possible mechanism for alterations in systolic and diastolic properties of the failing myocardium. *Circulation Research*, 72, pp.463–469.
- Archan, S. & Fleisher, L. a, 2010. From creatine kinase-MB to troponin: the adoption of a new standard. *Anesthesiology*, 112(4), pp.1005–1012.

- B -

- Bakthisaran, R. et al., 2015. Phosphorylation of α B-crystallin: Role in stress, aging and pathophysiological conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, pp.9–11.
- Ballou, L.M. et al., 2001. Dual Regulation of Glycogen Synthase Kinase-3 by the 1A-Adrenergic Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 276(44), pp.40910–40916.
- Bär, H. et al., 2005. Pathogenic effects of a novel heterozygous R350P desmin mutation on the assembly of desmin intermediate filaments in vivo and in vitro. *Human molecular genetics*, 14(10), pp.1251–60.
- Baron, C.P., Jacobsen, S. & Purslow, P.P., 2004. Cleavage of desmin by cysteine proteases: Calpains and cathepsin B. *Meat Science*, 68(3), pp.447–456.
- Bennardini, F., Wrzosek, A. & Chiesi, M., 1992. Alpha B-crystallin in cardiac tissue. Association with actin and desmin filaments. *Circulation Research*, 71(2), pp.288–294.
- Bergmann, M.W. & Zelarayan, L., 2009. RALT specifically halts maladaptive cardiac hypertrophy: a new kid on the block. *Hypertension*, 53(3), pp.454–455.
- Bers, D.M., 2006. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 21(6), pp.380–387.
- Bers, D.M. & Morotti, S., 2014. Ca(2+) current facilitation is CaMKII-dependent and has arrhythmogenic consequences. *Frontiers in Pharmacology*, 5, p.144.
- Bian, Y. et al., 2013. An enzyme assisted RP-RPLC approach for in-depth analysis of human liver phosphoproteome. *Journal of Proteomics*, 96, pp.253–262.
- Blunt, B.C. et al., 2007. H₂O₂ activation of HSP25/27 protects desmin from calpain proteolysis in rat ventricular myocytes. *American Journal of Physiology Heart Circulation Physiol.* 293(3), pp.H1518–152

Références bibliographiques

- Bonaldo, P. & Sandri, M., 2013. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease Models & Mechanisms*, 6(1), pp.25–39.
- Braunwald, E., 2009. Biomarkers in heart failure. Preface. *Heart failure clinics*, 5(4), pp.xiii–xiv.
- Breitkreutz, D. et al., 2007. Protein kinase C family: On the crossroads of cell signaling in skin and tumor epithelium. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 133(11), pp.793–808.
- Bruins Slot, M.H.E. et al., 2013. Point-of-care tests in suspected acute myocardial infarction: A systematic review. *International Journal of Cardiology*, 168(6), pp.5355–5362.
- Brutsaert, D.L., 2003. Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiological reviews*, 83(1), pp.59–115.
- Buggey, J. et al., 2015. Angiotensin Receptor Neprilysin Inhibition in Heart Failure: Mechanistic Action and Clinical Impact. *Journal of Cardiac Failure*, 21(9), pp.741–750.
- Bui, A.L., Horwich, T.B. & Fonarow, G.C., 2011. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nature Reviews Cardiology*, 8(1), pp.30-41

- C -

- Capetanaki, Y. et al., 2015. Desmin related disease: a matter of cell survival failure. *Current Opinion in Cell Biology*, 32, pp.113–120.
- Capetanaki, Y., Milner, D.J. & Weitzer, G., 1997. Desmin in muscle formation and maintenance: knockouts and consequences. *Cell Structure and Function*, 22(1), pp.103–116.
- Caron, A. & Chapon, F., 1999. Desmin phosphorylation abnormalities in cytoplasmic body and desmin-related myopathies. *Muscle & Nerve*, 22(8), pp.1122–1125.
- Chen, Q. et al., 2014. Influence of oxidation on the susceptibility of purified desmin to degradation by μ -calpain, caspase-3 and -6. *Food Chemistry*, 150, pp.220–226.
- Cheng, S. & Vasan, R.S., 2011. Advances in the epidemiology of heart failure and left ventricular remodeling. *Circulation*, 124(20), pp.e516–519.
- Chen-Scarabelli, C. et al., 2014. The role and modulation of autophagy in experimental models of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Journal of geriatric cardiology*, 11(4), pp.338–348.
- Chugh, S. et al., 2013. Pilot study identifying myosin heavy chain 7, desmin, insulin-like growth factor 7, and annexin A2 as circulating biomarkers of human heart failure. *Proteomics*, 13(15), pp.2324–2334.
- Clemen, C.S. & Herrmann, H., 2013. Desminopathies : pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol*, 125(1), pp.47–75.
- Cohen, S. et al., 2012. Ubiquitylation by Trim32 causes coupled loss of desmin, Z-bands, and thin filaments in muscle atrophy. *The Journal of Cell Biology*, 198(4), pp.575–589.
- Cotecchia, S. et al., 2015. The alpha1-adrenergic receptors in cardiac hypertrophy: Signaling mechanisms and functional implications. *Cellular Signalling*, 27(10), pp.1984–1993.

Références bibliographiques

- Couchonnal, L.F. & Anderson, M.E., 2008. The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 23(60), pp.151–159.
- Coux, O., Tanaka, K. & Goldberg, A.L., 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annual Review of Biochemistry*, 65, pp.801–847.
- Crossman, D.J. et al., 2011. Changes in the Organization of Excitation-Contraction Coupling Structures in Failing Human Heart. *PLOS ONE*, 6(3), p.e17901.
- Cuervo, A.M. & Dice, J.F., 2000. Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane. *Traffic*, 1(7), pp.570–583.
- Cuervo, A.M., Dice, J.F. & Knecht, E., 1997. A population of rat liver lysosomes responsible for the selective uptake and degradation of cytosolic proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(9), pp.5606–5615.
- Cuervo, A.M. & Wong, E., 2013. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Research*, 24(1), pp.92–104.

- D -

- David, M. et al., 2012. Protein kinase C (PKC) activity regulates functional effects of Kv β 1.3 subunit on KV1.5 channels: identification of a cardiac Kv1.5 channelosome. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(25), pp.21416–21428.
- Decock, J.B. et al., 1994. Classical, novel and atypical isoforms of PKC stimulate ANF- and TRE/AP-1-regulated-promoter activity in ventricular cardiomyocytes. *FEBS letters*, 356(2-3), pp.275–278.
- Del Monte, F. & Agnetti, G., 2014. Protein post-translational modifications and misfolding: new concepts in heart failure. *Proteomics - Clinical Applications*, 8(7-8), pp.534–42.
- Delom F. & Chevet E., 2006. Phosphoprotein analysis: from proteins to proteomes. *Proteome.Science*, 9, pp.4–15.
- Diguet, N. et al., 2011. Muscle Creatine Kinase Deficiency Triggers Both Actin Depolymerization and Desmin Disorganization by Advanced Glycation End Products in Dilated Cardiomyopathy, *The Journal of Biological Chemistry*, 286(40), pp.35007–35019.
- Dubois, E., Richard, V., et al., 2011. Decreased serine207 phosphorylation of troponin T as a biomarker for left ventricular remodelling after myocardial infarction. *European heart journal*, 32(1), pp.115–123.
- Dubois-Deruy, E. et al., 2013. Circulating plasma serine208-phosphorylated troponin T levels are indicator of cardiac dysfunction. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(10), pp.1335–1344.
- Dubois-Deruy, E. et al., 2015. Interplay between troponin T phosphorylation and O-N-acetylglucosaminylation in ischaemic heart failure. *Cardiovascular Research*, 107(1), pp.56–65.

- F -

- Fader, C.M. & Colombo, M.I., 2009. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death & Differentiation*, 16(1), pp.70-78.
- Fang, L. et al., 2015. Systemic inflammatory response following acute myocardial infarction. *Journal of Geriatric Cardiology*, 12(3), pp.305–312.
- Fatkin, D. & Graham, R.M., 2002. Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiological Reviews*, 82(4), pp.945–980.
- Fertin, M. et al., 2010. Usefulness of Serial Assessment of B-Type Natriuretic Peptide, Troponin I, and C-Reactive Protein to Predict Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction (from the REVE-2 Study). *The American Journal of Cardiology*, 106(10), pp.1410–1416.
- Finn, P.F. et al., 2005. Effects of Small Molecules on Chaperone-Mediated Autophagy. *Autophagy*, 1(3), pp.141–145.
- Fischer, T.H. et al., Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II equally induces sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in human ischaemic and dilated cardiomyopathy. *European Journal of Heart Failure*, 16(12), pp.1292–1300.
- Fürst, D.O., 1989. Myogenesis in the Mouse Embryo: Differential Onset of Expression of Myogenic Proteins and the Involvement of Titin in Myofibril Assembly. *The Journal of Cell Biology*, 109(2), pp.517–527.

- G -

- Gavriilidis, P., Giakoustidis, A. & Giakoustidis, D., 2015. Aurora Kinases and Potential Medical Applications of Aurora Kinase Inhibitors : A Review. *Journal of Clinical Medicine Research*, 7(10), pp.742–751.
- Geisler, N. & Weber, K., 1988. Phosphorylation of desmin in vitro inhibits formation of intermediate filaments; identification of three kinase A sites in the aminoterminal head domain. *The EMBO journal*, 7(1), pp.15–20.
- Goldfarb, L.G. & Dalakas, M.C., 2009. Tragedy in a heartbeat: Malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease. *Journal of Clinical Investigation*, 119(7), pp.1806–1813.
- Gottlieb, R.A., Finley, K.D. & Mentzer R.M., 2009. Cardioprotection requires taking out the trash. *Basic Research in Cardiology*, 104(2), pp.169-180.
- Grigoreva, T.A., Tribulovich, V.G. & Garabadzhiu, A. V, 2015. The 26S proteasome is a multifaceted target for anti-cancer therapies. *Oncotarget*, 6(28), pp.24733–24749
- Grossman, W., Jones, D. & McLaurin, L.P., 1975. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *The Journal of Clinical Investigation*, 56(1), pp.56–64.

- H -

- Hardt, S.E., 2002. Glycogen Synthase Kinase-3beta: A Novel Regulator of Cardiac Hypertrophy and Development. *Circulation Research*, 90(10), pp.1055–1063.
- Hasenfuss, G. et al., 1994. Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation Research*, 75(3), pp.434–442.
- Hellermann, J.P., 2003. Incidence of Heart Failure after Myocardial Infarction: Is It Changing over Time? *American Journal of Epidemiology*, 157(12), pp.1101–1107.
- Herrmann, H., Fouquet, B. & Franke, W.W., 1989. Expression of intermediate filament proteins during development of *Xenopus laevis*. II. Identification and molecular characterization of desmin. *Development*, 105(2), pp.299–307.
- Heymes, C. et al., 2003. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(12), pp.2164–2171.
- Højlund, K. et al., 2009. In vivo phosphoproteome of human skeletal muscle revealed by phosphopeptide enrichment and HPLC-ESI-MS/MS. *Journal of proteome research*, 8(11), pp.4954–65.
- Hoppel, C.L. et al., 2009. Dynamic organization of mitochondria in human heart and in myocardial disease. *The International Journal of Biochemistry*, 41, pp.1949–1956.
- Huang, B. et al., 1999. Diminished basal phosphorylation level of phospholamban in the postinfarction remodeled rat ventricle: role of beta-adrenergic pathway, G(i) protein, phosphodiesterase, and phosphatases. *Circulation Research*, 85(9), pp.848-855.

- I -

- Inagaki, M. et al., 1988. Intermediate Filament Reconstitution in Vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(12), pp.5970–5978.
- Ise H. et al., 2010. Vimentin and desmin possess GlcNAc-binding lectin-like properties on cell surfaces. *Glycobiology*. 20(7), pp.843–864.
- Izawa, I. & Inagaki, M., 2006. Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: A study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Science*, 97(3), pp.167–174.

- J -

- Janué, A., Olivé, M. & Ferrer, I., 2007. Oxidative stress in desminopathies and myotilinopathies: a link between oxidative damage and abnormal protein aggregation. *Brain Pathology*, 17(4), pp.377–388.

Ji, Y. et al., 2003. Targeted inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac longitudinal sarcoplasmic reticulum results in decreased phospholamban phosphorylation at threonine 17. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(27), pp.25063–25071.

- K -

Kanamori, H. et al., 2011. Autophagy limits acute myocardial infarction induced by permanent coronary artery occlusion. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 300(6), pp.H2261–H2271.

Kamal, A., Burrows, F.J., 2004. Hsp90 inhibitors as selective anticancer drugs. *Discovery Medicine*, 4(23), pp.277-280.

Kaushik, S. et al., 2011. Chaperone-mediated Autophagy at a glance. *Journal of Cell Science*, 124(Pt 4), pp.495–499.

Kaushik, S. & Cuervo, A.M., 2009. Methods to monitor chaperone-mediated autophagy. *Methods in Enzymology*, (452) 297-324.

Kawajiri, Y. et al., 2003. Functional significance of the specific sites phosphorylated in desmin at cleavage furrow: Aurora-B may phosphorylate and regulate type III intermediate filaments during cytokinesis coordinately with Rho-kinase. *Molecular Biology of the Cell*, 14(4), pp.1489-1500.

Kawase, Y. et al., 2008. Reversal of Cardiac Dysfunction After Long-Term Expression of SERCA2a by Gene Transfer in a Pre-Clinical Model of Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 51(11), pp.1112–1119.

Kiffin, R. et al., 2004. Activation of Chaperone-mediated Autophagy during Oxidative Stress. *Molecular Biology of the Cell*, 15, pp.4829–4840.

Kimes, B.W. & Brandt, B.L., 1976. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Experimental Cell Research*, 98, pp.367–381.

Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E. & Koike, T., 2009. Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 4(10), pp.1513–1521.

Kollareddy, M. et al., 2008. Aurora kinases: structure, functions and their association with cancer. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palack Olomouc Czechoslovakia Repub*, 152(1), pp.27–33.

Krenz, M. & Robbins, J., 2004. Impact of beta-myosin heavy chain expression on cardiac function during stress. *Journal of the American College of Cardiology*, 44(12), pp.2390–2397.

- L -

Lal, H. et al., 2015. The GSK-3 Family as Therapeutic Target for Myocardial Diseases. *Circulation Research*, 116(1), pp.138–149.

Lau, S.L.Y. et al., 2012. Interferons induce the expression of IFITM1 and IFITM3 and suppress the proliferation of rat neonatal cardiomyocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(3), pp.841–847.

Références bibliographiques

- Lazarides, E. & Hubbard, B.D., 1976. Immunological characterization of the subunit of the 100 A filaments from muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(12), pp.4344–4348.
- Li, W., Li, J. & Bao, J., 2012. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(7), pp.1125–1136.
- Lima, V.V. et al., 2012. O-GlcNAcylation and oxidation of proteins: is signalling in the cardiovascular system becoming sweeter? *Clinical Science*, 123(8), pp.473–486.
- Linton, P. et al., 2015. Journal of Molecular and Cellular Cardiology This old heart : Cardiac aging and autophagy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 83, pp.44–54.
- Liu, X. et al., 2015. Chaperone-mediated autophagy and neurodegeneration: connections, mechanisms, and therapeutic implications. *Neuroscience Bulletin*, 31(4), pp.407–415.
- Liu, J. et al., 2005. Impairment of the ubiquitin-proteasome system in desminopathy mouse hearts. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(2), pp.362–364.
- Lopaschuk, G.D. et al., 2010. Myocardial Fatty Acid Metabolism in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 90(1), pp.207–258.
- Lorin, S., Codogno, P. & Djavaheri-Mergny, M., 2008. L'autophagie: Un nouveau concept en cancérologie. *Bulletin du Cancer*, 95(1), pp.43–50.
- Lundby, A. et al., 2012. Proteomic Analysis of Lysine Acetylation Sites in Rat Tissues Reveals Organ Specificity and Subcellular Patterns. *Cell Reports*, 2(2), pp.419–431.

- M -

- MacAulay, K. et al., 2005. Constitutive activation of GSK3 down-regulates glycogen synthase abundance and glycogen deposition in rat skeletal muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), pp.9509–9518.
- Maejima, Y. et al., 2014. Muscle-specific RING finger 1 negatively regulates pathological cardiac hypertrophy through downregulation of calcineurin A. *Circulation Heart Failure*, 7(3), pp.479–490;
- Maerkens, a. et al., 2013. Differential proteomic analysis of abnormal intramyoplasmic aggregates in desminopathy. *Journal of Proteomics*, 90, pp.14–27.
- Matsuda, T. et al., 2008. Distinct roles of GSK-3alpha and GSK-3beta phosphorylation in the heart under pressure overload. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(52), pp.20900–20905.
- McLendon, P.M. & Robbins, J., 2015. Proteotoxicity and Cardiac Dysfunction. *Circulation Research*, 116(11), pp.1863–1882.
- McMurray, J.J. V & Pfeffer, M. A., 2005. Heart failure. *Lancet*, 365, pp.1877–1889.
- McMurray, J.J. V. et al., 2012. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. *European Heart Journal*, 14(8), pp.803–869

Références bibliographiques

- Mellgren, R.L. & Huang, X., 2007. Fetuin A stabilizes m-calpain and facilitates plasma membrane repair. *Journal of Biological Chemistry*, 282(49), pp.35868–35877.
- Ménard, C. et al., 1999. Modulation of L-type calcium channel expression during retinoic acid-induced differentiation of H9C2 cardiac cells. *The Journal of biological chemistry*, 274(41), pp.29063–29070.
- Mendis, S. et al., 2011. World Health Organization definition of myocardial infarction: 2008-09 revision. *International Journal of Epidemiology*, 40(1), pp.139–146.
- Mijaljica, D., Prescott, M. & Devenish, R.J., 2011. Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*, 7(7), pp.673–682.
- Milner, D.J. et al., 1996. Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *Journal of Cell Biology*, 134(5), pp.1255–1270.
- Mishra, S. et al., 2003. Reduced Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase activity and expression in LV myocardium of dogs with heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284(3), pp.H876–83.
- Mochly-Rosen, D., Das, K. & Grimes, K. V., 2012. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(12), pp.937–957.
- Monreal, G. et al., 2008. Cytoskeletal remodeling of desmin is a more accurate measure of cardiac dysfunction than fibrosis or myocyte hypertrophy. *Life Sciences*, 83(23-24), pp.786–794.
- Mori, M. et al., 2015. Hsp90 inhibitor induces autophagy and apoptosis in osteosarcoma cells. *International Journal of Oncology*, 46(1), pp.47–54.
- Moulton, V.R., Gillooly, A.R. & Tsokos, G.C., 2014. Ubiquitination Regulates Expression of the Serine/Arginine-rich Splicing Factor 1 (SRSF1) in Normal and Systemic Lupus Erythematosus (SLE) T Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 289(7), pp.4126–4134.
- Mudd, J.O. & Kass, D. a, 2008. Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature*, 451(7181), pp.919–928.
- Mulder, P. et al., 1997. Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: effect of long-term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling. *Circulation*, 96(6), pp.1976–1982.
- Münzel, T. et al., 2015. Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications. *European Heart Journal*, 36(38), pp.2555–2564.

- N -

- Nishida, K., Yamaguchi, O. & Otsu, K., 2015. Degradation systems in heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 84, pp.212–222.
- Nixon, R.A., 2013. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nature Medicine*, 19(8), pp.983–997.
- Ntelios, D. et al., 2015. Mechanical aberrations in hypertrophic cardiomyopathy: emerging concepts. *Frontiers in Physiology*, 6(232).

- O -

O'Connor, C.M.O. & Gard, D.L., 1981. Phosphorylation of Intermediate Filament Proteins by cAMP-Dependent Protein Kinases. *Cell*, 23, pp.135–143.

- P -

Pandey, U.B. et al., 2007. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature*, 447(7146), pp.859–863.

Park, C. & Cuervo, A.M., 2013. Selective Autophagy: Talking with the UPS. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 67, pp.3–13.

Patel, B. & Cuervo, A.M., 2015. Methods to study chaperone-mediated autophagy. *Methods*, 75, pp.133–140.

Paulin, D. & Li, Z., 2004. Desmin: A major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Experimental Cell Research*, 301(1), pp.1–7.

Pawlak, A. et al., 2012. Type of desmin expression in cardiomyocytes - a good marker of heart failure development in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of Internal Medicine*, 272(3), pp.287–297.

Pedrozo, Z. et al., 2013. Cardiomyocyte ryanodine receptor degradation by chaperone-mediated autophagy. *Cardiovascular Research*, 98(2), pp.277–285.

Periasamy, M. & Kalyanasundaram, A., 2008. SERCA2a gene therapy for heart failure: ready for primetime? *Molecular therapy*, 16(6), pp.1002–1004.

Pfeffer, M. et al., 1985. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation*, 72, pp.406–412.

- R -

Ravikumar, B. et al., 2010. Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology. *Physiological reviews*, 90, pp.1383–1435.

Reddy, K., Khaliq, A. & Henning, R.J., 2015. Recent advances in the diagnosis and treatment of acute myocardial infarction. *World Journal of Cardiology*, 7(5), pp.243–276.

Roger, V.L. et al. 2004. Trends in Heart Failure Incidence and Survival in a Community-Based Population. *JAMA*, 292(3), pp.344–350.

Ross, J., Olson, L. & Coppotelli, G., 2015. Mitochondrial and Ubiquitin Proteasome System Dysfunction in Ageing and Disease: Two Sides of the Same Coin? *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), pp.19458–19476.

Rothenberg, C. et al., 2010. Ubiquitin functions in autophagy and is degraded by chaperone-mediated autophagy. *Human molecular genetics*, 19(16), pp.3219–3232.

Rourke, B.O. et al., 1999. Mechanisms of Altered Excitation-Contraction Coupling in Experimental Studies. *Heart*, 84(5), pp.562–570.

- S -

Savoie, C. et al., 2006. Left ventricular remodeling after anterior wall acute myocardial infarction in modern clinical practice (from the REmodelage VEentriculaire [REVE] study group). *The American journal of cardiology*, 98(9), pp.1144–9.

Saxena, A., Russo, I. & Frangogiannis, N.G., 2015. Inflammation as a therapeutic target in myocardial infarction: learning from past failures to meet future challenges. *Translational Research*, pp.1–15.

Scarlatti, F. et al., 2008. Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death and Differentiation*, 15(8), pp.1318–1329.

Schaart, G. et al., 1989. Desmin and titin expression in early postimplantation mouse embryos. *Development*, 107(3), pp.585–596.

Schaper, J. et al., 1991. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 83(2), pp.504–514.

Senyo, S.E. et al., 2012. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*, 493(7432), pp.433–436.

Shchemelinin I., Sefc L. & Necas E., 2006. Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases. *Folia Biologica (Praha)*, 52, pp.81–100.

Shearer, F., Lang, C.C. & Struthers, A.D., 2013. Renin–Angiotensin–Aldosterone System Inhibitors in Heart Failure. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 94(4), pp.459–467.

Shires, S.E. & Gustafsson, Å.B., 2015. Mitophagy and heart failure. *Journal of Molecular Medicine*, pp.253–262.

Snider, N.T. & Omary, M.B., 2014. Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nature Reviews Molecular cell biology*, 15(3), pp.163–77.

Solaro, R.J., 2010. Sarcomere control mechanisms and the dynamics of the cardiac cycle. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, p.105648.

Sossalla, S. et al., 2010. Inhibition of elevated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circulation Research*, 107(9), pp.1150–1161.

Spaendonck-Zwarts, K. et al., 2011. Desmin-related myopathy. *Clinical Genetics*, 80(4), pp.354–366.

Stricher F. et al., 2013. HSPA8/HSC70 chaperone protein: structure, function, and chemical targeting. *Autophagy*, 9(12), pp.1937–1954.

Shintani T. & Klionsky, D.J., 2004. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 306(5698), pp.990–995.

St John Sutton M., et al., 1994. Quantitative two-dimensional echocardiographic measurements are major predictors of adverse cardiovascular events after acute myocardial infarction. The protective effects of captopril. *Circulation*, 89, pp.68–75.

- T -

Taegtmeyer, H., 2002. Switching Metabolic Genes to Build a Better Heart. *Circulation*, 106(16), pp.2043–2045.

Taegtmeyer, H., Sen, S. & Vela, D., 2010. Return to the fetal gene program. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1188(1), pp.191–198.

Tang, W.H. et al., 2007. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical Utilization of Cardiac Biomarker Testing in Heart Failure. *Circulation*, 116(5), pp.e99–e109.

Tannous, P. et al., 2008. Intracellular protein aggregation is a proximal trigger of cardiomyocyte autophagy. *Circulation*, 117(24), pp.3070–3078.

Tham, Y.K. et al., 2015. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Archives of Toxicology*, pp.1401–1438.

Thornell, L. et al., 1997. Null mutation in the desmin gene gives rise to a cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 29(8), pp.2107–2124.

Thottakara, T. et al., 2015. The E3 ubiquitin ligase Asb2 β is downregulated in a mouse model of hypertrophic cardiomyopathy and targets desmin for proteasomal degradation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 87, pp.214–224.

Thygesen, K. et al., 2012. Third Universal Definition of Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 60(16), pp.1581–1598.

Tiyyagura, S.R. & Pinney, S.P., 2006. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: past, present, and future. *Mount Sinai Journal of Medicine*, 73(6), pp.840–851.

Tortora, G.J. & Derrickson, B.H., 2006. Principales of Anatomy and Physiology, 11th Edition. Wiley, J. & Sons, 2006, Figure 20-9a.

- W -

Wang, C. & Wang, X., 2014. The interplay between autophagy and the ubiquitin-proteasome system in cardiac proteotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1852(2), pp.188–194.

Wang, X. et al., 2002. Desmin filaments and cardiac disease: establishing causality. *Journal of Cardiac failure*, 8(6 Suppl), pp.S287–S292.

Wang, Z. V & Hill, J.A., 2015. Protein Quality Control and Metabolism: Bidirectional Control in the Heart. *Cell Metabolism*, 21(2), pp.215–226.

- Weihl, C.C., 2013. Monitoring Autophagy in the Treatment of Protein Aggregate Diseases: Steps Toward Identifying Autophagic Biomarkers. *Neurotherapeutics*, 10, pp.383–390.
- Winter, D.L. et al., 2014. Posttranslational modifications of desmin and their implication in biological processes and pathologies. *Histochemistry and Cell Biology*, 141(1), pp.1–16.
- Wu, S.C. & Solaro, R.J., 2007. Protein Kinase C : a novel regulator of both phosphorylation and dephosphorylation of cardiac sarcomeric proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 282(42), pp.30691–30698.

- Y -

- Yar, S., Monasky, M.M. & Solaro, R.J., 2014. Maladaptive modifications in myofilament proteins and triggers in the progression to heart failure and sudden death. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 466(6), pp.1189–97.
- Yin, Z., Ren, J. & Guo, W., 2015. Sarcomeric protein isoform transitions in cardiac muscle: A journey to heart failure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1852(1), pp.47–52.

- Z -

- Zhai, P. et al., 2011. Differential roles of GSK-3 β During Myocardial Ischemia and Ischemia/Reperfusion. *Circulation Research*, 109, pp.502–511.
- Zhang, H. et al., 2010. Selective degradation of aggregate-prone CryAB mutants by HSPB1 is mediated by ubiquitin-proteasome pathways. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 49(6), pp.918–30.
- Zhang, H. & Burrows, F., 2004. Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90. *Journal of Molecular Medicine*, 82, pp.488–499.
- Zhang, K. & Kaufman, R.J., 2008. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*, 454(7203), pp.455–462.
- Zhao, Y. et al., 2014. Dynamic Alterations in the Ca_v 1.2/CaM/CaMKII Signaling Pathway in the Left Ventricular Myocardium of Ischemic Rat Hearts. *DNA and Cell Biology*, 33(5), pp.282–290.
- Zheng, H. et al., 2010. Doxycycline attenuates protein aggregation in cardiomyocytes and improves survival of a mouse model of cardiac proteinopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 56(17), pp.1418–1426.
- Zhu, H. et al., 2007. Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(7), pp.1782–93.



Annexes

