



HAL
open science

Développement d'une nouvelle approche thérapeutique basée sur IGF-1 pour la cardiomyopathie dilatée dans un modèle de hamster déficient en delta-sarcoglycane

Armelle Serose

► To cite this version:

Armelle Serose. Développement d'une nouvelle approche thérapeutique basée sur IGF-1 pour la cardiomyopathie dilatée dans un modèle de hamster déficient en delta-sarcoglycane. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2007. Français. NNT: . tel-00186657

HAL Id: tel-00186657

<https://theses.hal.science/tel-00186657>

Submitted on 10 Nov 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS 7 – DENIS DIDEROT
UFR Institut d'Hématologie – Ecole Doctorale Biologie et Biotechnologie
Laboratoire INSERM U582 – Institut de Myologie

THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de
Doctorat de l'Université Paris 7

Spécialité Thérapeutiques Biotechnologiques

Présentée par
Armelle SEROSE

DEVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE APPROCHE THERAPEUTIQUE
BASEE SUR IGF-1 POUR LA CARDIOMYOPATHIE DILATEE
DANS UN MODELE DE HAMSTER DEFICIENT EN δ -SARCOGLYCANE

Dirigée par Marc Y. Fiszman

Soutenue publiquement le 14 septembre 2007

Devant le jury composé de

| | |
|-----------------------|--------------------|
| Pr Ali Saïb | Président |
| Pr Evelyne Friederich | Rapporteur |
| Pr Daniel Henrion | Rapporteur |
| Dr Richard Isnard | Examineur |
| Marc Fiszman | Directeur de thèse |

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier le Dr Ketty Schwartz, directrice de l'unité Inserm U523 "Génétique, physiopathologie et thérapies des affections des muscles squelettiques et cardiaques", ainsi que le Dr Pascale Guicheney, qui lui a succédé à la direction de l'unité Inserm U582 "Physiopathologie et thérapie du muscle strié", pour m'avoir accueillie au sein de leurs unités de recherche afin de me permettre d'y réaliser mon stage de maîtrise puis mon DEA et ma thèse.

J'aimerais remercier Marc Fiszman pour avoir accepté de diriger ma thèse et s'être laissé convaincre du bien-fondé de ce travail, mais également pour l'attention qu'il m'a portée et l'expérience dont il m'a fait profiter. Je le remercie aussi pour les discussions scientifiques enrichissantes que nous avons pu partager, notamment au moment de l'écriture de mes articles et de ce manuscrit.

Je pense qu'aucun mot ne pourra me permettre d'exprimer toute la gratitude que j'ai envers le Dr Yves Fromes car sans lui, cette thèse ne serait pas. Je lui adresse ici mes remerciements les plus sincères pour la confiance qu'il m'a accordée en me donnant l'opportunité de travailler sur ce sujet, pour la liberté dont j'ai bénéficié dans mon travail, ainsi que pour sa disponibilité et son soutien sans faille tout au long de ces années.

J'adresse tous mes remerciements au Pr. Ali Saïb, pour avoir accepté de présider mon jury de soutenance de thèse, ainsi qu'au Pr. Evelyne Friederich et au Pr. Daniel Henrion, pour tout l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et pour avoir accepté de le juger, et enfin au Dr Richard Isnard pour avoir accepté de participer à ce jury.

Je souhaite ensuite remercier toutes les personnes dont le travail a directement contribué à la réalisation de cette thèse. Merci tout d'abord à André Salmon, pour le soin qu'il a accordé à nos petits hamsters et les heures qu'il a passées à réaliser des coupes de cœurs et des colorations histologiques, mais également pour tout ce qu'il a fait pour moi, au sein du labo ou à l'extérieur. Qu'il trouve ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de toute mon amitié. Merci à Marie-Agnès Doyennette, pour le savoir-faire, et bien plus encore, qu'elle a accepté de partager avec moi et qui m'a permis d'effectuer une grande partie de mon travail à la paillasse. Merci également à Valérie Allamand pour m'avoir initié à la PCR quantitative et m'avoir appris à faire un Western blot, pour avoir accepté de lire une partie de ce manuscrit mais aussi pour son amitié, son soutien et ses conseils quotidiens. Merci à Myriam Berthet et à Marc Bitoun pour avoir bien voulu séquencer mes petits ADN de hamster, inconnus dans les banques de données! Un grand merci aussi à Isabelle Marty d'avoir accepté de réaliser les Western blots de la protéine RyR et pour sa grande

disponibilité. Merci à Bernard Prudhon pour son travail de clonage et pour toutes les réponses qu'il a apportées à mes questions de biologie moléculaire. Merci à Nicolas Brunet et à Florence Laur, de chez Roche, pour l'aide technique qu'ils m'ont fourni dans la mise au point de mes PCR quantitatives. Enfin, merci à Nathalie Haslin, qui m'a fait gagner des heures précieuses dans mes recherches bibliographiques.

Je tiens à témoigner toute mon amitié aux membres du groupe d'Yves, Héroïse Mongue-Din, Caroline Roques et Bodvaël Fraysse, et à les remercier sincèrement pour leur présence à mes côtés pendant ces années. Merci aussi à toutes les personnes de l'équipe de Marc, passées et présentes, qui ont partagé dans la bonne humeur mes heures de travail dans le labo 99, Isabelle Garcin, Agnès Maurel, Claire Carrion, Séverine Lecourt, Karine Vauchez et Cyril Catelain.

Je remercie également tous les membres du laboratoire, et particulièrement Frédéric Chevessier, Stéphanie Bauché-Godart et Virginie Carmignac, pour leur sympathie et leur aide durant toutes ces années, ainsi que toute la troupe très conviviale du labo de RMN de Pierre Carlier, pour les délicieux moments culinaires que nous avons partagés! Merci également à Olivier Maisetti pour son soutien et ces “moments entre parenthèses” que nous avons passés ensemble.

J'associe à mes remerciements la Fondation Electricité de France ainsi que l'Association Française contre les Myopathies pour leurs soutiens financiers sans lesquels je n'aurai jamais pu réaliser cette thèse.

Pour finir, mes remerciements ne seraient pas complets, si j'oubliais de citer toutes les personnes qui ont compté pour moi ces dernières années et qui m'ont soutenu tout au long du chemin. Mille mercis à mes parents pour m'avoir permis de faire ce que j'aime, ainsi qu'à mes sœurs et mon frère et toute ma grande famille pour leur amour.

Merci également à Floris et à mes amis de toujours, en particulier Mag, pour sa présence de tous les instants, et aussi Guillaume, Aurélie, Nico, Benji, Gilles, Frédéric, Marina et Maryline. Merci aussi à mes amis de l'IUP d'Evry, Aude, Valérie, Sophie et Erik, et à mes amies de DEA, Gilliane et Stéphanie.

Merci à tous pour m'avoir "supportée" dans les moments difficiles et pour avoir toujours été là pour moi.

La Science ? Après tout, qu'est-elle, sinon une longue et systématique curiosité ?

André Maurois

RESUME

Les patients atteints de dystrophies musculaires présentent de plus en plus fréquemment des complications cardiaques, qui sont majoritairement des cardiomyopathies dilatées (CMD), et qui déterminent leur pronostic vital. Dans ce contexte, les traitements de l'atteinte cardiaque sont ceux de l'insuffisance cardiaque, qui agissent sur l'environnement fonctionnel du cœur, mais pas directement sur l'atteinte myocardique.

L'objectif de cette thèse a été d'évaluer les effets d'un traitement novateur de la CMD dans les dystrophies musculaires, en utilisant le hamster de la lignée CHF147. La démarche proposée est d'induire un phénomène compensateur de la dilatation cardiaque et ainsi d'améliorer le pronostic vital, en utilisant les propriétés de l'Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1).

Des hamsters CHF147 jeunes ont été traités pendant un temps court, de façon systémique avec la protéine recombinante IGF-1 (rhIGF-1) à faible dose. Les effets macroscopiques, histologiques et fonctionnels du traitement ont été évalués 35 jours après le début de celui-ci et les voies de signalisation impliquées dans l'induction des effets observés ont été étudiées. Une étude de survie a été réalisée afin de mesurer les effets du traitement à long terme. L'évaluation des effets à court terme de l'administration de rhIGF-1 sur la CMD du hamster CHF147 indique un ralentissement de la dilatation des cavités cardiaques ainsi que de l'extension de la fibrose myocardique, et une préservation de multiples paramètres fonctionnels, tels que le débit cardiaque, le volume d'éjection, la pression de fin de diastole et, en particulier, la contractilité myocardique. Les effets observés sont dus en partie à des modifications au niveau des protéines impliquées dans le cycle du calcium. A long terme, la survie des hamsters CHF147 traités augmente significativement d'environ 20% et est associée à une préservation partielle de la fonction cardiaque.

Toutefois, une augmentation du niveau sérique d'IGF-1 pourrait augmenter le risque d'effets secondaires délétères. Afin de limiter les effets systémiques d'IGF-1 et de cibler son administration au cœur, nous avons injecté localement le plasmide pCMV-IGF1 codant pour l'IGF-1 dans le myocarde des hamsters CHF147. Les effets du traitement ont été évalués après 35 jours et montrent des résultats comparables à ceux obtenus avec la protéine rhIGF-1.

En conclusion, ce travail de thèse a montré qu'un traitement basé sur IGF-1 permet de ralentir l'évolution de la CMD des hamsters CHF147, en préservant la structure et la fonction cardiaques, et d'améliorer significativement leur survie. IGF-1 semble donc être un candidat prometteur pour la mise au point d'une approche par thérapie génique dans l'insuffisance cardiaque, due à une CMD, dans le contexte des dystrophies musculaires.

Mots clés : cardiomyopathie dilatée, dystrophie musculaire, insuffisance cardiaque, sarcoglycanopathie, IGF-1, hamster, calcium.

ABSTRACT

Cardiac disorders, among which dilated cardiomyopathy (DCM) is the most common form, are more and more frequently diagnosed in patients affected by muscular dystrophies and largely determine their vital prognosis. In this context, treatments of DCM are those of heart failure that act on the cardiac functional environment but not directly on cardiac muscle.

The goal of this thesis was to evaluate the effects of an innovative treatment of DCM in muscular dystrophies, using the hamster strain CHF147. The approach proposed here is to induce a compensatory phenomenon of cardiac dilatation, and thus to improve vital prognosis, using the Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) properties.

Young CHF147 hamsters were treated during a short period and systemically with IGF-1 recombinant protein (rhIGF-1) at low dose. The macroscopic, histological and functional effects of the treatment were evaluated after 35 days and signalling pathways implicated in the induction of the observed effects were studied. A survival study was realized in order to assess long-term effects of the treatment. Evaluation of the short-term effects of rhIGF-1 administration on CHF147 hamster's DCM show that dilatation of cardiac cavities and myocardial fibrosis are slowed down, and multiple functional parameters, such as cardiac output, stroke volume, end diastolic pressure and in particular myocardial contractility are preserved. The observed effects are partly due to modifications of proteins implicated in calcium cycle. At long term, survival of treated CHF147 hamsters is significantly improved of about 20% and is associated with a partial preservation of the cardiac function.

However, an increase of IGF-1 serum level could raise the risk for deleterious secondary effects. In order to limit systemic effects of IGF-1 and to target its administration to the heart, we have injected locally the pCMV-IGF1 plasmid coding for IGF-1 in the myocardium of CHF147 hamsters. The effects of the treatment were evaluated after 35 days and showed comparable results as those obtained using rhIGF-1.

In conclusion, this work has shown that a treatment based on IGF-1 allows slowing down the evolution of the CHF147 hamsters' DCM, by preserving the cardiac structure and function, and significantly improves their survival. Thus IGF-1 seems to be a promising candidate to set up a gene therapy approach in heart failure due to DCM in the context of muscular dystrophies.

Key words: dilated cardiomyopathy, muscular dystrophy, heart failure, sarcoglycanopathy, IGF-1, hamster, calcium.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| ABRÉVIATIONS | 10 |
| GLOSSAIRE | 12 |
| INTRODUCTION | 14 |
| A- LA DYSTROPHINE ET SON COMPLEXE DE PROTEINES ASSOCIEES | 16 |
| 1) <i>Description du complexe des protéines associées à la dystrophine</i> | 16 |
| 2) <i>Assemblage et liens entre les différents constituants du DAPC : de la matrice extracellulaire au cytosquelette contractile</i> | 34 |
| 3) <i>Rôle du complexe des protéines associées à la dystrophine</i> | 42 |
| B- LA CARDIOMYOPATHIE DILATEE ET L'INSUFFISANCE CARDIAQUE DANS LE CONTEXTE DES SARCOGLYCANOPATHIES | 45 |
| 1) <i>Les sarcoglycanopathies, une forme de dystrophie musculaire</i> | 45 |
| 2) <i>L'atteinte cardiaque dans les sarcoglycanopathies</i> | 52 |
| 3) <i>Modèles animaux de saroglycanopathies et de dystrophinopathies</i> | 61 |
| C- UN MODELE ANIMAL DE DYSTROPHIE MUSCULAIRE ASSOCIEE A UNE CARDIOMYOPATHIE DILATEE : LE HAMSTER DE LA LIGNEE CHF147 | 66 |
| 1) <i>Généalogie de la lignée CHF147</i> | 66 |
| 2) <i>Identification de la mutation portée par les hamsters cardiomyopathes</i> | 67 |
| 3) <i>Description de la pathologie chez le hamster cardiomyopathe</i> | 69 |
| 4) <i>Conséquences moléculaires de la délétion en δ-sarcoglycane au niveau du DAPC chez le hamster cardiomyopathe</i> | 73 |
| 5) <i>Utilisation du hamster cardiomyopathe pour le développement de nouvelles thérapeutiques de l'atteinte cardiaque</i> | 75 |
| D- L'INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-1 (IGF-1) | 80 |
| 1) <i>Généralités sur les IGF</i> | 80 |
| 2) <i>IGF-1, du gène à la protéine</i> | 81 |
| 3) <i>Rôle d'IGF-1 dans le cœur</i> | 86 |
| 4) <i>Hypertrophie physiologique et pathologique</i> | 89 |
| 5) <i>Voies de signalisation moléculaire stimulées par IGF-1</i> | 89 |
| PROBLEMATIQUE DE LA THESE | 97 |
| MATERIELS ET METHODES | 98 |
| A- ANIMAUX | 98 |
| 1) <i>Modèles animaux</i> | 98 |
| 2) <i>Génotypage des hamsters par PCR</i> | 98 |
| 3) <i>Anesthésie et sacrifice des animaux</i> | 100 |
| 4) <i>Technique d'administration de la protéine recombinante rhIGF-1</i> | 100 |
| 5) <i>Technique d'injection du plasmide pCMV-IGF1</i> | 101 |
| 6) <i>Suivi des animaux</i> | 101 |
| 7) <i>Prélèvement du sang et du cœur</i> | 101 |

| | | |
|----|---|-----|
| B- | PROCOLES D'ETUDES | 102 |
| C- | HISTOLOGIE, IMMUNOHISTOCHEMIE | 104 |
| 1) | <i>Coupes de cœurs de hamsters</i> | 104 |
| 2) | <i>Histologie</i> | 104 |
| 3) | <i>Mesure de la fibrose</i> | 105 |
| 4) | <i>Immunohistochimie</i> | 105 |
| D- | BIOLOGIE MOLECULAIRE | 109 |
| 1) | <i>Clonage du plasmide pCMV-IGF1</i> | 109 |
| 2) | <i>Production du plasmide pCMV-IGF1</i> | 110 |
| 3) | <i>Extraction d'ARN totaux de cœur</i> | 111 |
| 4) | <i>Transcription inverse des ARN totaux en ADNc</i> | 111 |
| 5) | <i>PCR semi-quantitative en temps réel</i> | 111 |
| E- | BIOLOGIE CELLULAIRE | 114 |
| 1) | <i>Transfection du plasmide pCMV-IGF1 dans les cellules HEK293</i> | 114 |
| F- | BIOCHIMIE | 115 |
| 1) | <i>Dosages par ELISA</i> | 115 |
| 2) | <i>Extraction des protéines totales de cœurs de hamsters</i> | 115 |
| 3) | <i>Extraction des protéines totales de cardiocytes de hamsters en culture</i> | 115 |
| 4) | <i>Dosage des extraits protéiques</i> | 116 |
| 5) | <i>Western blots</i> | 116 |
| G- | PHYSIOLOGIE | 120 |
| 1) | <i>Cathétérisme cardiaque</i> | 120 |
| 2) | <i>Echocardiographie</i> | 121 |
| 3) | <i>Electrocardiogramme</i> | 121 |
| H- | STATISTIQUES | 123 |

RESULTATS **124**

| | | |
|----|--|-----|
| A- | CARACTERISATION DE LA LIGNEE DE HAMSTERS CHF147 | 124 |
| B- | ETUDE DES EFFETS A COURT TERME D'UN TRAITEMENT COURT AVEC LA PROTEINE RHIGF-1 SUR LA CMD DES HAMSTERS CHF147 | 127 |
| 1) | <i>Choix de la dose de protéine délivrée</i> | 127 |
| 2) | <i>Effets de la durée de délivrance de la protéine rhIGF-1</i> | 127 |
| 3) | <i>Le traitement permet de préserver la morphologie cardiaque</i> | 127 |
| 4) | <i>Analyse fonctionnelle des effets du traitement par rhIGF-1</i> | 132 |
| C- | ETUDE DES VOIES DE SIGNALISATIONS MOLECULAIRES IMPLIQUEES DANS L'INDUCTION DES EFFETS BENEFIQUES OBSERVES APRES TRAITEMENT PAR RHIGF-1 | 135 |
| 1) | <i>Effets du traitement sur les voies de signalisation d'IGF-1</i> | 135 |
| 2) | <i>Effets du traitement par rhIGF-1 sur des constituants structurels des cardiomyocytes</i> | 137 |
| 3) | <i>Effets du traitement sur le cycle du calcium</i> | 139 |
| D- | ETUDE DES EFFETS A LONG TERME D'UN TRAITEMENT COURT AVEC LA PROTEINE RHIGF-1 SUR LA CMD DES HAMSTERS CHF147 | 143 |
| 1) | <i>La survie est améliorée après traitement par rhIGF-1</i> | 143 |
| 2) | <i>Le traitement par rhIGF-1 permet de préserver la fonction cardiaque</i> | 144 |
| 3) | <i>Effets du traitement sur la morphologie et la structure cardiaques</i> | 146 |
| E- | ETUDE DES EFFETS DU TRANSFERT DU GENE IGF-1 SUR LA CMD DES HAMSTERS CHF147 | 150 |
| 1) | <i>Vérification de la cassette d'expression du plasmide in vitro et in vivo</i> | 150 |

| | |
|---|------------|
| 2) <i>L'injection de plasmide pCMV-IGF1 n'entraîne pas de réponse inflammatoire ou immunitaire de la part du myocarde</i> | 151 |
| 3) <i>L'injection de pCMV-IGF1 maintient la morphologie cardiaque</i> | 152 |
| 4) <i>Effets fonctionnels du transfert du gène IGF-1 dans le myocarde</i> | 155 |
| DISCUSSION | 159 |
| PERSPECTIVES | 171 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 172 |
| ANNEXES | 189 |
| A- ANNEXE 1 : SOLUTIONS UTILISEES POUR LES WESTERN BLOTS | 189 |
| B- ANNEXE 2 : ARTICLE 1 | 190 |
| C- ANNEXE 3 : ARTICLE 2 | 201 |

ABRÉVIATIONS

| | |
|---------------------|---|
| AAV | Adeno-Associated Virus |
| ADN | Acide DésoxyriboNucléique |
| ADNc | ADN complémentaire |
| ADNg | ADN génomique |
| AdV | Adénovirus |
| ALS | Acid-Labile Subunit |
| ARN | Acide RiboNucléique |
| ARNm | ARN messenger |
| ATP | Adénosine TriPhosphate |
| | |
| CMD | CardioMyopathie Dilatée |
| CMH | CardioMyopathie Hypertrophique |
| | |
| DAG | Dystrophin-Associated Glycoprotein |
| DAP | Dystrophin-Associated Protein |
| DAPC | Dystrophin-Associated Protein Complex |
| DGC | Dystroglycan Complex |
| DHPR | DiHydroPyridine Receptor |
| DMB | Dystrophie Musculaire de Becker |
| DMD | Dystrophie Musculaire de Duchenne |
| | |
| ECG | Electrocardiogramme |
| eEF | eukaryote Elongation Factor |
| eIF | eukaryote Initiation Factor |
| ELISA | Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay |
| ERK | Extracellular signal-Related Kinase |
| | |
| FISH | Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization |
| | |
| Grb2 | Growth factor receptor-bound protein 2 |
| GSK-3 β | Glycogen Synthase Kinase-3 β |
| | |
| IC | Insuffisance cardiaque |
| IEC | Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion |
| IGF-1 | Insulin-like Growth Factor-1 |
| IGFBP | IGF Binding Protein |
| IRS-1 | Insulin Receptor Substrate-1 |
| | |
| kb | kilo bases |
| kDa | kilo Daltons |
| KO | Knock-Out |
| | |
| LGMD | Limb-Girdle Muscular Dystrophy |
| | |
| MAPK ou MAP kinases | Mitogen Activated Protein Kinases |
| MAPKK | MAPK Kinases |
| MAPKKK | MAPK Kinases Kinases |

| | |
|-------------------------|---|
| MEK | MAPK/ERK Kinases |
| MMP | Matrix MetalloProteinase |
| mTOR | mammalian Target Of Rapamycin |
| NCX | Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger |
| NO | Nitric Oxyde, monoxyde d'azote |
| NOS | NO Synthase |
| pb | paire de bases |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PDK1 | 3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase-1 |
| PH | Pleckstrin Homology |
| pI | point Isoélectrique |
| PI3 kinase, PI3K | Phosphatidyl-Inositol-3 kinase |
| PI(3,4)P ₂ | Phosphatidyl-Inositol (3,4)-bisphosphate |
| PI(4,5)P ₂ | Phosphatidyl-Inositol (4,5)-bisphosphate |
| PI(3,4,5)P ₃ | Phosphatidyl-Inositol (3,4,5)-trisphosphate |
| PLN ou PLB | Phospholamban |
| PP2A | Protéine Phosphatase 2A |
| PTEN | Phosphatase and TENsin homologous on chromosome 10 |
| rhIGF-1 | recombinant human IGF-1 |
| R-IGF1 | Récepteur de l'IGF-1 |
| RyR2 | Ryanodine Receptor-2 |
| SCARMD | Severe Childhood Autosomal Recessive Muscular Dystrophy |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfate |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis |
| SERCA2a | Sarcoplasmic Reticulum ATPase 2a |
| SGC | Sarcoglycan Complex |
| SG-SPN | Sarcoglycanes-Sarcospane |
| SH | SRC homology region |
| UBF | Upstream Binding Factor |
| UTR | UnTranslated Region |
| VD | Ventricule droit |
| VG | Ventricule gauche |

GLOSSAIRE

Note au lecteur : les mots définis dans le glossaire sont soulignés en pointillés dans le texte.

| | |
|----------------------------|--|
| Ascite | Accumulation de liquide dans la cavité formée par le péritoine (membrane qui tapisse la cavité interne de l'abdomen et ses viscères). |
| Bathmotrope | Se rapporte à l'excitabilité myocardique : un médicament bathmotrope positif augmente l'excitabilité cardiaque alors qu'un médicament bathmotrope négatif la diminue. |
| Cardioplégie froide | Technique utilisée en chirurgie cardiaque et qui consiste à provoquer l'arrêt de l'activité du muscle cardiaque en injectant, dans la racine de l'aorte ou dans le sinus coronaire, une solution dite "cardioplégique" à +4°C. |
| Chronotrope | Se rapporte à la variation du rythme cardiaque : un médicament chronotrope positif accélère la fréquence cardiaque alors qu'un médicament chronotrope négatif la ralentit. |
| Cyanose | Symptôme qui se traduit par une coloration bleutée de la peau et des muqueuses et qui est dû à la présence en quantité importante d'hémoglobine désoxygénée dans le sang. |
| Diastole | Phase de relaxation du cœur au cours de laquelle les cavités se remplissent. |
| Glomérulonéphrite | Inflammation des glomérules (unités de filtration) du rein. |
| Hydrothorax | Accumulation de liquide dans les cavités formées par la plèvre (membrane qui tapisse la cavité intra-thoracique et ses viscères) survenant au cours de certaines affections cardiaques ou rénales. |
| Inotrope | Se rapporte à la contractilité myocardique : un médicament inotrope positif augmente la contractilité cardiaque alors qu'un médicament inotrope négatif la diminue. |
| Laparotomie | Incision chirurgicale de la paroi abdominale et du péritoine. |
| Myolyse | Destruction des cellules musculaires. |
| Phrénotomie | Incision chirurgicale du diaphragme. |
| Pléiotrope | Se dit d'un composé ou d'une substance qui peut agir sur plusieurs cibles, produisant des effets apparemment indépendants les uns des autres. |

| | |
|------------------|---|
| Pycnose | Condensation irréversible de la chromatine dans le noyau d'une cellule en mort cellulaire programmée ou en nécrose. |
| Systole | Phase de contraction du cœur au cours de laquelle les cavités se vident. |
| Tubules T | Invaginations de la membrane plasmique qui contiennent des canaux et des transporteurs ioniques qui sont spatialement proches des canaux ioniques du réticulum sarcoplasmique permettant ainsi un couplage excitation – contraction efficace. |

INTRODUCTION

L'atteinte primaire des patients atteints de dystrophies musculaires a des retentissements sur les muscles squelettiques mais également sur le muscle cardiaque. La forme la plus fréquente d'atteinte cardiaque retrouvée chez les patients myopathes est la cardiomyopathie dilatée, qui évolue progressivement vers l'insuffisance cardiaque et qui est le déterminant majeur du pronostic vital d'une grande partie des patients. Il semble donc indispensable de traiter l'atteinte musculaire mais également l'atteinte cardiaque chez les patients myopathes. Dans le contexte des dystrophies musculaires, les traitements de l'atteinte cardiaque actuellement utilisés sont ceux de l'insuffisance cardiaque, qui agissent essentiellement sur l'environnement fonctionnel du cœur. Cependant, les limites de ces traitements sont connues et il apparaît aujourd'hui indispensable de développer de nouvelles approches thérapeutiques agissant directement sur le muscle cardiaque, et non pas seulement sur son environnement. Ce développement de nouvelles thérapeutiques est rendu possible grâce à la disponibilité de modèles animaux pertinents, présentant des dystrophies musculaires associées à une atteinte cardiaque.

Dans une première partie, je décrirai la dystrophine et son complexe de protéines associées. Ce complexe est constitué d'un grand nombre de protéines associées au sein du sarcolemme, la membrane plasmique des cellules musculaires, et permet de faire le lien entre les protéines de la matrice extracellulaire et les protéines du cytosquelette. Je détaillerai les caractéristiques de chacune de ces protéines, ainsi que leur processus d'assemblage en un complexe intégré à la membrane. Enfin, je m'attacherai à montrer le rôle structural mais également le rôle fonctionnel de ce complexe dans le muscle. Le complexe des protéines associées à la dystrophine est d'une grande importance dans les dystrophies musculaires. En effet, toutes les mutations viables recensées à ce jour dans ce complexe sont à l'origine de dystrophies musculaires.

Dans une deuxième partie, je me focaliserai plus particulièrement sur une catégorie de dystrophie musculaire, les sarcoglycanopathies, un sous-type de dystrophies musculaires des ceintures qui affectent essentiellement les muscles situés autour de la région scapulaire (épaules) et de la région pelvienne (hanches). J'aborderai également l'importance de la cardiomyopathie dilatée et de l'insuffisance cardiaque dans le contexte des dystrophies musculaires et j'évoquerai les traitements actuellement utilisés dans l'atteinte cardiaque. Enfin, je passerai en revue les différents modèles animaux de cardiomyopathie dilatée qui sont aujourd'hui à la disposition des chercheurs.

La troisième partie sera consacrée à la description du modèle animal utilisé dans ce travail. Ce modèle est le hamster cardiomyopathe de la lignée CHF147. Je retracerai l'arbre

généalogique de cette lignée et je rapporterai la mise en évidence de la mutation portée par ces hamsters. Je détaillerai les conséquences de cette mutation au niveau musculaire chez les hamsters cardiomyopathes, à la fois d'un point de vue structurel, fonctionnel et moléculaire. Enfin, j'évoquerai les différents traitements étiologiques, d'une part, et symptomatiques, d'autre part, qui ont été testés dans ce modèle.

Finalement, la dernière partie traitera de l'Insulin-like Growth Factor-1, ou IGF-1, facteur de croissance que nous avons utilisé pour le développement d'une approche thérapeutique nouvelle de la cardiomyopathie dilatée dans le contexte des dystrophies musculaires. Je décrirai en détail la structure du gène et de la protéine IGF-1, ainsi que les régulations qui interviennent aux niveaux transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel. J'aborderai également la régulation de la synthèse et de la disponibilité d'IGF-1 *in vivo*. Je détaillerai, ensuite, le rôle d'IGF-1 dans l'organisme, et notamment dans le cœur. Pour finir, je présenterai les différentes voies de signalisation d'IGF-1 dans l'hypertrophie musculaire.

Dans ce contexte général, le but de mon travail de thèse a été de développer une approche thérapeutique nouvelle pour la cardiomyopathie dilatée, dans le modèle animal du hamster CHF147. Cette approche thérapeutique innovante, basée sur diverses propriétés d'IGF-1, entres autres hypertrophiques et anti-fibrotiques, a consisté à induire une compensation de la dilatation cardiaque, résultante de la cardiomyopathie dilatée, afin de ralentir l'évolution de la pathologie. Concrètement, je me suis attachée à mettre en évidence les effets, à court et long terme, d'un traitement court par l'IGF-1 sur l'évolution de la cardiomyopathie dilatée du hamster CHF147.

A-La dystrophine et son complexe de protéines associées

1) Description du complexe des protéines associées à la dystrophine

a. Généralités

Le complexe des protéines associées à la dystrophine, ou DAPC, pour Dystrophin-Associated Protein Complex, est un complexe de protéines et de glycoprotéines sarcolemmales, qui est fortement exprimé dans tous les types de muscles striés ou lisses.^{31,62,63,225,226} Dans les cardiomyocytes, il est également retrouvé au niveau des tubules transverses, appelé encore tubules T, qui sont des invaginations de la membrane dans les cellules musculaires striées et sont le site majeur du couplage excitation – contraction lors de la contraction musculaire.¹¹⁰

Le DAPC est composé d'un grand nombre de protéines qui sont, soit directement soit indirectement, liées à la dystrophine. La figure ci-dessous, datée de 2003, permet de visualiser l'organisation du complexe, bien qu'elle ne représente pas toutes les interactions entre les différents constituants du DAPC, comme nous le verrons par la suite (Figure 1).

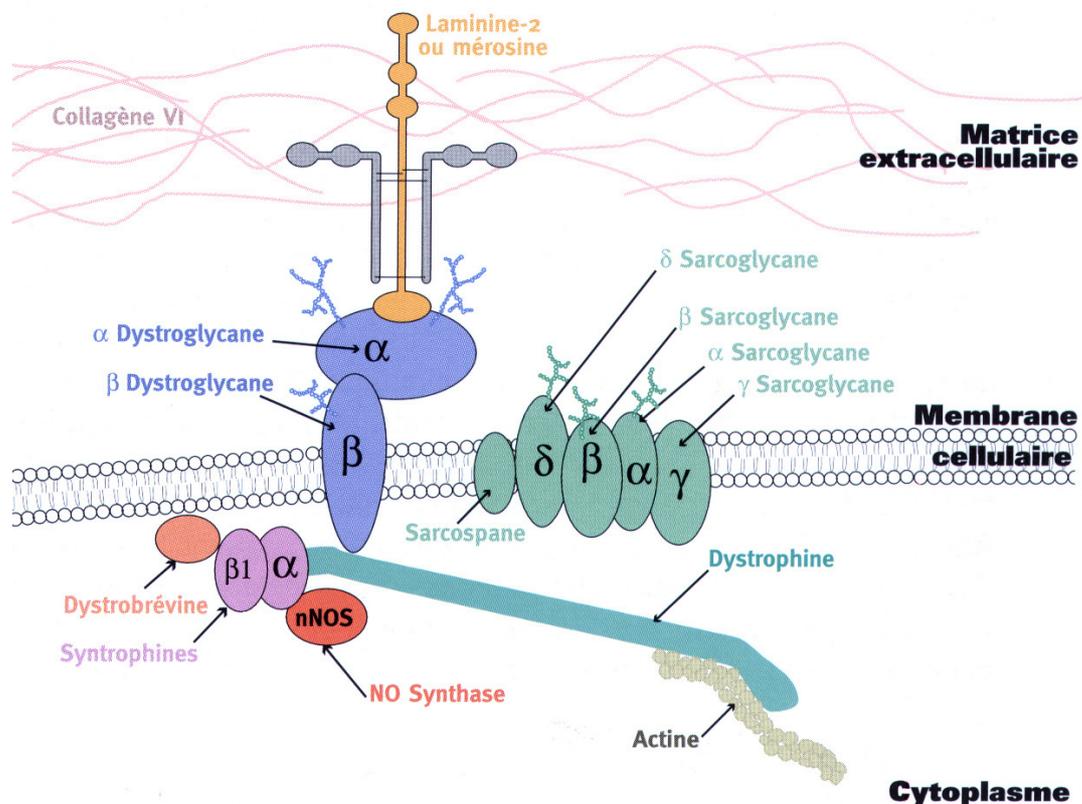


Figure 1. Vue d'ensemble du complexe des protéines associées à la dystrophine. Les composants du DAPC sont représentés par des ellipses vertes, bleues et violettes. Les protéines associées au DAPC sont représentées par des ellipses en nuances orangées. AFM© 2003.

Le DAPC a été mis en évidence lors de la première élution de dystrophine à partir d'une fraction sarcolemmale de muscle. Cette élution a été réalisée par chromatographie sur une colonne d'agglutinine de germe de blé. L'agglutinine de germe de blé est une lectine qui possède une haute affinité pour un constituant souvent retrouvé dans les glycanes et dans certaines glycoprotéines, le N-acétylglucosamine. En effet, la première purification de la dystrophine à partir de membranes de muscle squelettique de lapin, réalisée en 1989 par l'équipe de Campbell, a permis la co-purification de plusieurs autres protéines.³¹ L'année suivante, une dizaine de ces protéines ont été décrites et nommées quasiment simultanément et de manière indépendante, par Ervasti *et coll.* et Yoshida & Ozawa.^{62,225}

Le groupe de Campbell a mis en évidence un large complexe oligomérique contenant la dystrophine ainsi que des protéines et des glycoprotéines associées à la dystrophine, appelées respectivement Dystrophin-Associated Protein (DAP) et Dystrophin-Associated Glycoprotein (DAG). Ils ont découvert un triplet de DAP à un poids moléculaire de 59 kilos Daltons (kDa), et quatre DAG. Les DAG sont constitués d'une protéine de 156 kDa, une protéine de 50 kDa, deux protéines de 43 kDa et une protéine de 35 kDa. Toutes ces protéines et glycoprotéines ont été nommées d'après leurs masses moléculaires : 59DAP, 156DAG, 50DAG, 43DAG et 35DAG.⁶²

Yoshida & Ozawa ont, quant à eux, identifié six groupes, constitués d'une ou plusieurs protéines, dans leur préparation de dystrophine. Leurs poids moléculaires sont de 94 kDa, 62 kDa, 52 kDa, 43 kDa, 36 kDa et 24 kDa. Ces groupes de protéines ont été respectivement nommés A0, A1, A2, A3, A4 et A5 par ordre décroissant de poids. Les groupes A0, A2 et A5 sont constitués d'une seule protéine alors que les groupes A1 et A4 en contiennent respectivement trois et deux. Les protéines des groupes A1 et A4 semblent similaires, ce qui pousse les auteurs à formuler l'hypothèse que ces protéines sont, soit des formes phosphorylées, soit des isoformes ou des hétérodimères d'une même protéine. A l'inverse, le groupe A3 contient deux protéines qui semblent différentes et ont donc été appelées A3a et A3b.²²⁵

Cependant, en comparant les listes publiées par les groupes de Campbell et d'Ozawa, on peut s'apercevoir qu'elles ne se recourent pas totalement. En effet, Ervasti *et coll.* n'ont pas mis en évidence A0 et Yoshida & Ozawa n'ont pas observé le 156DAG. D'autre part, des travaux réalisés par Ibraghimov-Beskrovnaya *et coll.*⁹⁵ avaient rapporté que les deux protéines du doublet 43DAG (A3a et A3b) ne pouvaient être séparées alors que le groupe d'Ozawa a démontré le contraire quelques années plus tard.¹⁵⁰

Enfin, le 50DAG a également été appelé adhaline, provenant du mot arabe "adhal" signifiant muscle, car il a été le premier composant du DAPC dont le déficit a été associé avec un type de dystrophie musculaire infantile prévalent dans les populations d'Afrique du Nord.¹⁶²

Dans la deuxième moitié des années 90, toutes ces protéines ont été renommées. Le tableau suivant indique la correspondance entre les anciennes nomenclatures et les noms actuels (Tableau 1).

Tableau 1. Nomenclature des différents composants du complexe des protéines associées à la dystrophine.

| Anciens noms | | Masse moléculaire (en kDa) | Noms actuels |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Ervasti <i>et coll.</i> | Yoshida <i>et coll.</i> | | |
| 156DAG | | 156 | α -dystroglycane |
| 43DAG | A3a | 43 | β -dystroglycane |
| 50DAG | A2 | 50 | α -sarcoglycane |
| 43DAG | A3b | 43 | β -sarcoglycane |
| 35DAG | A4 | 35 | γ -sarcoglycane |
| 35DAG | A4 | 35 | δ -sarcoglycane |
| 59DAP | α A1 | 60 | α -syntrophine |
| 59DAP | β_1 A1 | 60 | β_1 -syntrophine |
| 59DAP | β_2 A1 | 60 | β_2 -syntrophine |
| 25DAP | A5 | 25 | Sarcospane |
| 87K | A0 | 90 | Dystrobrevine |

En 1994, Yoshida *et coll.* ont pu fractionner le complexe des DAP en trois sous-complexes, chacun composés de plusieurs protéines : le complexe des dystroglycanes (DGC), le complexe des sarcoglycanes (SGC) et le complexe cytoplasmique contenant la dystrophine, les syntrophines et la dystrobrevine.²²⁶ Le terme “dystroglycane” a été introduit par Ibraghimov-Beskrovnaya *et coll.*, dû à son identification par sa fixation à la dystrophine et à son importante glycosylation.⁹⁵ Le terme “sarcoglycane” a été proposé par Yoshida *et coll.*²²⁶ Plus récemment, deux nouveaux sarcoglycanes ont été identifiés par le groupe de McNally, l' ϵ -sarcoglycane et le ξ -sarcoglycane, respectivement en 1998 et 2002.^{133,214} De plus, en 1999, Crosbie *et coll.* ont montré que le complexe des sarcoglycanes est également associé à une autre protéine, le sarcospane, nommé ainsi en raison de ses nombreux domaines transmembranaires (en anglais, sarcospan pour “multiple sarcolemma spanning domains”).⁴⁴ Le sarcospane a alors été intégré au complexe des sarcoglycanes, et ce dernier est devenu le complexe sarcoglycanes-sarcospane (SG-SPN).⁴⁶ Cependant, certains auteurs proposent que le sarcospane soit distingué du complexe des sarcoglycanes étant donné d’une part, qu’aucune dystrophie musculaire due à une mutation dans le gène du sarcospane n’a été rapportée à ce jour, à l’inverse des sarcoglycanes dont les mutations entraînent toutes des dystrophies musculaires, que d’autre part, la structure moléculaire du sarcospane est très différente de celle des sarcoglycanes et qu’enfin, le complexe des sarcoglycanes est stable en l’absence du sarcospane.¹⁵¹ Considérant ces différents points, les sarcoglycanes et le sarcospane seront présentés comme deux entités distinctes. Enfin, le terme “syntrophine”, provenant d’un mot grec signifiant “compagnon” a été introduit par Adams *et coll.*, car les syntrophines accompagnent toutes les protéines de la famille de la dystrophine.⁴

Le noyau structurel du DAPC est constitué de protéines cytoplasmiques, la dystrophine et les syntrophines, de protéines transmembranaires, le β -dystroglycane, les sarcoglycanes et le sarcospane, et d'une protéine extracellulaire, l' α -dystroglycane. Quatre caractéristiques biochimiques et cellulaires sont utilisées pour identifier ces composants. Tout d'abord, la purification du DAPC à partir de membranes de muscles permet un enrichissement des protéines associées en complexe à la dystrophine. Ensuite, les protéines du DAPC migrent sous forme d'un complexe lors d'une ultracentrifugation à travers un gradient de saccharose et seules les protéines se liant de manière très spécifique et avec une haute affinité seront retenues avec la dystrophine pendant le fractionnement. La troisième caractéristique est que les constituants principaux du DAPC peuvent être isolés par chromatographie d'affinité avec la laminine. Enfin, la localisation correcte au niveau du sarcolemme des différents composants du DAPC est dépendante de l'intégrité du complexe.⁴⁵ En plus des constituants protéiques intégrés au DAPC, un grand nombre de protéines sont associées au complexe sans y être complètement intégrées. Chacun des éléments du DAPC, directement intégré ou simplement associé au complexe, sera détaillé dans cette partie.

b. La dystrophine

La localisation sur le chromosome X humain du gène *DMD* responsable de la dystrophie musculaire de Duchenne, qui est la forme la plus connue de myopathie, a été obtenue par clonage positionnel en 1987.^{18,51} Ce gène, qui est le plus grand jamais identifié dans le génome humain, s'étend sur 2,5 millions de bases et est composé de 79 exons.

La transcription du gène *DMD* en une séquence codante complète de 14 kilobases (kb) est contrôlée par trois promoteurs indépendants situés à l'extrémité 5'. Chacun de ces promoteurs est spécifique d'un tissu. Le promoteur B est activé dans les neurones corticaux et l'hippocampe. Le promoteur M est fortement activé dans le muscle squelettique et les cardiomyocytes, et à plus faible niveau dans certaines cellules gliales. Et enfin, le promoteur P est exprimé dans les cellules de Purkinje et aussi dans le muscle squelettique. Ces ARN messagers (ARNm) sont traduits en trois protéines de 427 kDa, appelées Dp427, qui ne diffèrent que par leurs extrémités N-terminales. Le gène *DMD* contient également quatre promoteurs internes qui permettent la transcription d'ARNm plus courts, codant pour des isoformes protéiques appelées apodystrophines, dont l'extrémité C-terminale est tronquée. Ces protéines ont des masses moléculaires de 260 kDa (Dp260), 140 kDa (Dp140), 116 kDa (Dp116) et 71 kDa (Dp71) et sont tissu-spécifiques. L'isoforme Dp71 est retrouvée dans les tissus non musculaires tels que le cerveau, le rein, le foie ou encore les poumons, alors que les autres isoformes de plus hauts poids moléculaires sont essentiellement exprimées dans le système nerveux central et périphérique. Enfin, le gène *DMD* subit également un épissage alternatif à son extrémité 3', ce qui génère un grand nombre de variants de transcription.¹⁸

La dystrophine est une protéine cytosquelettique de 3 678 acides aminés dont la masse moléculaire est de 427 kDa et qui est constituée de quatre régions distinctes : un domaine de liaison à l'actine situé à l'extrémité N-terminale, un domaine central en bâtonnets, un domaine riche en cystéines et le domaine C-terminal. Le domaine central en bâtonnets est composé de 24 unités répétées, formant l'essentiel de la protéine et lui donnant sa flexibilité. Le domaine WW, composé d'environ 30 acides aminés, dont deux résidus tryptophanes conservés, sépare le domaine central et la région riche en cystéines et permet de lier des ligands contenant des prolines. Le domaine cystéine contient deux motifs "EF-hand", qui permettent de fixer le calcium intracellulaire, et un domaine en doigt de zinc liant la calmoduline de manière calcium-dépendante. Enfin, le domaine C-terminal de la protéine est constitué de deux motifs appelés "domaines coiled-coil" en hélice α , organisés en une structure de leucine zipper et permettant l'oligomérisation.¹⁸

Les structures du gène *DMD* et de la protéine dystrophine ainsi que de son homologue, l'utrophine, sont représentées sur la figure ci-dessous (Figure 2).

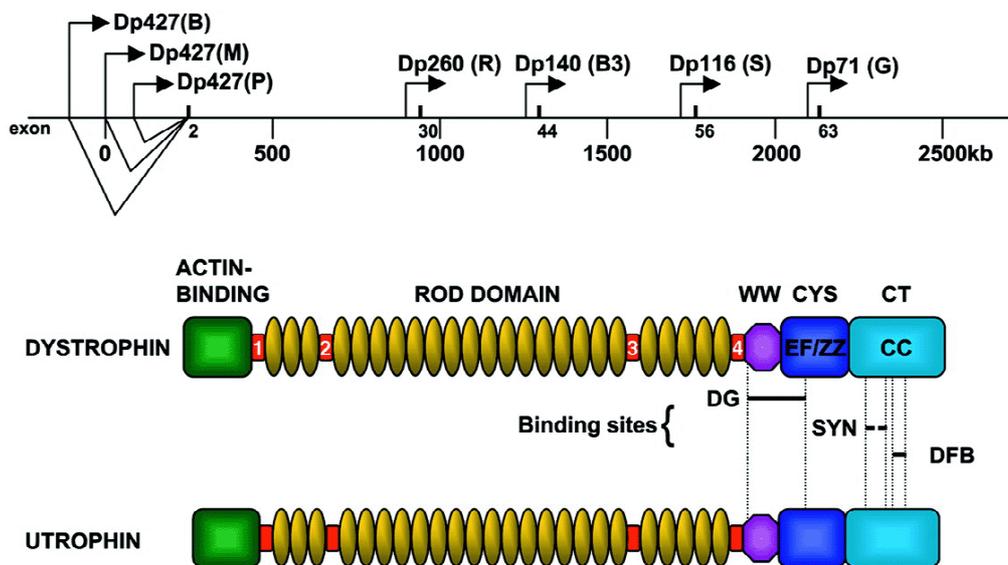


Figure 2. Représentation schématique du gène *DMD*, de la protéine dystrophine et de son homologue, l'utrophine. Le gène *DMD* s'étend sur 2,5 millions de bases et code pour sept isoformes protéiques. Les transcrits complets de 14 kb sont obtenus à partir de trois promoteurs tissu-spécifiques (indiqués par des flèches), B, M et P, qui sont situés en 5' du gène; chacun codant pour une protéine de 427 kDa (Dp427). Les promoteurs internes, R, B3, S et G, codent pour des protéines plus courtes (Dp260, Dp140, Dp116 et Dp71). Les différents domaines des protéines dystrophine et utrophine sont identifiés. Le domaine de fixation à l'actine est en vert. Les bâtonnets du domaine central (Rod Domain) sont schématisés par des ellipses jaunes. Les quatre régions charnières riches en proline sont représentées par des carrés rouges, numérotés de 1 à 4. Les extrémités C-terminales des protéines sont constituées d'un domaine WW, d'un domaine riche en cystéine (CYS) contenant un motif en doigt de zinc (EF) et un motif ZZ, et d'un domaine coiled-coil (CC). Les domaines de liaison au β -dystroglycane (DG), aux syntrophines (SYN) et aux protéines de la famille de la dystrophine (DFB) sont indiqués par des pointillés. D'après Blake *et coll.*, *Physiol. Rev.*, 2002.

La dystrophine possède un homologue, l'utrophine, dont le gène est porté par le chromosome 6 humain. La séquence codante complète de l'utrophine s'étend sur 13 kb et est traduite en une protéine de 3 433 acides aminés dont la masse moléculaire est de 395 kDa. La

structure et la régulation du gène de l'utrophine sont semblables à celles de la dystrophine. C'est un gène composé de nombreux petits exons répartis sur une large région génomique (environ 1 million de bases) qui comprend plusieurs promoteurs et subit un épissage alternatif. De plus, la structure primaire de l'utrophine est similaire à celle de la dystrophine et tout particulièrement au niveau des extrémités N- et C-terminales. Ces deux protéines paraissent donc être des paralogues issus d'une duplication précoce au cours de l'évolution. Le nom de l'utrophine provient du fait qu'elle appartient à la même famille que la dystrophine et qu'elle est ubiquitairement exprimée (en anglais, **ubiquitous dystrophine**). En effet, sa distribution tissulaire est beaucoup plus large que celle de la dystrophine. Elle est retrouvée, non seulement dans les muscles squelettiques, cardiaques et lisses mais aussi dans différents types cellulaires, comme par exemple, l'endothélium vasculaire, les cellules de Schwann des nerfs périphériques ou encore dans certaines cellules du rein. Dans les fibres musculaires adultes, l'utrophine est localisée au niveau des jonctions neuromusculaires et myotendineuses, alors que dans le muscle en développement, elle est située le long du sarcolemme. La distribution de l'utrophine le long du sarcolemme est également observée dans les muscles en régénération.¹⁸

c. Le complexe des dystroglycanes

En 1987, Smalheiser & Schwartz ont mis en évidence dans le cerveau une glycoprotéine transmembranaire de 120 kDa, nommée "cranine", permettant de lier la laminine à la surface externe de la cellule.¹⁸² Cinq ans plus tard, un travail d'Ibraghimov-Beskrovnaya *et coll.* a montré que la glycoprotéine 156DAG, découverte en 1990 par Ervasti *et coll.*⁶², se lie aussi à la laminine, et que sa masse moléculaire dans le cerveau est d'environ 120 kDa.⁹⁵ Ces résultats suggèrent donc que la cranine et la protéine 156DAG sont des isoformes différentes de la même protéine, ce qui a été confirmé par d'autres auteurs.⁷⁴

Le travail d'Ibraghimov-Beskrovnaya *et coll.* a, d'autre part, mis en évidence que les protéines 156DAG et 43DAG étaient codées par un gène unique transcrit en un ARNm unique contenant une phase ouverte de lecture de 2685 acides aminés qui est traduite en un polypeptide précurseur de 97 kDa.⁹⁶ Le gène du dystroglycane, DAG1, est localisé sur le chromosome humain 3 au locus p21. Sa région codante est composée d'un premier exon court de 285 bases et d'un deuxième exon de 2 400 bases, séparés par un large intron de 6 kb.⁹⁶ Chez l'Homme, le transcrit dystroglycane de 5,8 kb est retrouvé dans de nombreux tissus fœtaux et adultes, musculaires et non musculaires, mais plus abondamment dans le muscle squelettique et le cœur.¹⁶ La séquence prédite du polypeptide précurseur de 97 kDa montre l'existence d'un domaine transmembranaire unique proche de l'extrémité C-terminale, de quatre sites potentiels de N-glycosylation et de nombreux sites potentiels de O-glycosylation.⁹⁶ Les vingt-sept premiers acides aminés du pro-peptide sont hydrophobes et constituent le peptide signal. Les modifications post-traductionnelles subies par le précurseur

peptidique de 97 kDa entraînent, par clivage protéolytique, la production de deux sous-unités protéiques matures de 156 et 43 kDa, qui sont respectivement l' α -dystroglycane et le β -dystroglycane.⁹⁵ Ce clivage protéolytique se fait au niveau de la sérine 654.¹⁶ L' α -dystroglycane est composé de deux domaines globulaires N- et C-terminaux qui sont reliés par un domaine central "mucin-like" et riche en prolines, sérines et thréonines. Le domaine N-terminal est clivé entre l'arginine 312 et la glutamine 313, probablement pendant le transport du dystroglycane à la membrane ou à l'extérieur de la cellule. L' α -dystroglycane est une protéine fortement glycosylée au niveau du domaine central "mucin-like", ce qui explique la différence entre sa masse moléculaire prédite, de 70 kDa, et sa masse moléculaire observée, de 120 à 180 kDa selon les tissus (156 kDa dans le muscle squelettique et 140 kDa dans le muscle cardiaque). L' α -dystroglycane ne contient pas de domaine transmembranaire, possède trois sites potentiels de N-glycosylation et de nombreux sites de O-glycosylation.^{16,95} A l'inverse, le β -dystroglycane contient un domaine transmembranaire unique, un site potentiel de N-glycosylation et une longue queue cytoplasmique de 120 acides aminés riche en prolines (Figure 3).¹⁶

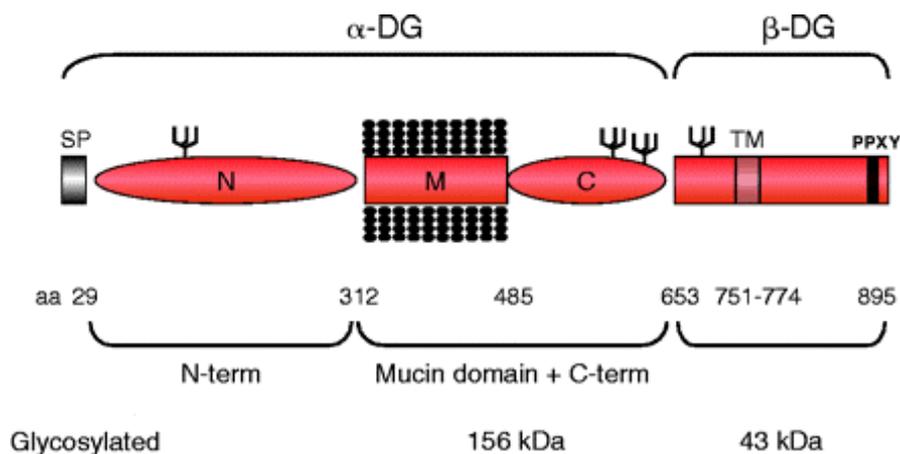


Figure 3. Organisation des domaines du dystroglycane. Dans l' α -dystroglycane mature (α -DG) contenant le domaine "mucin-like" (M) et le domaine globulaire C-terminal (C), le domaine N-terminal globulaire (N) est clivé entre Arg312 et Gln313. Les petits cercles noirs indiquent les sites multiples de O-glycosylation dans le domaine "mucin-like". Les ramifications indiquent les sites de N-glycosylation potentiels. Le peptide signal et le domaine transmembranaire sont représentés par des rectangles notés SP et TM, respectivement. La région PPXY correspond au site de fixation du β -dystroglycane (β -DG) à la dystrophine. Les masses moléculaires, en kDa, correspondent aux masses des protéines glycosylées. D'après Barresi *et coll.*, J. Cell Sci., 2006.

d. Le complexe des sarcoglycanes

Les sarcoglycanes forment un groupe unique de glycoprotéines, intégrées à la membrane, qui s'associent avec les dystroglycanes et dont on pense qu'ils stabilisent les interactions des dystroglycanes avec la matrice extracellulaire et de la dystrophine avec ses protéines associées.²¹⁵ L'association des sarcoglycanes en un complexe met en jeu des interactions importantes. En effet, l'intégrité du complexe des sarcoglycanes est maintenue même en présence de traitements "forts", tels que le SDS ou le n-octyl β -D-glucoside, un

détergent non ionique utilisé pour solubiliser les protéines de la membrane.⁴⁶ La famille des sarcoglycanes est constituée de six membres : α , β , γ , δ , ϵ et ζ , qui peuvent s'assembler en un complexe tétramérique composé de quatre sarcoglycanes différents.⁷⁹ Les structures primaires des sarcoglycanes sont hautement conservées chez les mammifères, ce qui suggère un rôle important au cours de l'évolution.¹²⁴ Ils sont tous composés d'un domaine transmembranaire unique, d'un long domaine extracellulaire et d'une courte région intracellulaire. Ils possèdent également au moins un site de glycosylation chacun et contiennent exactement cinq résidus cystéines dans leurs domaines extracellulaires, leur permettant de former des ponts disulfures intra- et intermoléculaires. Leurs masses moléculaires observées sur gel varient entre 35 et 50 kDa. Elles sont bien souvent plus élevées que les masses moléculaires prédites, car ces dernières ne prennent pas en compte l'état de glycosylation des sarcoglycanes. Une des différences parmi les sarcoglycanes concerne leur orientation. Deux des six sarcoglycanes, les formes α et ϵ sont des protéines transmembranaires de type I (leurs extrémités N-terminales sont à l'extérieur de la cellule), alors que les formes β , γ , δ , et ζ sont des protéines transmembranaires de type II (ce sont les extrémités C-terminales qui se trouvent dans la partie extracellulaire). L'analyse de la structure secondaire de chacun des sarcoglycanes α , β , γ et δ , montre la présence de plusieurs feuilletts β et d'hélices α (Figure 4).¹²⁴

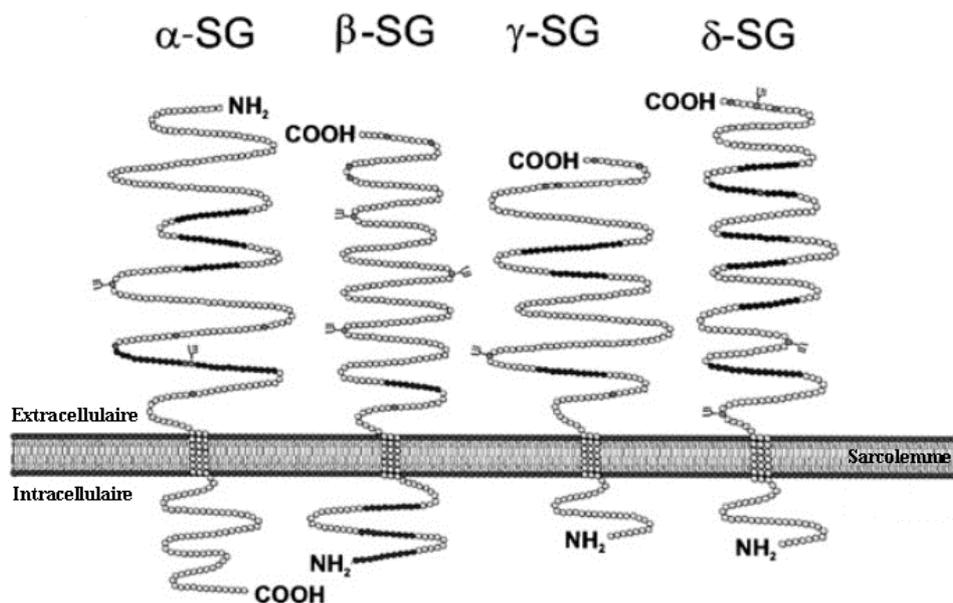


Figure 4. Représentation schématique des quatre sarcoglycanes présents dans les muscles squelettiques et cardiaques. Les sites prédits de N-glycosylation sont représentés par des petites ramifications et les cercles gris individualisés correspondent aux résidus cystéines extracellulaires. Les hélices α , présentes dans les structures secondaires des sarcoglycanes, sont en noir. D'après Lim *et coll.*, Curr. Opin. Neurol., 1998.

En tenant compte des similarités dans leurs séquences d'acides nucléiques et d'acides aminés, et de leur conservation au cours de l'évolution, trois sous-groupes se distinguent parmi le groupe des sarcoglycanes. L' α -sarcoglycane et l' ϵ -sarcoglycane, qui partagent une forte homologie appartiennent au premier sous-groupe. Le β -sarcoglycane constitue le

deuxième sous-groupe à lui seul. Enfin, le dernier sous-groupe comprend les γ -, δ - et ζ -sarcoglycanes qui sont très similaires entre eux, alors qu'ils le sont moins avec le β -sarcoglycane, bien qu'ils soient tous des protéines transmembranaires de type II.^{114,215} L'arbre phylogénétique représenté ci-après indique les relations de parenté entre les différents sarcoglycanes chez la souris (Figure 5).¹⁸¹

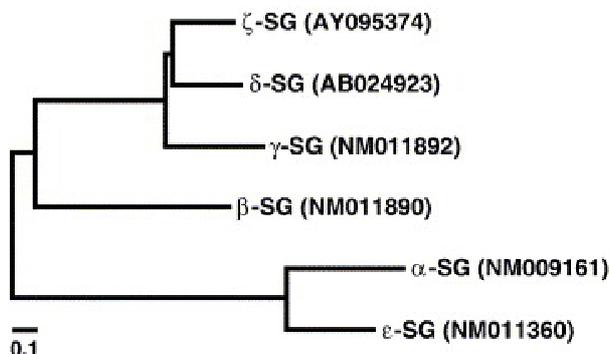


Figure 5. Arbre phylogénétique des six composants de la famille des sarcoglycanes de souris. L'échelle représente la longueur des branches. Les numéros d'accèsion sont indiqués entre parenthèses. D'après Shiga *et coll.*, Exp. Cell Res., 2006.

Depuis la mise en évidence des ε - et ζ -sarcoglycanes, plusieurs publications suggèrent qu'il existerait deux types de complexes des sarcoglycanes, l'un comprenant les sarcoglycanes α , β , γ et δ , présent dans les muscles squelettiques et cardiaques, et le second constitué des sarcoglycanes β , δ , ε et ζ , retrouvé dans les muscles lisses vasculaires (Figure 6).^{188,214}

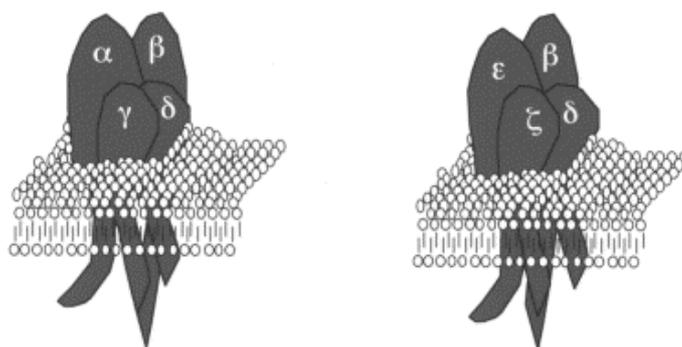


Figure 6. Les différents types de complexes des sarcoglycanes. A gauche, le complexe des sarcoglycanes retrouvé dans les muscles squelettiques et cardiaques est constitué des sarcoglycanes α , β , γ et δ ; dans certains cas, ε -sarcoglycane remplace l' α -sarcoglycane dans les muscles striés. A droite, le complexe des sarcoglycanes dans les muscles lisses vasculaires est composé des sarcoglycanes β , δ , ε et ζ . D'après Wheeler *et coll.*, Trends Cardiovasc. Med., 2003.

i- L' α -sarcoglycane

Lors de la première purification du DAPC en 1990, Ervasti *et coll.* ont mis en évidence de l' α -sarcoglycane. Ces auteurs le décrivaient simplement comme une protéine de

50 kDa associée à la dystrophine.⁶² Le clonage de l' α -sarcoglycane n'a été réalisé que trois ans plus tard par Roberds *et coll.*, par criblage d'une banque d'ADNc permettant l'identification d'un clone contenant un cadre ouvert de lecture codant pour 387 acides aminés.¹⁶² La taille du gène est de 17 kb et il est constitué de 10 exons.¹⁵¹ L'analyse des ARNm de l' α -sarcoglycane par Northern blot a montré que l'expression de l' α -sarcoglycane est majoritaire dans le muscle squelettique, le diaphragme et le cœur. Mais des transcrits ont été détectés dans la vessie et le petit intestin, ce qui indique une expression de l' α -sarcoglycane également dans les cellules musculaires lisses. Le transcrit majeur de l' α -sarcoglycane est de 1,5 kb mais deux autres transcrits de 3,5 kb et de 7 kb peuvent être trouvés, ce qui suggère soit un épissage alternatif soit un processus de transcription incomplet.¹⁶² En 1994, McNally *et coll.* ont localisé le gène humain de l' α -sarcoglycane sur le chromosome 17q21.¹³¹ Leur caractérisation de l'ADNc humain d' α -sarcoglycane a mis en évidence un cadre ouvert de lecture codant pour une protéine de 387 acides aminés et dont la masse moléculaire prédite est de 43 225 kDa. D'autre part, ils ont montré que ce gène subit effectivement un épissage alternatif puisqu'ils ont démontré l'existence d'un deuxième transcrit codant pour une protéine d'environ 35 kDa dont les acides aminés 196 à 319 sont manquants, entraînant ainsi la perte du domaine transmembranaire du peptide. En accord avec les résultats publiés par le groupe de Campbell, l'analyse de l'expression tissulaire des ARNm de l' α -sarcoglycane humain par Northern blot réalisée par McNally *et coll.* a révélé une très forte expression dans le muscle strié et une expression très faible dans le muscle lisse.^{131,162} Cependant, l' α -sarcoglycane semble six fois plus exprimé dans le muscle squelettique que dans le cœur.¹³¹

ii- Le β -sarcoglycane

Tout comme l' α -sarcoglycane, le β -sarcoglycane a été découvert par le groupe de Campbell et a été initialement décrit comme une protéine de 43 kDa associée à la dystrophine.⁶² Le gène du β -sarcoglycane a été cloné simultanément par les groupes de Kunkel et Campbell dans le milieu des années 90. Ces deux groupes, en parallèle, ont également proposé le nom de " β -sarcoglycane".^{22,123} Ce gène est localisé sur le chromosome 4 au locus q12, il s'étend sur 15 kb et est constitué de 6 exons.^{21,22,123} L'analyse des ARNm montre la présence d'un transcrit majeur de 4,3 kb mais également de deux transcrits plus faibles de 3 kb et 1,35 kb, qui peut être expliquée par une poly-adénylation variable.^{22,123} L'expression du β -sarcoglycane est retrouvée essentiellement dans le cœur et les muscles squelettiques, mais aussi dans les muscles lisses et dans de nombreux tissus non musculaires, similaire à celle du β -dystroglycane mais à l'inverse de l' α -sarcoglycane qui est uniquement musculaire.^{22,123} Bönnemann *et coll.* et Lim *et coll.* ont identifié, par criblage d'une banque de données, une séquence de 956 bases contenant une phase ouverte de lecture codant pour 318 acides aminés et ayant une masse moléculaire prédite de 34 777 Da.^{22,123} La séquence d'acides aminés révèle un domaine transmembranaire unique avec un petit domaine

N-terminal intracellulaire et un large domaine C-terminal extracellulaire. Le β -sarcoglycane possède, d'autre part dans sa région extracellulaire, trois sites de N-glycosylation ainsi que cinq résidus cystéines lui permettant de former des ponts disulfures.¹²³ L'étude de la localisation cellulaire de la protéine par immunofluorescence permet de visualiser le β -sarcoglycane au niveau du sarcolemme et montre une co-localisation avec d'autres composants du DAPC, tel que le β -dystroglycane, l' α -sarcoglycane ou encore les syntrophines.¹²³

iii- Le γ -sarcoglycane

Ce membre du complexe des sarcoglycanes a été identifié par Ervasti *et coll.* comme étant une protéine de 35 kDa associée à la dystrophine.⁶² Le clonage du γ -sarcoglycane a été réalisé par Noguchi *et coll.* en 1995.¹⁴⁴ Le gène du γ -sarcoglycane est localisé sur le chromosome 13 au locus q12.¹⁴⁴ Il s'étend sur une région génomique de 164 kb et contient 8 exons.^{132,151} L'étude des transcrits du γ -sarcoglycane montre la présence d'un ARNm unique de 1,7 kb exclusivement dans les muscles striés, squelettiques et cardiaques.¹⁴⁴ L'expression du γ -sarcoglycane est donc musculaire, comme celle de l' α -sarcoglycane, alors que celle du β -sarcoglycane est plus largement distribuée. La séquence d'ADNc du γ -sarcoglycane contient 873 bases et code pour 291 acides aminés dont la masse moléculaire prédite est de 32 350 Da.¹⁴⁴ La protéine possède un domaine transmembranaire unique avec l'extrémité C-terminale dirigée vers la matrice extracellulaire et l'extrémité N-terminale vers le cytoplasme. Le γ -sarcoglycane contient un site de glycosylation extracellulaire.¹⁴⁴ La spécificité de la protéine γ -sarcoglycane pour les muscles striés a été confirmée par le groupe d'Ozawa.²²¹ Des expériences d'immunohistochimie ont également permis de visualiser le γ -sarcoglycane au niveau du sarcolemme.²²¹

iv- Le δ -sarcoglycane

Ce composant du complexe des sarcoglycanes de 35 kDa a été co-purifié avec la dystrophine par Ervasti *et coll.* en 1990.⁶² Toutefois, initialement, la bande à 35 kDa n'a pas été identifiée comme étant constituée de deux bandes, le γ - et δ -sarcoglycane. Ceci n'est devenu évident qu'après l'analyse du DAPC sur gel SDS-PAGE bidimensionnel par Yamamoto *et coll.* en 1993 qui a montré que le 35DAG présentait deux points isoélectriques (pI) différents, suggérant ainsi l'existence de deux composants ayant une masse moléculaire identique de 35 kDa.²²⁰ Le clonage du δ -sarcoglycane a été réalisé par Nigro *et coll.* en 1996.¹⁴² Ce groupe de chercheurs a détecté, par criblage d'une banque d'ADNc humain de muscle squelettique, une séquence de 870 nucléotides possédant un cadre ouvert de lecture unique et présentant 58% d'homologie avec les séquences humaines et de lapin du γ -sarcoglycane. L'ADNc code pour une protéine de 290 acides aminés dont la masse

moléculaire prédite est de 32 174 Da. La similarité entre le γ - et le δ -sarcoglycane au niveau protéique est encore plus élevée que celle retrouvée au niveau nucléotidique puisqu'elle est de 70%. Leur analyse des transcrits du δ -sarcoglycane par Northern blot a révélé l'existence d'un transcrit majeur de 8 kb et d'un transcrit plus faible de 3,6 kb. D'autre part, la distribution tissulaire des transcrits du δ -sarcoglycane indique une expression essentiellement dans le muscle squelettique et dans le cœur, mais également une faible expression dans le muscle lisse.¹⁴² L'expression spécifique des ARNm du δ -sarcoglycane dans les muscles striés est similaire à celle des α - et γ -sarcoglycanes, mis à part son expression particulière dans le muscle lisse. Le β -sarcoglycane, qui est largement exprimé dans les tissus musculaires mais également dans les tissus non musculaires, diffère des trois autres sarcoglycanes. L'équipe de Nigro a également caractérisé la structure du gène du δ -sarcoglycane.¹⁴² Celui-ci est constitué de 8 exons séparés par de larges introns. Le gène s'étend sur 439 kb.¹⁵¹ Leur analyse par FISH a permis de localiser le gène sur le chromosome 5 dans la région q33-q34. En ce qui concerne l'analyse protéique, le δ -sarcoglycane a été détecté par Western blot à 35-37 kDa et des marquages immunohistochimiques l'ont localisé au niveau du sarcolemme.¹⁴²

v- L' ϵ -sarcoglycane

Ce sarcoglycane a été découvert plus tardivement que les autres constituants du complexe puisqu'il n'a été mis en évidence qu'à la fin des années 90, par les groupes de Sanes et de McNally.^{66,133} Par criblage d'une banque d'ADNc, Ettinger *et coll.* ont repéré un ADNc contenant un cadre ouvert de lecture codant pour 145 acides aminés et possédant 51% d'identité avec la région C-terminal de l' α -sarcoglycane humain.⁶⁶ Ils ont appelé " ϵ -sarcoglycane" cette nouvelle protéine homologue de l' α -sarcoglycane. Elle comporte 405 acides aminés et sa masse moléculaire calculée est de 43,5 kDa. L'analyse de l'expression de l' ϵ -sarcoglycane par Northern blot a montré l'existence d'un transcrit unique de 1,8 kb dont le niveau d'expression est élevé dans les poumons, modéré dans le cerveau, le cœur et le muscle squelettique, et faible dans le rein et le foie. Cette distribution de l' ϵ -sarcoglycane, ainsi que sa masse moléculaire, ont été confirmées par Western blot. Ettinger *et coll.* ont également montré que l' ϵ -sarcoglycane est une protéine membranaire qui est présente à des niveaux plus élevés dans les vaisseaux sanguins que dans les fibres musculaires. D'autre part, l' ϵ -sarcoglycane est plus largement distribué que ne l'est l' α -sarcoglycane, et est exprimé plus précocement que l' α -sarcoglycane au cours du développement.⁶⁶ Le groupe de McNally a, quant à lui, montré que la structure générale des deux gènes, α - et ϵ -sarcoglycane est très conservée, avec des localisations d'introns très proches.¹³³ Ils ont, d'autre part, calculé une homologie de 47% entre les séquences nucléotidiques de l' α -sarcoglycane et de l' ϵ -sarcoglycane, ainsi que 62% de similarité et 43% d'identité au niveau des séquences en acides aminés.¹³³ De plus, leur travail a localisé le gène de l' ϵ -sarcoglycane sur le chromosome 7q21. Le groupe de Campbell a, par la suite, montré que l' ϵ -sarcoglycane est un

composant intégral de DAPC dans le muscle lisse, tout comme β - et δ -sarcoglycanes alors qu' α - et γ -sarcoglycanes n'en font pas partie.¹⁸⁸ Ils ont également pu observer que l' ε -sarcoglycane remplace l' α -sarcoglycane dans le muscle lisse pour former un DAPC unique.¹⁸⁸ Il semblerait donc que l' α -sarcoglycane détecté dans les muscles lisses par Roberds *et coll.* correspondrait en fait à ε -sarcoglycane.¹⁶²

vi- Le ζ -sarcoglycane

Le ζ -sarcoglycane est le dernier composant de la famille des sarcoglycanes à avoir été mis en évidence par Wheeler *et coll.* en 2002.²¹⁴ Le groupe de McNally a cartographié le gène humain du ζ -sarcoglycane sur le chromosome 8p22 et a montré que la structure exon-intron de ce gène est similaire à celle des sarcoglycanes γ et δ . L'analyse de la distribution du ζ -sarcoglycane par immunofluorescence a permis d'observer la présence de la protéine dans les membranes des muscles squelettiques et cardiaques ainsi que dans la couche musculaire lisse des artères coronaires. Des expériences d'immuno-précipitation ont également indiqué l'existence d'une interaction directe entre ζ - et β -sarcoglycane, prouvant ainsi que le ζ -sarcoglycane est un composant à part entière du complexe des sarcoglycanes.²¹⁴ De même que dans le cas précédent concernant l' ε -sarcoglycane, Wheeler *et coll.* ont prouvé que seuls les sarcoglycanes ζ et δ sont exprimés dans le muscle lisse alors que le γ -sarcoglycane ne l'est pas, signifiant ainsi que le γ -sarcoglycane qui avait été initialement détecté dans le muscle lisse serait en fait du ζ -sarcoglycane.²¹⁴ Le transcrite ζ -sarcoglycane est retrouvé majoritairement dans le cerveau et à des niveaux plus faibles dans le foie, le poumon et les muscles striés et lisses.¹⁸¹

Le tableau ci-dessous récapitule pour chacun des sarcoglycanes, sa localisation chromosomique, la taille de son gène ainsi que sa composition en exons, la taille de sa protéine et sa répartition musculaire chez l'Homme (Tableau 2).

Tableau 2. Les sarcoglycanes chez l'Homme. Localisations chromosomiques, gènes, protéines et répartition musculaire dans les muscles striés (squelettiques et cardiaques) ou dans les muscles lisses.

| | Localisation chromosomique | Taille du gène (nombre d'exons) | Taille de la protéine | Répartition musculaire |
|-----------------------------|----------------------------|---------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| α -sarcoglycane | 17q21 | 17 kb (10) | 50 kDa | Muscles striés |
| β -sarcoglycane | 4q12 | 15 kb (6) | 43 kDa | Muscles striés et lisses |
| γ -sarcoglycane | 13q12 | 164 kb (8) | 35 kDa | Muscles striés |
| δ -sarcoglycane | 5q33-q34 | 439 kb (8) | 35 kDa | Muscles striés et lisses |
| ε -sarcoglycane | 7q21 | 71 kb (12) | 44 kDa | Muscles striés et lisses |
| ζ -sarcoglycane | 8p22 | 465 kb (8) | 38 kDa | Muscles striés et lisses |

e. Le sarcospane

Le sarcospane, qui a été originellement décrit par Ervasti *et coll.* comme une protéine de 25 kDa co-purifiant avec la dystrophine, a été la dernière protéine du DAPC décrite du point de vue moléculaire en 1997.^{44,62} Le sarcospane est localisé sur le chromosome humain 12p11.2. L'analyse des ARNm a entraîné la détection d'un transcrit de 6,5 kb exclusivement dans les muscles striés et d'un transcrit de 4,4 kb prédominant dans les muscles striés mais également présent dans le muscle lisse et plusieurs autres tissus, suggérant l'existence de transcrits tissu-spécifiques et d'un épissage alternatif.^{44,46} Le sarcospane présente une expression large, tout comme les dystroglycanes. Crosbie *et coll.* ont montré que le sarcospane est une protéine qui possède quatre domaines transmembranaires conservés et une large boucle extracellulaire, caractéristiques uniques parmi les membres du DAPC. Cette topologie est similaire à celle des protéines de la superfamille des tétraspanes. Les extrémités N- et C-terminales sont situées à la face intracellulaire du sarcolemme. Crosbie *et coll.* ont également démontré que le sarcospane fait partie intégrante du DAPC.⁴⁴ La protéine n'est pas glycosylée, à l'inverse des dystroglycanes et des sarcoglycanes, par contre son expression tissulaire est comparable à celle des dystroglycanes. Le sarcospane est localisé au niveau du sarcolemme et est souvent retrouvé à proximité des sarcoglycanes.^{44,46,83} Ce composant du DAPC appartient à la superfamille des tétraspanines, dont les membres interagissent entre eux et forment ainsi des structures oligomériques. Les tétraspanines auraient aussi pour rôle de faciliter les interactions entre différentes protéines transmembranaires. Le sarcospane pourrait donc servir à coordonner les interactions protéine – protéine au sein du DAPC.⁴⁶ Il a été très récemment montré que les sarcospanes peuvent s'assembler entre eux dans le sarcolemme, comme les autres tétraspanines, pour former des structures allant des dimères aux hexamères. Ces interactions se font par l'intermédiaire de résidus cystéines situés au niveau des domaines N- et C-terminaux et de la boucle extracellulaire du sarcospane. La structure du sarcospane est d'autre part stabilisée grâce à des ponts disulfures intramoléculaires.¹³⁷

f. Les syntrophines

Les syntrophines ont, à l'origine, été décrites comme un complexe de protéines de 59 kDa associées à la dystrophine.⁶² Lorsqu'elles sont séparées par électrophorèse dénaturante unidimensionnelle, elles apparaissent comme un triplet, qui est composé d'une bande légèrement acide et de deux bandes basiques visibles par électrophorèse dénaturante bidimensionnelle. Le "triplet" 59DAP contient donc trois protéines distinctes, qui sont les syntrophines α_1 , β_1 et β_2 .⁸ Les syntrophines humaines ont été clonées par Ahn *et coll.* en 1994 et 1996.⁸ Le pI calculé pour la syntrophine α_1 est de 6,4 alors que ceux des syntrophines β_1 et β_2 sont respectivement de 9,0 et 9,3. Ceci signifie que le composant légèrement acide identifié par électrophorèse dénaturante bidimensionnelle correspond à la syntrophine α_1 alors que le

composant basique est constitué des syntrophines β_1 et β_2 . Les trois isoformes de syntrophines sont spécifiquement localisées sous le sarcolemme.

La séquence d'ADNc de la syntrophine α_1 contient un cadre ouvert de lecture de 2 136 bases codant pour 505 acides aminés. Le gène de la syntrophine α_1 est situé au locus 20q11.2. Il est transcrit en un messager unique de 2,5 kb retrouvé majoritairement dans le muscle squelettique, le cœur et le diaphragme. Des niveaux plus faibles d'expression d'ARNm de la syntrophine α_1 sont également observés dans le cerveau, le foie, le rein, les poumons et le pancréas. La syntrophine α_1 , comme la dystrophine, est donc essentiellement exprimée dans les muscles striés. La masse moléculaire prédite de la protéine est de 54 kDa et sa séquence primaire en acides aminés permet de prédire l'absence de domaine transmembranaire et la présence d'une dizaine de sites potentiels de phosphorylation. Au niveau cellulaire, la protéine est située en périphérie de la membrane musculaire et est associée à la face cytoplasmique du DAPC.⁸

La séquence codante de la syntrophine β_1 est constituée de 2 975 bases contenant le cadre ouvert de lecture d'une protéine dont la masse moléculaire calculée est de 58,7 kDa. Le gène de la syntrophine β_1 , localisé en position 8q23-24, est transcrit en cinq ARNm distincts de 5,9 kb, 4,8 kb, 4,3 kb, 3,1 kb et 1,5 kb respectivement. L'étude de la distribution tissulaire de ces ARNm montre une expression ubiquitaire de cette syntrophine, mais ses niveaux d'expression dans le cœur et le cerveau sont plus faibles que dans les autres tissus.⁷

Dans le cas de la syntrophine β_2 , la séquence d'ADNc contient un cadre ouvert de lecture unique codant pour 540 acides aminés dont la masse moléculaire prédite est de 58 kDa. Le gène est localisé sur le chromosome 16 entre les régions q23 et q24. L'étude de l'expression des transcrits de la syntrophine β_2 montre l'existence de trois ARNm de 10 kb, 5 kb et 2 kb, qui sont exprimés dans un grand nombre de tissus musculaires et non musculaires à des niveaux faibles, et de manière plus importante dans les poumons. Dans le muscle, la syntrophine β_2 est retrouvée au niveau des jonctions neuromusculaires.⁸

Les trois isoformes de syntrophines ne sont pas hautement conservées. En effet, la séquence d'acides aminés de la syntrophine α_1 est identique à 54 et 50% avec celles des syntrophines β_1 et β_2 , respectivement, et les deux isoformes β des syntrophines partagent 57% d'homologie entre elles. Cependant, elles présentent des homologies beaucoup plus importantes entre les espèces. Par exemple, les syntrophines β_2 humaines, de souris et de lapin sont identiques à 96%.⁸

Cependant, les trois syntrophines présentent la même organisation. Elles sont toutes constituées de deux domaines PH (pour Pleckstrin Homology) en tandem. Le domaine PH est connu pour permettre des interactions entre des protéines ou entre une protéine et un lipide. Le domaine PH des syntrophines cible leurs partenaires à la membrane plasmique.⁴² Un domaine très conservé entre les trois syntrophines, le domaine PDZ (appelé ainsi d'après les trois premières protéines identifiées contenant ce domaine : PSD-95, Discs-large et ZO-1), coupe le domaine PH1 en deux, PH1a et PH1b. Le domaine C-terminal de 57 acides aminés

est une région de forte homologie entre les trois syntrophines mais ne présente pas d'homologie avec d'autres protéines connues. Ce domaine a été appelé SU, pour Syntrophin Unique (Figure 7).⁸

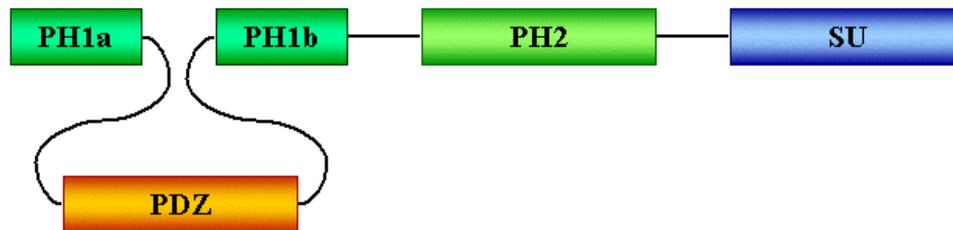


Figure 7. Organisation schématique des domaines des syntrophines. Les syntrophines sont constituées de deux domaines PH (Pleckstrin Homology) en tandem. Le premier domaine PH est scindé en deux, PH1a et PH1b, par un domaine PDZ. Le domaine C-terminal de 57 acides aminés est un domaine unique des syntrophines (SU, Syntrophin-Unique). D'après Ahn *et coll.*, JBC, 1996.

g. Les autres protéines associées au DAPC

La dystrophine, les dystroglycanes, les sarcoglycanes, le sarcospane et les syntrophines forment le noyau du DAPC. Mais il existe également d'autres protéines associées avec le DAPC au niveau du sarcolemme qui ne sont pas considérées comme appartenant directement au complexe.⁴⁵ La liste des protéines présentées ci-dessous n'est pas exhaustive mais contient les protéines les plus couramment associées au DAPC.

i- La laminine-2

Les laminines sont de larges glycoprotéines hétérotrimériques d'environ 800 kDa.¹⁷⁸ Elles forment, avec le collagène de type IV, l'entactine et le perlecan, le squelette de la membrane basale, matrice extracellulaire particulière retrouvée à l'interface entre un épithélium et un autre tissu.²¹³ Les laminines sont composées de trois chaînes distinctes α , β et γ qui sont codées par des gènes différents. A ce jour, 5 chaînes α , 4 chaînes β et 3 chaînes γ ont été identifiées et peuvent s'associer pour former quinze isoformes différentes de laminines.¹⁶ De plus, les différentes isoformes des chaînes α , β et γ sont également codées par des gènes différents. Les laminines forment des structures cruciformes constituées de trois bras courts d'environ 36 nm, chacun formé par une chaîne différente, et d'un bras long d'environ 77 nm, regroupant les trois chaînes associées en hélice. Les bras courts correspondent aux extrémités N-terminales des différentes chaînes et le bras long à leurs extrémités C-terminales.²¹³ Le bras long des laminines se termine par un domaine LG constitué de cinq modules globulaires G d'environ 20 nm de diamètre chacun contenant des répétitions de cystéines et correspondant à l'extrémité C-terminale de la chaîne α . L'isoforme de laminine la plus fréquemment retrouvée dans la membrane basale des cellules musculaires

adultes est la laminine-2, encore appelée mérosine. Très récemment, une nouvelle nomenclature des laminines, proposée par Aumailley *et coll.*, a permis de renommer la laminine-2, laminine-211, car elle est composée d'une chaîne $\alpha 2$, d'une chaîne $\beta 1$ et d'une chaîne $\gamma 1$.¹³

ii- La cavéoline-3

Les cavéoles sont des invaginations de 50 à 100 nm localisées à la surface de la plupart des types cellulaires et représentent des micro-domaines au sein de la membrane plasmique. Les cavéoles sont impliqués dans la signalisation transmembranaire, et notamment dans la signalisation couplée aux protéines G.^{45,184,186} Les cavéolines, une famille de protéines membranaires de 21 à 24 kDa, sont les principaux constituants des cavéoles. Les cavéolines s'assemblent en homo-oligomères (14 à 16 monomères par oligomères) de haut poids moléculaire qui s'accumulent côte à côte pour former des structures cavéolaires.¹⁸⁴ Ces protéines jouent un rôle structural majeur dans la formation des cavéoles agissant comme des protéines d'échafaudage, permettant l'organisation et la concentration des protéines et des lipides qui interagissent spécifiquement avec elles au sein de ces micro-domaines.^{184,186} Dans la famille des cavéolines, qui comprend trois membres, la cavéoline-3 est spécifique du muscle.^{184,186} En 1996, Song *et coll.* ont observé une co-localisation de la cavéoline-3 et de la dystrophine au niveau du sarcolemme ainsi qu'un co-fractionnement de la cavéoline-3 avec la dystrophine et ses glycoprotéines associées et une co-immuno-précipitation avec la dystrophine.¹⁸⁴ Ces résultats suggèrent une association de la cavéoline-3 avec la dystrophine. Cependant, en 1998, Crosbie *et coll.* ont montré que la cavéoline-3 n'est pas un élément constitutif du DAPC, et n'est pas fortement associée au complexe. Leur travail a également mis en évidence que la cavéoline-3 est localisée au sarcolemme de manière indépendante de la dystrophine et des sarcoglycane. La cavéoline-3 peut interagir avec le complexe par l'intermédiaire du β -dystroglycane, bien qu'elle n'appartienne pas au DAPC.¹⁸⁶

iii- L'actine cytosquelettique

La famille des actines est composée de protéines cytosquelettiques hautement conservées impliquées dans un grand nombre de phénomènes inhérents à la vie d'une cellule, tels que la division, la mobilité, la génération de force contractile, le maintien de la forme de la cellule ou encore l'endocytose.¹⁸⁵ *In vivo*, l'actine est organisée en réseaux ou en faisceaux constitués de filaments (actine F) eux-mêmes constitués d'un assemblage de sous-unités compactes de simples chaînes polypeptidiques d'actine globulaire (actine G).⁹ Chez les eucaryotes, la famille des actines est constituée de six isoformes distinctes ayant des expressions tissulaires différentes : les isoformes musculaires et les isoformes non musculaires. Quatre isoformes sont majoritairement exprimées dans les muscles striés,

squelettiques (α_{sk}) et cardiaques (α_{ca}), ainsi que dans les muscles lisses (α_{sm} et γ_{sm}) et deux isoformes cytoplasmiques sont retrouvées dans toutes les cellules (β_{cyto} et γ_{cyto}).¹⁸⁵ Dans les cellules musculaires, l'actine musculaire α est majoritaire mais l'actine non musculaire γ est également présente, alors que l'isoforme β est absente.¹⁶⁰ L'actine musculaire est localisée au niveau des filaments fins des sarcomères et interagit avec la myosine pour générer la force contractile. L'actine non musculaire est, quant à elle, située au niveau du cytosquelette non contractile, dans un domaine cellulaire appelé costamère.¹⁸⁵ Le costamère est un ensemble de protéines cytosquelettiques permettant de lier le sarcomère, qui génère la force musculaire, à la matrice extracellulaire, *via* le sarcolemme.

iv- L' α -dystrobrevine

L' α -dystrobrevine appartient à la famille des dystrobrevines, qui elles-mêmes sont des protéines de la famille de la dystrophine. En effet, les dystrobrevines partagent avec la dystrophine une homologie de séquence importante au niveau de l'extrémité C-terminale.¹⁸ La famille des dystrobrevines comporte deux membres, l' α -dystrobrevine et la β -dystrobrevine, qui sont codés par deux gènes différents et qui ont une distribution tissulaire différente. Le gène de l' α -dystrobrevine est localisé sur le chromosome 18 et code pour au moins cinq isoformes de protéines différentes exprimées dans les muscles. Les deux isoformes α -dystrobrevine-1 et α -dystrobrevine-2 sont retrouvées au niveau du sarcolemme, avec une prédominance de l'isoforme α -dystrobrevine-2. L'isoforme α -dystrobrevine-3 est également retrouvée au niveau des muscles striés mais sa localisation exacte n'est pas connue.¹⁸ Les isoformes 1 et 2 de l' α -dystrobrevine possèdent un site de liaison à la dystrophine, alors que l'isoforme la plus petite, l' α -dystrobrevine-3, ne l'a pas.^{18,227} Le gène de la β -dystrobrevine se trouve sur le chromosome 2 et subit un épissage alternatif permettant de produire plusieurs variants au niveau de l'extrémité C-terminale de la protéine, qui sont exprimés dans les tissus non musculaires.¹⁸

v- La nitric oxide synthase neuronale, nNOS

Le monoxyde d'azote, en anglais nitric oxide (NO), est une molécule endogène libérée par un grand nombre de cellules qui sert de médiateur dans des processus du développement, ou encore des processus physiologiques et pathologiques très divers. Le NO est synthétisé à partir d'oxygène et de L-arginine par des enzymes, les NO Synthases (NOS). Elles sont au nombre de trois : la NOS endothéliale (eNOS), la NOS neuronale (nNOS), qui sont dépendantes du calcium, et la NOS inductible (iNOS), qui est indépendante du calcium. En effet, les trois NOS sont toutes régulées par la calmoduline, qui, en se complexant avec le calcium intracellulaire, active un grand nombre de protéines. Mais, alors que la liaison de la calmoduline avec nNOS et eNOS dépend des changements physiologiques en calcium, la

iNOS se fixe à la calmoduline et est totalement active même à la plus faible concentration calcique retrouvée *in vivo*. Dans les muscles striés, le NO est spécifiquement synthétisé par la nNOS, qui est impliquée dans la modulation de la force contractile.²⁴ Les interactions protéine – protéine de la nNOS permettent à la fois de réguler l'activité de l'enzyme et de cibler la nNOS à sa localisation subcellulaire spécifique.²⁰³ La nNOS est localisée au niveau du sarcolemme des muscles striés grâce à son interaction avec la syntrophine α_1 .²⁴ D'autre part, nNOS et eNOS interagissent avec la cavéoline-3 dans le muscle squelettique et le muscle cardiaque, respectivement.²⁰³

vi- La protéine Grb2

La protéine liée aux récepteurs des facteurs de croissance Grb2, pour Growth factor Receptor-Bound protein 2, est une protéine de 25 à 28 kDa fonctionnant comme transducteur de signal ubiquitaire.²²³ En effet, elle contient un domaine SH2 et deux domaines SH3. Les domaines SH, pour SRC homology region, sont des séquences conservées retrouvées dans une grande variété de protéines associées à la signalisation et à la structure cellulaire. Le domaine SH2 de Grb2 se lie à des séquences phosphorylées au niveau de résidus tyrosine. Les domaines SH3, quant à eux, dirigent la formation de complexes avec des régions riches en prolines portées par d'autres protéines.²²³

2) Assemblage et liens entre les différents constituants du DAPC : de la matrice extracellulaire au cytosquelette contractile

a. Généralités

Le DAPC est constitué d'une grande variété de protéines et glycoprotéines, décrites précédemment, qui sont associées en un large complexe intégré au sarcolemme. Ce complexe permet de faire le lien entre les protéines de la matrice extracellulaire et celles du cytosquelette. En effet, plusieurs protéines de la matrice extracellulaire, telles que la laminine, se fixent à l' α -dystroglycane, qui lui-même est associé au β -dystroglycane. Au niveau du cytosol des cellules musculaires, le β -dystroglycane permet de faire le lien avec l'actine et le cytosquelette contractile *via* la dystrophine. D'autre part, les sarcoglycanes, grâce à leurs nombreuses interactions avec des protéines cytosoliques, permettent de stabiliser le complexe. La dystrophine possède également plusieurs sites de liaison à différentes protéines intracellulaires et membranaires du DAPC.

Comme toutes les protéines membranaires, les dystroglycanes, les sarcoglycanes et le sarcospane sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique. Le précurseur protéique des dystroglycanes, issu d'un seul ARNm, est clivé immédiatement après sa synthèse en deux formes, α - et β -dystroglycanes. Dans le réticulum endoplasmique, les complexes des dystroglycanes et des sarcoglycanes sont formés mais ils ne sont pas associés entre eux ni

avec le sarcospane. Après leur passage dans le réticulum endoplasmique, toutes ces protéines traversent l'appareil de Golgi, dans lequel elles sont glycosylées et s'associent en complexes distincts, celui des dystroglycanes et celui des sarcoglycanes. Ces deux complexes ainsi que le sarcospane s'associent ensuite en un large complexe qui est finalement adressé à la membrane grâce à des vésicules de transport.¹⁵¹ La localisation correcte du complexe des sarcoglycanes à la membrane plasmique est une condition préalable à la stabilisation du complexe des dystroglycanes.

b. Le complexe des dystroglycanes au sein du DAPC

L'assemblage du complexe des dystroglycanes a lieu dans le réticulum endoplasmique. Les sous-unités α et β du dystroglycane constituent le noyau du DAPC car elles établissent un lien transmembranaire entre la laminine et la dystrophine.⁴² En tant que composants intégrés au complexe des protéines associées à la dystrophine, les dystroglycanes interagissent avec une grande variété de ligands qui se trouvent à l'intérieur comme à l'extérieur de la cellule (Figure 8).²¹⁸

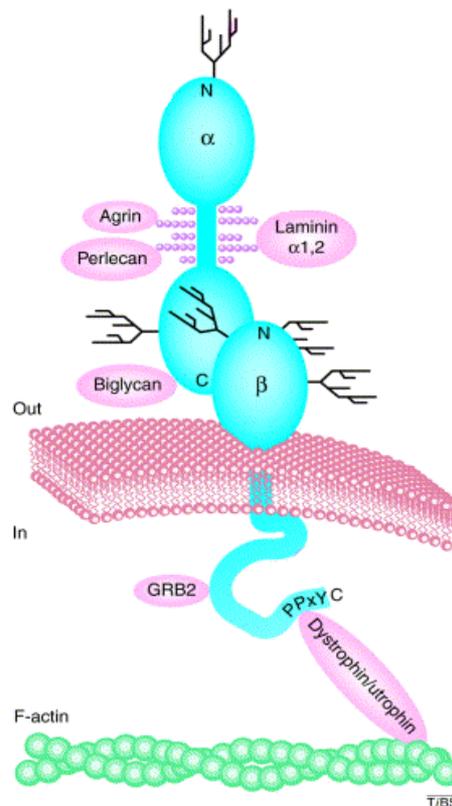


Figure 8. Représentation détaillée du complexe des dystroglycanes et de ses partenaires. L' α -dystroglycane extracellulaire et le β -dystroglycane transmembranaire sont indiqués en bleu. L'agrine, le perlecan et certaines isoformes de la laminine se fixent sur les chaînes d'hydrates de carbones de la région "mucin-like" de l' α -dystroglycane par l'intermédiaire de leurs domaines "laminine G-like". A l'inverse, le biglycane se lie à une région non glycosylée à l'extrémité C-terminale de l' α -dystroglycane. Grb2 s'associe de manière dépendante de SH3 à un des nombreux motifs potentiels de liaison SH3 sur l'extrémité C-terminale du β -dystroglycane. La dystrophine et l'utrophine interagissent avec le motif PPXY à l'extrémité C-terminale du β -dystroglycane *via* leurs domaines WW et lient l'actine-F par leurs extrémités N-terminales. D'après Winder *et coll.*, Trends in Biochem. Sci., 2001.

Les interactions de l' α -dystroglycane avec ses nombreux partenaires extracellulaires reposent essentiellement sur ses chaînes de glycanes latérales (cercles roses et ramifications noires sur la figure 8), mais également sur son état de glycosylation. D'une part, dans la matrice extracellulaire, l'agrine et le perlecan, deux protéoglycanes, ainsi que plusieurs isoformes de la laminine se lient au domaine "mucin-like" de l' α -dystroglycane par l'intermédiaire de leurs domaines LG ("laminine G-like"). Le domaine LG est constitué de cystéines répétées et cinq de ces répétitions sont retrouvées sur les chaînes α à l'extrémité C-terminale de toutes les laminines connues. L'interaction des laminines (chaînes α 1 et α 2 des lamines 1 et 2, respectivement) et du perlecan avec l' α -dystroglycane est, de plus, dépendante du calcium. Il a été proposé que l' α -dystroglycane se lie à la laminine soluble et permet son organisation ainsi que la réorganisation des récepteurs de la membrane plasmique et des éléments du cytosquelette en un réseau polygonal à la surface de la cellule au cours du développement.¹⁷⁸ D'autre part, le biglycane, un protéoglycane de la matrice extracellulaire, fixe spécifiquement l'extrémité C-terminale non glycosylée de l' α -dystroglycane.²¹⁸ Celui-ci est donc capable de s'associer à la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de ses glycanes, ajoutés à la protéine pendant sa glycosylation, mais également d'interagir directement avec des glycanes de la matrice.

L' α -dystroglycane extracellulaire interagit également de manière forte mais non covalente avec le β -dystroglycane, transmembranaire.¹⁷⁸ En 2001, une équipe italienne a identifié la région comprise entre les acides aminés 550 et 585 situés à l'extrémité C-terminale de l' α -dystroglycane comme étant celle qui permet la liaison à l'extrémité N-terminale du β -dystroglycane.¹⁷⁷ Cette région est hautement conservée. En effet, les auteurs précisent qu'elle présente 100% d'identité avec toutes les espèces vertébrées qu'ils ont pu analyser. Ils ont également montré que la liaison entre les deux sous-unités dystroglycanes est indépendante de la glycosylation.¹⁷⁷

Pendant le transport de l'appareil de Golgi à la membrane plasmique, le domaine intracellulaire du β -dystroglycane se lie à son domaine de liaison sur la dystrophine (voir figure 2).¹⁵¹ Les 15 derniers acides aminés situés à l'extrémité C-terminale du β -dystroglycane contiennent un motif PPXY, qui se lie à la région C-terminale de la dystrophine, contenant le domaine WW ainsi que deux domaines "EF-hand" et un domaine en doigt de zinc.⁴² Ce lien est stabilisé par la fixation de deux ions Ca^{2+} sur les domaines "EF-hand" de la dystrophine.¹⁶ Le domaine ZZ du β -dystroglycane lui permet également de se fixer à la dystrophine.³⁹ Il a cependant été montré que la dystrophine peut être localisée au niveau du sarcolemme même en l'absence de dystroglycane, suggérant ainsi l'existence d'un autre point d'ancrage de la dystrophine au sarcolemme.⁴²

Une autre protéine cytoplasmique associée au DAPC, la cavéoline-3, est, elle aussi, capable de se fixer au motif PPXY du β -dystroglycane grâce à son domaine WW et les travaux de Sotgia *et coll.* ont montré que la cavéoline-3 pouvait entrer en compétition avec la dystrophine pour se fixer au β -dystroglycane.¹⁸⁶ Cependant, alors que la liaison de la

dystrophine au β -dystroglycane est bloquée par la phosphorylation des tyrosines du motif PPXY, celle de la cavéoline-3 est indépendante de l'état de phosphorylation du motif PPXY.¹⁸⁶

La structure primaire du β -dystroglycane contient plusieurs régions riches en prolines à son extrémité C-terminale cytoplasmique.^{95,96} Le β -dystroglycane pourrait donc interagir avec un des domaines SH3, ou les deux, de Grb2. Les travaux du groupe de Campbell ont effectivement démontré la liaison de Grb2 au β -dystroglycane.²²³

c. Le complexe des sarcoglycanes et le sarcospane au sein du DAPC

De même que le complexe des dystroglycanes, le complexe des sarcoglycanes est assemblé dans le réticulum endoplasmique. Pendant les années qui ont suivi la mise en évidence des sarcoglycanes α , β , γ , et δ , leur mécanisme d'assemblage en un complexe intégré au sarcolemme est resté très obscur. En 1998, des expériences préliminaires ont été réalisées par Holt & Campbell dans un système cellulaire hétérologue exprimant chacun des sarcoglycanes, séparément ou de manière concomitante.⁸⁸ Ces travaux ont mis en évidence que la localisation des sarcoglycanes au sarcolemme dépend de la synthèse coordonnée et de l'assemblage des sous-unités α , β , γ , et δ en un complexe moléculaire. Holt & Campbell ont également démontré que l'assemblage du complexe des sarcoglycanes requiert des copies normales de chacune des sous-unités.⁸⁸ Cependant, le travail de Crosbie *et coll.* a montré, à partir de biopsies de patients, que la présence d'un γ -sarcoglycane tronqué au niveau de son extrémité C-terminale est suffisante pour l'association avec les autres sarcoglycanes en un complexe localisé au sarcolemme, mais insuffisante pour empêcher le développement d'une dystrophie musculaire.⁴⁷

Des études récentes publiées en 2004 et 2006, réalisées par le groupe de Chan, ont permis d'approfondir la compréhension du processus d'assemblage du complexe des sarcoglycanes.^{37,180} Elles ont tout d'abord pu montrer que le β -sarcoglycane joue un rôle important dans l'initiation de l'assemblage du complexe des sarcoglycanes. La glycosylation du β -sarcoglycane et son association avec le δ -sarcoglycane est essentielle pour que le complexe soit correctement localisé à la membrane. Ceci révèle que la formation du noyau structurel, β/δ -sarcoglycane, est une étape clé dans le processus d'assemblage des sarcoglycanes. Elle est suivie de la liaison du γ -sarcoglycane au noyau β/δ -sarcoglycane qui permet, dans une étape finale, d'incorporer l' α -sarcoglycane au complexe. Le γ -sarcoglycane sert donc de lien pour connecter l' α -sarcoglycane au noyau β/δ -sarcoglycane.¹⁸⁰

La figure suivante schématise l'ordre d'assemblage du complexe des sarcoglycanes dans les muscles striés (Figure 9).¹⁸⁰

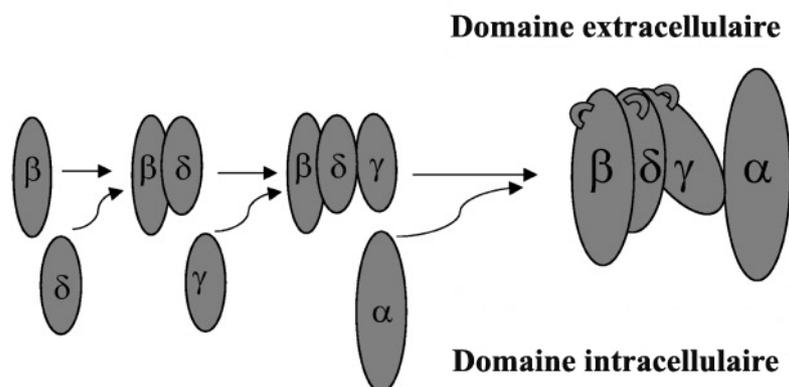


Figure 9. Assemblage du complexe des sarcoglycanes. Au cours de la première étape, les sarcoglycanes β et δ s'associent pour former un noyau structural. Puis le γ -sarcoglycane se lie au noyau β/δ -sarcoglycane pour servir d'ancrage à l' α -sarcoglycane qui vient s'amarrer au complexe en fin d'assemblage. Les ponts disulfures dans les domaines extracellulaires de β -, γ - et δ -sarcoglycane sont indiqués par des arches. D'après Shi *et coll.*, Muscle & Nerve, 2004.

Ce modèle d'assemblage est soutenu par l'ordre d'expression des différents sarcoglycanes au cours de l'embryogenèse et par des expériences de surexpression des sarcoglycanes. En effet, il a été montré que l'expression de β - et δ -sarcoglycane précède celle du γ -sarcoglycane, qui elle-même précède celle d' α -sarcoglycane.¹⁸⁰ D'autre part, Dressman *et coll.* et Li *et coll.* ont surexprimé β - ou δ -sarcoglycane, par transfert de gène au moyen d'adeno-associated virus (AAV) recombinants, dans des muscles déficients pour ces deux constituants du DAPC. Leurs travaux montrent une restauration complète du complexe des sarcoglycanes et ne mettent pas en évidence de toxicité cellulaire due à la surexpression de ces sarcoglycanes.^{57,121} Enfin des expériences de surexpression des sarcoglycanes α et γ ont été réalisées respectivement par transfert de gène dans un muscle de souris déficiente en α -sarcoglycane et par transgénèse ciblée de γ -sarcoglycane, sous le contrôle d'un promoteur spécifique du muscle, chez une souris normale.^{57,234} La surexpression d' α -sarcoglycane montre l'induction rapide d'une cytotoxicité cellulaire importante due à une infiltration étendue de macrophages et conduisant à la mort prématurée des animaux. De plus, les fibres musculaires positives pour l' α -sarcoglycane présentent souvent des caractéristiques dystrophiques, avec un noyau central et des diamètres variables selon les fibres.⁵⁷ Les souris surexprimant le γ -sarcoglycane développent rapidement une dystrophie musculaire sévère associant une perte de masse musculaire importante et une mort prématurée.²³⁴ Par ailleurs, Zhu *et coll.* ont également observé, de manière concomitante à la surexpression de γ -sarcoglycane, une augmentation de l'expression d' α - et de β -sarcoglycane. L'augmentation d' α -sarcoglycane n'est pas corrélée avec une augmentation de son ARNm.²³⁴ Les auteurs suggèrent que cette augmentation pourrait être due à un problème de régulation de l'assemblage du complexe au niveau du sarcolemme, conduisant à une accumulation d' α -sarcoglycane. Dans le cas de l'augmentation de β -sarcoglycane, les niveaux d'ARNm et de protéine sont tous deux augmentés.²³⁴ Il aurait été intéressant d'étudier également les niveaux de δ -sarcoglycane dans le cas de la surexpression du γ -sarcoglycane.

En synthétisant ces données expérimentales, il est possible d'envisager l'existence d'une régulation stœchiométrique transcriptionnelle des éléments précoces de l'assemblage, c'est-à-dire de β -sarcoglycane et δ -sarcoglycane, permettant la formation du noyau structurel proposé par le groupe de Chan. Le niveau de transcription des constituants plus tardifs du complexe, α -sarcoglycane et γ -sarcoglycane, serait ensuite "adapté" à la quantité de noyau structurel disponible dans la cellule. Ceci expliquerait les effets bénéfiques de la surexpression des sarcoglycanes β et δ et, à l'inverse, les effets délétères de la surexpression des sarcoglycanes α et γ , dus à un ratio aberrant des sarcoglycanes.

Le groupe de Chan a également identifié les domaines fonctionnels des sarcoglycanes permettant leur interaction au sein du complexe ainsi que leur ciblage à la membrane plasmique.³⁷ Ils ont pu montrer que la moitié N-terminale et la moitié C-terminale riche en cystéines des domaines extracellulaires des sarcoglycanes sont des domaines fonctionnels distincts essentiels respectivement à l'interaction entre les sarcoglycanes et à la localisation à la membrane plasmique. D'autre part, la glycosylation du δ -sarcoglycane ainsi que la région adjacente au domaine transmembranaire du γ -sarcoglycane sont importantes pour la localisation membranaire. Chen *et coll.* ont également détecté des sites sensibles à la protéase qui pourraient servir de séquences de liaison entre les régions N- et C-terminales ou bien entre les différents domaines structurels des sarcoglycanes.³⁷ La structure du complexe des sarcoglycanes proposée par Chen *et coll.* est représentée sur la figure ci-dessous (Figure 10).³⁷

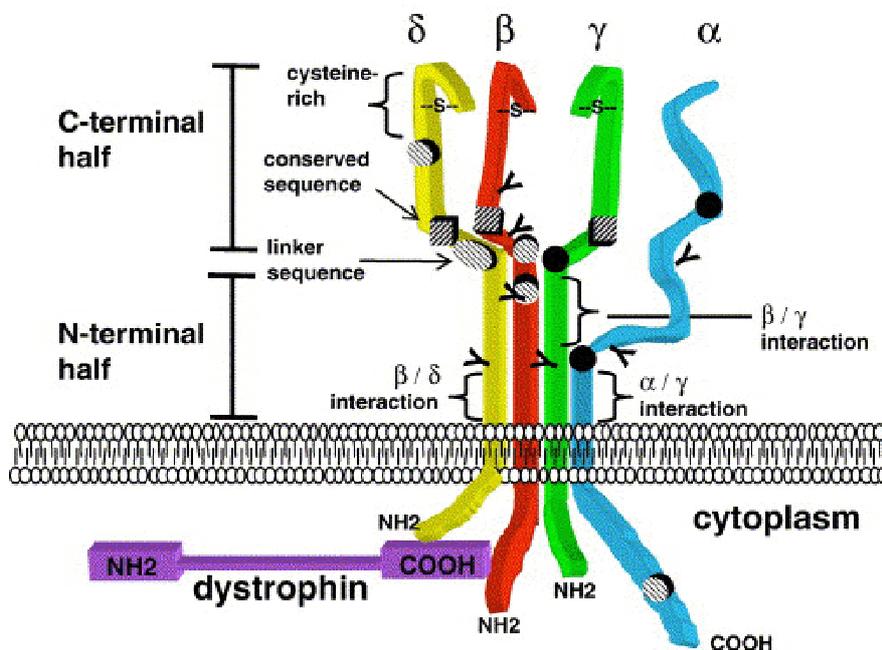


Figure 10. Modèle de la structure du complexe des sarcoglycanes. Les domaines extracellulaires des sarcoglycanes sont séparés en deux moitiés N- et C-terminales par des séquences de liaison ("linker sequence", en cercles hachurés). Les cercles noirs représentent des séquences de liaison potentielles identifiées par bioinformatique. Les moitiés N-terminales des domaines extracellulaires de chacun des sarcoglycanes sont essentielles pour les interactions entre les sarcoglycanes. Les moitiés C-terminales des domaines extracellulaires des sarcoglycanes β , γ et δ sont constituées d'une région riche en cystéines ainsi que d'une séquence conservée ("conserved sequence", en carrés hachurés). Les domaines intracellulaires des sarcoglycanes β et δ interagissent avec la dystrophine. Les sites de glycosylation ainsi que les ponts disulfures sont indiqués par "Y" et "-S-" respectivement. D'après Chen *et coll.*, Exp. Cell Res., 2006.

A ce jour, la seule protéine de la matrice extracellulaire interagissant avec les sarcoglycanes est le biglycane, qui se lie à l' α -sarcoglycane et au γ -sarcoglycane.²³ Cependant, Holt & Campbell ont également montré que le complexe des sarcoglycanes est un composant pré-requis du DAPC pour l'ancrage stable de l' α -dystroglycane à la face extracellulaire du sarcolemme, de même que pour le maintien d'un sarcolemme intact.⁸⁹ Certains auteurs suggèrent que le complexe des sarcoglycanes et l' α -dystroglycane pourraient être associés, soit par l'intermédiaire des β - et δ -sarcoglycane, soit par l'intermédiaire du sarcospane.¹⁸⁸

Du côté intracellulaire, le complexe des sarcoglycanes est associé à l' α -dystrobrevine. Trois isoformes de l' α -dystrobrevine sont connues pour être exprimées dans le muscle. Elles possèdent une région N-terminale commune qui est suivie de domaines C-terminaux de tailles variables. Ces trois isoformes forment des interactions hydrophobes avec le complexe des sarcoglycanes par leurs extrémités N-terminales communes.²²⁷

Bien que les sarcoglycanes étaient connus pour être étroitement associés à la dystrophine, aucune interaction directe entre ces composants du DAPC n'avait pu être mise en évidence. Mais le travail récent du groupe de Chan a montré que le noyau structurel β/δ -sarcoglycane interagit avec la partie C-terminale de la dystrophine.³⁷ Cependant, les auteurs n'ont pas étudié les interactions entre la dystrophine et le complexe des sarcoglycanes tétramérique, ce qui leur permet d'envisager l'existence de sites supplémentaires de liaison à la dystrophine au sein du complexe des sarcoglycanes complètement assemblé, afin de stabiliser l'interaction avec la dystrophine. Par ailleurs, un déficit en γ -sarcoglycane est corrélé avec une diminution de la dystrophine, ce qui semble montrer que le γ -sarcoglycane interagit directement avec la dystrophine.¹⁹⁷

Le complexe des sarcoglycanes s'associe également à des protéines sarcolemmales, et plus particulièrement le sarcospane et le β -dystroglycane. Il est connu que les sarcoglycanes se lient au sarcospane après avoir été transportés à travers l'appareil de Golgi.²²⁷ Cette interaction entre le sarcospane et le complexe des sarcoglycanes est très forte au niveau de la membrane plasmique.¹⁵¹ Elle est, de plus, dépendante de l'intégrité du complexe des sarcoglycanes. En effet, des travaux de Crosbie *et coll.* ont montré que l'assemblage du complexe des sarcoglycanes est un pré-requis pour le ciblage et la stabilisation du sarcospane au sarcolemme et que la présence de trois des quatre sarcoglycanes au niveau du sarcolemme n'est pas suffisante pour permettre une localisation du sarcospane à la membrane.^{46,47} Plusieurs groupes ont également montré des interactions électrostatiques entre les complexes des sarcoglycanes et des dystroglycanes, notamment des liaisons entre les sarcoglycanes β , γ et δ et le β -dystroglycane.^{178,227} Parmi ces interactions, celle entre le δ -sarcoglycane et le dystroglycane serait la plus étroite.³⁴

En ce qui concerne le sarcospane, il est synthétisé dans le réticulum endoplasmique puis assemblé au complexe formé par les dystroglycanes et les sarcoglycanes après leur translocation dans l'appareil de Golgi.¹⁵¹ Le sarcospane est connu pour être intimement lié au complexe des sarcoglycanes.⁴⁶ Le groupe de Crosbie a très récemment montré que deux

régions distinctes au niveau de la boucle extracellulaire du sarcospane sont indispensables pour la formation du sous-complexe sarcoglycane – sarcospane au sein du DAPC.¹³⁷

d. Les protéines cytoplasmiques au sein du DAPC

Les protéines cytoplasmiques, appartenant au DAPC ou étant associées avec lui, sont essentiellement la dystrophine, les dystrobrevines et les syntrophines, ainsi que les protéines de signalisation nNOS et Grb2, qui sont toutes reliées entre elles en un réseau protéique complexe.

Au niveau intracellulaire, la dystrophine se fixe à l'actine cytoplasmique γ non musculaire.¹⁷⁰ La dystrophine possède deux sites de liaison aux filaments d'actine du cytosquelette non contractile. Son premier site est localisé à l'extrémité N-terminale de la protéine.^{16,151} La dystrophine lie également l'actine, *via* des interactions électrostatiques, au niveau d'un groupe de répétitions basiques dans son domaine en bâtonnet.³⁸ Ses deux sites de fixation permettent à la dystrophine de former une association latérale étendue avec les filaments d'actine du cytosquelette non contractile au niveau des costamères.¹⁷⁰ Par ailleurs, la dystrophine s'associe directement avec le domaine PDZ de la nNOS.²⁴ Les syntrophines, *via* leur extrémité C-terminale, sont, elles aussi, associées à la région en hélice α située après le domaine ZZ de la dystrophine.¹⁶⁵ En effet, Ahn *et coll.* ont montré que les deux tiers de l'extrémité C-terminale des syntrophines, contenant les domaines PH1b, PH2 et SU peuvent co-précipiter avec les exons 73 et 74 de la dystrophine, à l'extrémité C-terminale de la protéine.⁸ Mais les syntrophines peuvent aussi se fixer à la dystrophine *via* leur domaine PDZ, comme la nNOS.²⁴ Après le domaine de liaison aux syntrophines, la dystrophine contient deux motifs d'heptades de leucines en hélices qui permettent des interactions entre la dystrophine et les α -dystrobrevines.¹⁶⁵ Les dystrobrevines sont donc à la fois des protéines structurellement reliées à la famille de la dystrophine et des protéines associées à la dystrophine.²³ Le domaine de liaison de la dystrophine aux α -dystrobrevines pourrait moduler l'interaction entre les syntrophines et les autres protéines associées à la dystrophine.¹⁸ La dystrophine possède, d'autre part, des sites de liaison avec différentes protéines sarcolemmales, telles que la cavéoline-3, les sarcoglycanes β , γ et δ , et le β -dystroglycane, qui ont été précédemment décrites.

Pendant une dizaine d'années après la découverte des composants du DAPC, un seul point d'ancrage de la dystrophine au sarcolemme était connu : le β -dystroglycane. Or, en 2002, des travaux publiés par Côté *et coll.* ont montré la présence de la dystrophine au sarcolemme en l'absence de β -dystroglycane, suggérant ainsi l'existence d'un autre point d'ancrage de la dystrophine au niveau de la membrane.⁴² Ces travaux ont également permis de visualiser la nNOS et la syntrophine α_1 à la membrane plasmique dans des fibres musculaires contenant de la dystrophine mais pas de dystroglycane. Il a été montré, de plus, l'existence d'une interaction entre la nNOS et la syntrophine α_1 .^{24,203} Une des hypothèses avancée par les auteurs serait que la nNOS puisse servir d'attache à la dystrophine au niveau de la membrane

car elle se lie à la cavéoline-3 et aux syntrophines, protéines qui sont localisées dans ou à proximité du sarcolemme.⁴² Cependant, ce lien de la dystrophine avec le sarcolemme indépendant du dystroglycane est insuffisant pour maintenir l'intégrité de la membrane musculaire. De plus, la présence de dystrophine au sarcolemme en l'absence de dystroglycane ne permet pas de restaurer le complexe des sarcoglycanes, alors qu'elle restaure la nNOS et les syntrophines.⁴²

Les dystrobrevines, quant à elles, possèdent deux sites de liaison avec les syntrophines au niveau de leur extrémité C-terminale.¹⁸ L'interaction entre les α -dystrobrevines et la dystrophine dans le muscle permettrait de recruter les syntrophines au sarcolemme.¹⁸ Les α -dystrobrevines ne contiennent pas la totalité du site de liaison avec le β -dystroglycane car elles ne possèdent pas de domaine WW mais elles ont un domaine "EF-hand" qui leur permet tout de même d'interagir avec celui-ci.¹⁶

3) Rôle du complexe des protéines associées à la dystrophine

a. Rôle structurel du DAPC

Les deux groupes de chercheurs qui ont mis en évidence le DAPC, Ervasti *et coll.* et Yoshida & Ozawa ont très tôt proposé un rôle pour ce complexe protéique. Dès 1990, Yoshida & Ozawa ont suggéré que ce complexe de protéines associées à la dystrophine pourrait permettre d'ancrer cette dernière au sarcolemme.²²⁵ Peu de temps après, le groupe de Campbell a envisagé que la dystrophine, grâce à ses liaisons avec des complexes de glycoprotéines transmembranaires, pourrait servir de lien spécialisé entre le cytosquelette d'actine et les composants de la matrice extracellulaire.⁶³ D'après eux, le DAPC servirait à maintenir l'intégrité de la membrane. Cette hypothèse a été confirmée par ce même groupe qui a testé les interactions du complexe purifié avec plusieurs composants de la matrice extracellulaire et l'actine purifiés. Les auteurs ont mis en évidence que le DAPC peut effectivement lier à la fois l'actine du cytosquelette et la laminine extracellulaire.⁶⁴ Des travaux ont, de plus, montré qu'un des rôles structurels du DAPC est de procurer un support mécanique à la membrane plasmique lors de la contraction des myofibrilles.¹⁵²

Au-delà du rôle joué par le DAPC dans sa globalité, chacun des sous-complexes et des composants individuels du DAPC, joue également un rôle structurel. Par exemple, le complexe des dystroglycanes forme un lien entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire, et il a été montré qu'il est crucial pour la stabilité structurelle de la membrane plasmique et pour le maintien de la matrice extracellulaire.¹⁷⁸ En ce qui concerne le complexe des sarcoglycanes, peu de choses sont connues sur son rôle mis à part que son intégrité est essentielle à la physiologie normale du muscle.³⁸ Il pourrait hypothétiquement stabiliser le DAPC dans le sarcolemme ou servir de stabilisateur moléculaire au sous-complexe des dystroglycanes.^{41,171} Une étude chez des hamsters présentant un déficit en δ -sarcoglycane montre une perte concomitante du complexe des sarcoglycanes mais également de celui des

dystroglycanes.¹⁷¹ Plusieurs données expérimentales et diverses observations semblent conforter l'hypothèse selon laquelle les sarcoglycanes pourraient, d'autre part, être les médiateurs d'interactions entre les cellules musculaires et la lame basale. En effet, l'utilisation d'un oligonucléotide antisens de l' α -sarcoglycane sur des cultures de cellules musculaires inhibe leur adhésion au substrat. De plus, la composition en isoformes de laminine dans la matrice extracellulaire des fibres musculaires est altérée chez les patients déficients en α -sarcoglycane.⁶⁶

Etant donné que les syntrophines, les dystrobrévines et le β -dystroglycane se fixent tous directement à la dystrophine, certains auteurs proposent que les sarcoglycanes et ces composants du DAPC pourraient coopérer *in vivo* pour interagir avec la dystrophine.³⁷ Cette hypothèse est soutenue par le fait que les syntrophines et les dystrobrévines semblent stabiliser les interactions protéine – protéine au sein du DAPC.²²⁷

Enfin, les quatre domaines transmembranaires du sarcospane pourraient lui permettre de s'accrocher fortement dans la bicouche lipidique et ainsi procurer un ancrage solide aux autres composants du DAPC.⁴⁴

b. Rôle fonctionnel du DAPC

Le DAPC ne fonctionne pas uniquement comme un support structurel mais également comme un complexe jouant un rôle dans la signalisation du maintien de l'intégrité du muscle.^{18,152} En effet, le DAPC pourrait jouer un rôle dans la communication cellulaire, étant donné qu'il existe des interactions connues entre le complexe et des molécules de signalisation, telles que la nNOS ou encore Grb2.³⁸ Cependant, aucun travail n'a montré d'implication directe du complexe dans la signalisation cellulaire et les seules preuves réunies pour soutenir cette thèse sont uniquement indirectes.

En tant que récepteur de la laminine, le complexe des dystroglycanes pourrait réguler l'organisation du cytosquelette par la transduction d'un signal impliquant Grb2 et venant de la matrice extracellulaire.²²³ Il est effectivement connu que Grb2 est impliqué dans le contrôle de l'organisation du cytosquelette.¹⁸⁶ Par ailleurs, certaines molécules de la cascade de signalisation ERK-MAP kinase (voir plus loin, le paragraphe sur les voies de signalisation de l'IGF-1), dont MEK et ERK, peuvent se fixer sur la queue cytoplasmique du β -dystroglycane, en plus des protéines de la famille de la dystrophine.¹⁶ Une autre interaction du β -dystroglycane, celle avec la cavéoline-3 pourrait réguler l'interaction et le recrutement de la dystrophine au sarcolemme. Sotgia *et coll.* ont montré que la présence de cavéoline-3 est capable d'interrompre le lien entre le β -dystroglycane et la dystrophine. Ils proposent donc que l'interaction entre la cavéoline-3 et le β -dystroglycane puisse jouer un rôle clé en stabilisant l'activité du sarcolemme.¹⁸⁶

Les gènes des sarcoglycanes sont connus pour être exprimés à de forts niveaux, dans le cas de β -sarcoglycane, ou de très forts niveaux, pour les sarcoglycanes α , γ et δ , dans les muscles par rapport aux tissus non musculaires alors que les autres composants du DAPC ont

des expressions homogènes dans tous les tissus. Cette expression importante des sarcoglycanes dans les tissus musculaires laisse penser que ceux-ci possèdent une ou plusieurs fonction(s) essentielle(s) pour la physiologie du muscle. Le complexe des sarcoglycanes pourrait agir comme un récepteur membranaire et ainsi jouer un rôle dans la transduction de signaux intracellulaires. En effet, des molécules de signalisation telles que les intégrines, la filamine ou nNOS sont associées au complexe des sarcoglycanes.¹⁸⁰ Le domaine cytoplasmique du γ -sarcoglycane comporte cinq résidus tyrosines, suggérant une signalisation bidirectionnelle avec les intégrines, des protéines transmembranaires qui jouent un rôle central dans la signalisation intracellulaire.¹⁸ Dans les muscles, les intégrines, et notamment la forme $\alpha_7\beta_1$, sont les seconds récepteurs des laminines après l' α -dystroglycane. Les sarcoglycanes γ et δ interagissent également avec la filamine-2, qui est impliquée dans l'organisation de l'actine et des transductions de cascades de signalisations vitales pour la cellule, telles que la migration cellulaire, l'adhésion, la différenciation, la force de transduction et la survie.^{18,193} Enfin, l' α -sarcoglycane possède une activité ecto-ATPase, c'est-à-dire qu'il est capable de fixer l'ATP extracellulaire de manière dépendante du Mg^{2+} et indépendante du Ca^{2+} , et de catalyser son hydrolyse.¹⁷

Parmi les différents éléments du DAPC, le sarcospane pourrait également posséder un rôle dans la signalisation cellulaire. Le sarcospane appartient à la superfamille des tétraspanes, dont il est connu que de nombreux membres sont associés avec les intégrines et impliqués dans la prolifération cellulaire.⁴⁴ D'autre part, les multiples régions transmembranaires du sarcospane pourraient former un pore dans le sarcolemme et servir de canal membranaire.⁴⁴

Pour finir, les syntrophines peuvent potentiellement servir de médiateurs dans la signalisation cellulaire car elles contiennent un domaine PDZ, qui permet de recruter des kinases, des canaux sodiques et la nNOS au DAPC. Ces protéines pourraient conduire à des modifications transcriptionnelles du DAPC en réponse à un stress mécanique.⁵

B- La cardiomyopathie dilatée et l'insuffisance cardiaque dans le contexte des sarcoglycanopathies

1) Les sarcoglycanopathies, une forme de dystrophie musculaire

Au sein du DAPC, les complexes des dystroglycanes et des sarcoglycanes sont particulièrement importants. En effet, le déficit du complexe des dystroglycanes est létal et celui du complexe des sarcoglycanes est pathologique et entraîne l'apparition de dystrophies musculaires diverses. Celles-ci constituent un groupe spécifique de dystrophies, appelé "sarcoglycanopathies", auquel nous nous intéresserons plus particulièrement dans ce chapitre.

a. Généralités sur les sarcoglycanopathies

Les sarcoglycanopathies appartiennent au groupe des dystrophies musculaires des ceintures ou LGMD, pour Limb-Girdle Muscular Dystrophy. Les LGMD forment un groupe d'affections qui atteignent préférentiellement les muscles situés autour des hanches et des épaules (ceintures pelvienne et scapulaire). Ce sont des pathologies hétérogènes qui présentent un large spectre, allant des formes les plus sévères, avec un début précoce dans les dix premières années de vie et une évolution rapide, à des formes modérées, avec un début plus tardif et une progression plus lente.²⁰⁰ Les LGMD sont classées en deux groupes selon leur mode de transmission génétique. Les LGMD1 sont à transmission autosomique dominante alors que les LGMD2 se transmettent de manière autosomique récessive.¹²⁴ Les sarcoglycanopathies sont classées parmi les LGMD2. Elles sont habituellement les formes les plus sévères de LGMD et sont constituées de quatre sous-groupes distincts, chacun dû au déficit d'un sarcoglycane : la LGMD2C (déficit en γ -sarcoglycane), la LGMD2D (déficit en α -sarcoglycane), la LGMD2E (déficit en β -sarcoglycane) et la LGMD2F (déficit en δ -sarcoglycane).¹⁹⁷

Les LGMD2C et 2D étaient auparavant appelées SCARMD1 et 2, pour Severe Childhood Autosomal Recessive Muscular Dystrophies 1 et 2. Cependant, certains patients SCARMD présentaient un phénotype plus modéré que celui habituellement rencontré. La classification de ces pathologies sur des critères cliniques a donc été remise en question et en 1995, lors d'un congrès réunissant des cliniciens, des pathologistes, des généticiens et des biochimistes, les SCARMD ont été intégrées au groupe des LGMD.²⁹ La classification actuelle tient compte du défaut génétique et non plus du phénotype des patients.

b. Pathogénèse des sarcoglycanopathies

Actuellement, les voies moléculaires par lesquelles le déficit génétique primaire en sarcoglycane conduit à la dégénérescence des cellules musculaires restent encore imprécises.

Mais il est connu qu'une des caractéristiques communes de ces pathologies est que la mutation primaire d'un seul des quatre sarcoglycanes conduit à une réduction drastique, dans les cas de mutations des sarcoglycanes α et γ , voire à la perte totale, dans les cas de mutations des sarcoglycanes β et δ , des trois autres sarcoglycanes non mutés.³⁸ Holt & Campbell ont étudié le mécanisme de déstabilisation du complexe des sarcoglycanes dans le cas d'un déficit en sarcoglycane, dans des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary). Ils ont montré que lorsque les sarcoglycanes sont exprimés ensemble dans le système cellulaire, ils sont glycosylés et assemblés à la membrane alors que chacun des sarcoglycanes exprimé individuellement est glycosylé mais n'est pas adressé à la membrane. La présence d'un sarcoglycane mutant empêche l'assemblage du complexe et sa localisation à la membrane plasmique.⁸⁸ Cependant, chez les patients atteints de sarcoglycanopathie, un même déficit primaire peut conduire à des phénotypes différents, indiquant d'une part, que le système *in vivo* n'est pas un système de "tout ou rien", et d'autre part, que des facteurs environnementaux ou génétiques pourraient déterminer les effets d'une mutation primaire.^{28,197}

En 1998, le groupe de Campbell a proposé un modèle de pathogénèse des sarcoglycanopathies.¹²⁴ La présence d'une mutation dans un gène sarcoglycane conduit à une diminution importante ou à la perte de la protéine sarcoglycane aberrante, ce qui a pour conséquence de perturber l'assemblage ou la stabilisation de l'ensemble du complexe, de modifier la perméabilité de la membrane et donc de déstabiliser le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette contractile. Une étude publiée par Yamada *et coll.* en 2001 soutient et précise ce modèle.²¹⁹ En effet, les auteurs ont montré qu'un fragment protéolytique du β -dystroglycane de 30 kDa, le β -DG₃₀, qui est retrouvé sur les biopsies de muscles squelettiques de patients atteints de sarcoglycanopathies, est obtenu par clivage du β -dystroglycane par une ou des MMP (matrix metalloproteinase ou métalloprotéinase matricielle). Les MMP sont une famille de protéases connues, entre autre, pour être impliquées dans le clivage de récepteurs à la surface de la cellule et dans la dégradation de protéines de la matrice extracellulaire. Le site de clivage par les MMP sur le β -dystroglycane est situé dans son domaine extracellulaire et le β -DG₃₀, qui contient le domaine transmembranaire du β -dystroglycane, correspond à son extrémité C-terminale. Ils ont également montré que le β -DG₃₀ n'est pas complexé avec l' α -dystroglycane, suggérant ainsi que le clivage du β -dystroglycane en β -DG₃₀ désintègre le complexe des dystroglycanes.²¹⁹ Yamada *et coll.* suggèrent, en conclusion de leur travail, que le complexe des sarcoglycanes masque le site de clivage des MMP sur le β -dystroglycane dans un muscle squelettique normal. L'absence de complexe des sarcoglycanes dans les sarcoglycanopathies entraîne donc le clivage du β -dystroglycane par les MMP, ce qui conduit à la rupture du lien entre la membrane basale et le sarcolemme.²¹⁹

La figure suivante schématise le mécanisme de pathogenèse moléculaire des LGMD2 dues au déficit d'un sarcoglycane proposé par le groupe de Campbell (Figure 11).¹²⁴

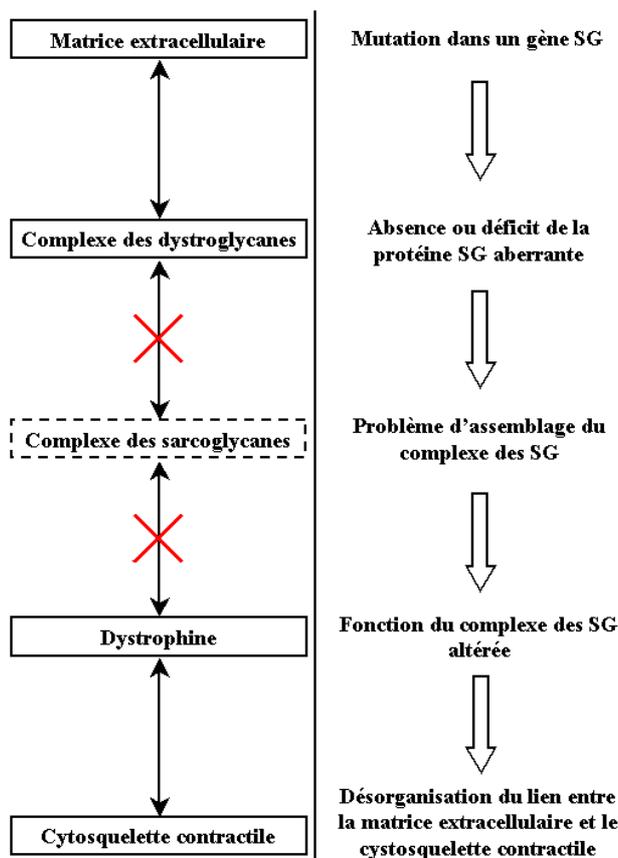


Figure 11. Mécanisme de pathogenèse des dystrophies musculaires dues à un déficit en sarcoglycane. Le DAPC sert de lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette contractile. Le complexe des sarcoglycanes participe directement à la liaison transmembranaire et joue un rôle de stabilisation du dystroglycane. La mutation d'un gène sarcoglycane (SG) entraîne un problème d'assemblage et une altération de la fonction du complexe des sarcoglycanes au niveau du sarcolemme. Ceci a pour conséquence de rompre le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette contractile. Modifié d'après Lim *et coll.*, Curr. Opin. Neurol., 1998.

c. Caractéristiques cliniques des sarcoglycanopathies

La présentation clinique des sarcoglycanopathies est relativement semblable à celle de la dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker (DMB).⁵¹ En effet, d'un point de vue clinique, les sarcoglycanopathies ne se distinguent pas des dystrophinopathies et leur diagnostic doit être établi à partir d'études immunohistochimiques et biochimiques. Bien qu'il existe de grandes variations entre les familles de patients atteints de sarcoglycanopathies, voire même au sein d'une même famille, celles-ci sont généralement considérées comme un groupe unique d'un point de vue clinique. Cette grande variabilité ne permet pas de prédire l'évolution ou la sévérité de la pathologie.^{23,30}

L'âge de début de la maladie est variable et se situe entre la petite enfance et l'âge adulte. Toutefois, chez la plupart des patients la pathologie se déclare dans les dix premières années de vie, avec une moyenne entre 6 et 8 ans. Vingt à 25% de tous les patients LGMD

sont atteints de sarcoglycanopathies. Mais en considérant seulement les cas les plus sévères de LGMD diagnostiqués dans la petite enfance, la proportion de sarcoglycanopathies est de 40 à 65% alors qu'elle n'est que de 10% en ce qui concerne les cas modérés à début plus tardif. Ceci indique que les sarcoglycanopathies sont préférentiellement à début précoce.²³

L'évolution de la pathologie est également très inégale. Certains patients perdent la marche très tôt, parfois même avant l'âge de 10 ans, alors que certains sont toujours valides à l'âge adulte.²³ Les patients présentent une faiblesse musculaire importante et très similaire à celle des patients atteints de myopathie de Duchenne ou de Becker.^{23,59} Néanmoins, les muscles des ceintures pelviennes (hanches) et scapulaires (épaules) sont touchés de manière plus précoce et plus importante. Les patients présentent très tôt un décollement des omoplates ainsi qu'une lordose lombaire sévère, c'est-à-dire une convexité de la colonne vertébrale en avant. Des contractures de leurs tendons d'Achille se développent progressivement et une hypertrophie des mollets, ainsi que d'autres muscles comme par exemple la langue, sont observées.²³ Des atteintes respiratoires apparaissent souvent avec la progression de la maladie et peuvent requérir l'utilisation d'une assistance ventilatoire. Ces atteintes respiratoires sont la conséquence du phénotype dystrophique qui touche le diaphragme, muscle strié majeur de la respiration, et elles sont une cause de mortalité importante chez les patients atteints de dystrophies musculaires. Une étude réalisée sur une population italienne de dix-sept patients atteints de sarcoglycanopathies a montré qu'un peu moins d'un quart des patients seulement présentent une fonction respiratoire normale et que les trois quarts restant ont une fonction respiratoire faiblement à sévèrement altérée.¹⁵⁴ Enfin, des atteintes cardiaques, qui sont majoritairement des cardiomyopathies dilatées, sont fréquemment diagnostiquées chez les patients atteints de sarcoglycanopathies.^{30,154} Cet aspect sera abordé plus longuement par la suite.

Des concentrations sériques très élevées de créatine kinase, une enzyme abondante dans le muscle, peuvent être mesurées jusqu'à dix fois supérieures à la normale, surtout dans les phases initiales de la maladie.^{23,59} Les biopsies musculaires des patients révèlent des caractéristiques dystrophiques telles que la nécrose, la régénération ou encore la prolifération de tissu gras et de tissu conjonctif.⁵⁹ A l'inverse de certains patients atteints de dystrophinopathies, les patients présentant une sarcoglycanopathie ne voient pas leurs capacités intellectuelles diminuer.²³

Des études cliniques réalisées sur un grand nombre de patients ont mis en évidence que les patients atteints d' α -sarcoglycanopathie sont ceux qui présentent le plus souvent des phénotypes modérés, ce qui est plus rare pour les patients atteints de β - et γ -sarcoglycanopathies. D'autre part, tous les patients atteints de δ -sarcoglycanopathies développent des phénotypes sévères.²³⁰ Cette variation dans la sévérité des atteintes en fonction du sarcoglycane déficient pourrait être corrélée à la variation de la composition du complexe des sarcoglycanes selon les muscles. En effet, les déficits en β - et δ -sarcoglycane touchent à la fois les muscles striés et les muscles lisses alors que les déficits en α - et γ -sarcoglycane ne concernent que les muscles striés. Lors de la découverte de

l'ε-sarcoglycane, Straub *et coll.* avaient suggéré qu'il devrait y avoir des différences cliniques entre les patients LGMD-2E et 2F et les patients LGMD-2C et 2D, étant donné que les muscles lisses ne doivent pas être affectés par des déficits en α- et γ-sarcoglycane.¹⁸⁸

d. Aspects génétiques des sarcoglycanopathies

i- Génétique des populations

Les sarcoglycanopathies peuvent représenter un pourcentage variable des LGMD2 selon les populations. Par exemple, elles représentent 68% des LGMD2 dans la population brésilienne alors qu'elles n'en constituent que 23% dans la population hollandaise.^{75,199} Elles sont souvent retrouvées dans des populations isolées ou dans lesquelles la consanguinité est fréquente, telles que la communauté Amish aux Etats-Unis, la communauté tzigane en Europe, le Brésil, la Sicile ou encore le Maghreb.⁵⁹ Ces données valident la notion que ces mutations proviennent d'un effet fondateur. De plus, la proportion de chacune de ces pathologies est variable en fonction des populations étudiées.²³¹ Dans une population de 39 familles brésiliennes, le groupe de Vainzof a rapporté 23% de LGMD2C, 40% de LGMD2D, 23% de LGMD2E et 14% de LGMD2F. Cette population est constituée de proportions relativement homogènes de chacun des sous-types de sarcoglycanopathie. A l'inverse, dans la population d'Afrique du Nord, la LGMD2C représente quasiment 100% des sarcoglycanopathies alors qu'en Europe et en Amérique du Nord, la majorité des patients ont une LGMD2D. La LGMD2F, quant à elle, est rare quelle que soit la population étudiée.²³¹

ii- Génétique humaine

Un grand nombre de mutations ont été identifiées dans les gènes des sarcoglycanes, notamment des mutations faux-sens et non-sens, des altérations d'épissage, ainsi que des délétions plus ou moins importantes.²⁰⁰ Toutes les mutations dans les gènes des sarcoglycanes identifiées jusqu'à aujourd'hui peuvent être consultées sur la base de données du site de l'université de Leiden aux Pays-Bas (<http://www.dmd.nl>).⁵¹

Les mutations retrouvées dans les sarcoglycanes sont essentiellement localisées dans les domaines extracellulaires, constituant les domaines les plus importants des protéines.^{30,124} Auparavant, les mutations faux-sens étaient associées à des phénotypes modérés tandis que des mutations nulles ou des délétions étaient associées à des phénotypes sévères.^{124,197} Cependant, cette association entre le type de délétion portée par le patient et la sévérité de son phénotype, n'est pas toujours vraie. En effet, deux patients portant des mutations différentes d'un acide aminé ne présenteront pas obligatoirement le même phénotype, et ce, même s'ils appartiennent à la même fratrie. Une mutation identique pourra également donner lieu à des phénotypes différents.^{124,197} Les raisons de cette variabilité sont pour l'instant toujours inconnues, bien que plusieurs hypothèses aient été formulées. Certains pensent que la quantité

d'expression résiduelle du complexe des sarcoglycanes peut affecter la sévérité de la pathologie. Par exemple, un patient présentant une expression du complexe des sarcoglycanes, même faible, sera moins sévèrement atteint qu'un patient présentant un déficit complet du complexe. D'autres avancent que des interruptions variables dans les structures secondaires des sarcoglycanes pourraient avoir des effets différents. Par exemple, la mutation d'un acide aminé intégré à un feuillet β en un acide aminé permettant de conserver cette structure donnera lieu à un phénotype moins sévère que dans le cas où la mutation interromprait la structure secondaire en feuillet β .¹²⁴

Cette variabilité génétique rend difficile l'identification des mutations portées par les patients. Néanmoins, certaines mutations, qui sont retrouvées plus fréquemment que d'autres, permettent d'accélérer le diagnostic. Par exemple, environ 40% des mutations dans les gènes α - et β -sarcoglycanes sont localisées dans l'exon 3, ou encore, parmi les patients atteints d' α -sarcoglycanopathie, approximativement 40% sont porteurs de la mutation Arg77Cys.²³

Le tableau ci-dessous récapitule les principales caractéristiques de chaque LGMD et notamment l'âge de début de la maladie, l'âge de perte de la marche, ainsi que la proportion de la créatine kinase sérique par rapport à un individu normal. La proportion et la distribution géographique de chaque LGMD sont également rappelées, de même que la présence d'une atteinte cardiaque, qui est une cardiomyopathie dilatée dans la plupart des cas, et sa sévérité (Tableau 3).^{78,231}

Tableau 3. Sarcoglycanopathies : hétérogénéité clinique, localisation géographique et atteinte cardiaque.

| | Protéine déficiente | Age de début de la maladie | Age de perte de la marche | Augmentation CK sérique | Distribution géographique | Atteinte cardiaque |
|--------|---------------------|--|--|----------------------------|--|---------------------|
| LGMD2C | γ -SG | 1 ^{ère} à 3 ^{ème} décade | 2 ^{nde} à 3 ^{ème} décade | 10x à + de 100x la normale | Rapportée dans de nombreux pays; très fréquente en Afrique du Nord | Modérée |
| LGMD2D | α -SG | 1 ^{ère} à 3 ^{ème} décade | 2 ^{nde} à 4 ^{ème} ou 5 ^{ème} décade | 10x à + de 100x la normale | Rapportée dans de nombreux pays; très fréquente en Europe et en Amérique du Nord | Rare |
| LGMD2E | β -SG | 1 ^{ère} à 3 ^{ème} décade | 2 ^{nde} à 4 ^{ème} décade | 10x à + de 100x la normale | Rapportée dans de nombreux pays | Fréquente et sévère |
| LGMD2F | δ -SG | 1 ^{ère} décade | 2 ^{nde} décade | 10x à + de 100x la normale | Relativement rare dans la plupart des pays; plus fréquente au Brésil | Fréquente et sévère |

LGMD = Limb-Girdle Muscular Dystrophy, SG = sarcoglycane et CK = créatine kinase. Modifié d'après Zatz, *et coll.*, Neuromuscular Disorders, 2003 et Goodwin *et coll.*, Muscle & Nerve, 2005.

e. Aspects histologiques des sarcoglycanopathies

Les biopsies musculaires des patients atteints de sarcoglycanopathies présentent des caractéristiques retrouvées dans la majorité des dystrophies musculaires. Dans des muscles de

sujets sains, la taille des fibres est homogène alors que celle des muscles dystrophiques est très variable, ce qui indique une activité de dégénérescence – régénération musculaire accentuée. De plus, le nombre de fibres musculaires présentant des noyaux centraux est significativement augmenté, ce qui reflète également une augmentation de la dégénérescence – régénération musculaire. Enfin, au cours de l'évolution de la pathologie, les fibres musculaires sont progressivement remplacées par des adipocytes et du tissu conjonctif, ceci entraînant une réduction de la masse musculaire et donc génère la faiblesse musculaire retrouvée chez les patients.¹³⁴

Du point de vue histologique, les sarcoglycanopathies partagent quelques caractéristiques communes. Il est établi qu'un déficit primaire d'un des sarcoglycanes résulte en un déficit secondaire des autres composants du complexe des sarcoglycanes.¹⁹⁷ Pour cette raison, l'analyse de biopsies musculaires par immunohistochimie au moyen d'anticorps primaires spécifiques de chacun des sarcoglycanes est devenue le premier outil de diagnostic des sarcoglycanopathies. L'étude de Vainzof *et coll.* a permis de mettre en évidence des aspects communs au sein de chacune des sarcoglycanopathies.¹⁹⁷ Ils ont en effet observé que les mutations primaires résultant en une diminution marquée ou une absence des constituants du complexe des sarcoglycanes sont aussi associées à une diminution de la quantité de dystrophine. Ceci signifierait qu'il existe une corrélation entre le déficit en sarcoglycane, notamment l'isoforme γ , et la quantité de dystrophine.¹⁹⁷

Dans le cas de la LGMD2C, les sarcoglycanes α , β et δ sont généralement présents mais avec des profils variables, qui ne sont pas corrélés avec la sévérité du phénotype, et tous les patients étudiés présentent une diminution de la dystrophine. Les patients LGMD2D peuvent également développer des phénotypes différents. Par exemple, un patient sévèrement atteint présente une absence totale de tous les sarcoglycanes et une réduction de la dystrophine, alors que des patients porteurs de la même mutation mais plus légèrement atteints sont positifs pour le γ -sarcoglycane, ont une quantité de dystrophine normale et sont négatifs pour les autres sarcoglycanes. Enfin, les patients LGMD2E et 2F sont généralement sévèrement atteints et montrent une absence totale des sarcoglycanes ainsi qu'une réduction de la dystrophine.^{151,197}

Cependant, les patients atteints de sarcoglycanopathies présentent de grandes variabilités histologiques et les caractéristiques générales précédemment décrites ne s'appliquent pas toujours, comme le montre la figure suivante (Figure 12).¹⁹⁸ Chez le patient LGMD2F, la dystrophine est bien préservée, le γ -sarcoglycane est fortement réduit et les trois autres sarcoglycanes sont absents. Dans le cas du patient LGMD2C, aucun des quatre sarcoglycanes n'est présent et la dystrophine est très réduite.

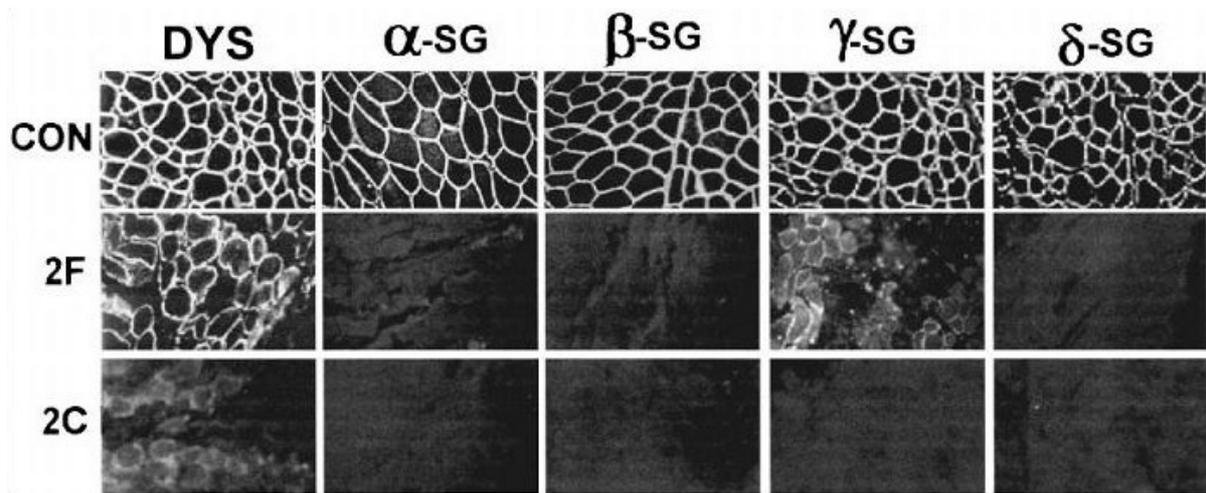


Figure 12. Profils en immunofluorescence de muscles squelettiques de patients atteints de LGMD2F et 2C. Les protéines marquées sont la dystrophine (DYS) et les quatre sarcoglycanes (SG) chez un contrôle (CON), un patient LGMD2F (2F) et un patient LGMD2C (2C). D'après Vainzof *et coll.*, Eur. J Hum. Genet., 1999.

D'autre part, Vainzof *et coll.* ont montré que les biopsies de tous les patients atteints de sarcoglycanopathies sont positives pour la dystrophine en immunofluorescence mais le marquage est irrégulier chez les patients les plus sévèrement atteints. De même, le marquage du β -dystroglycane est discontinu et faible, alors qu'à l'inverse, la laminine-2 présente un profil normal. Le phénotype des patients atteints de sarcoglycanopathies est très similaire à celui des patients présentant une DMD.¹⁹⁷ Toutefois, chez les premiers, le lien structural entre l'actine cytosquelettique et la matrice extracellulaire n'est pas maintenu car l' α -dystroglycane est absent, alors qu'il est préservé chez les seconds.³²

2) L'atteinte cardiaque dans les sarcoglycanopathies

Le complexe des sarcoglycanes, et plus largement le DAPC, sont présents à la fois dans le sarcolemme des muscles striés et dans celui des muscles lisses. Il paraît donc très probable que les patients dont le complexe des sarcoglycanes est déficient puissent présenter des symptômes, non seulement au niveau de leurs muscles squelettiques, mais également au niveau des muscles lisses et du cœur. Effectivement, des atteintes cardiaques sont fréquemment diagnostiquées chez les patients atteints de sarcoglycanopathies et elles sont dans la plupart des cas des cardiomyopathies dilatées (CMD).^{30,154} Ceci peut être expliqué par l'hypothèse proposée par Olson *et coll.* en 1998, qui serait que les CMD sont dues à des mutations dans des protéines impliquées dans la transmission de la force de contraction alors que les cardiomyopathies hypertrophiques (CMH) sont dues à des mutations dans des protéines impliquées dans la génération de la force de contraction.¹⁴⁷ Les CMD seraient des pathologies du cytosquelette alors que les CMH seraient des pathologies du sarcomère.¹⁹⁵ Toutefois, de nombreuses mutations identifiées récemment au niveau du cytosquelette et du sarcomère semblent indiquer que la distinction entre les mutations responsables de CMD ou de CMH n'est pas aussi nette.

a. La cardiomyopathie dilatée dans les sarcoglycanopathies

Alors que depuis quelques années, des affections cardiaques sont fréquemment diagnostiquées chez des patients atteints de sarcoglycanopathies, elles ont été considérées comme rares jusqu'à la fin des années 90 environ. Ceci peut s'expliquer par le fait que la plupart des études rapportant ce type de cas ne concernaient que des cas anecdotiques ou un petit nombre de patients. D'autre part, les patients dystrophiques étaient, à l'origine, pris en charge par des neurologues pour le traitement de leur atteinte musculaire squelettique. De ce fait, les affections cardiaques étaient rarement détectées. Or, les dystrophies musculaires ne sont pas seulement des affections du muscle mais elles touchent le système musculaire au sens large. Aujourd'hui, ces patients bénéficient de consultations cliniques pluridisciplinaires, et sont notamment suivis par des cardiologues. Enfin, les examens permettant de diagnostiquer d'éventuelles anomalies cardiaques associées à la dystrophie musculaire étaient auparavant souvent difficiles à réaliser chez ces patients (par exemple, des tests d'effort) ou considérés comme trop invasifs (comme le cathétérisme cardiaque). Le développement de nouveaux outils de diagnostic non invasifs a permis de généraliser la prise en charge des patients dystrophiques pour la détection d'éventuelles atteintes cardiaques.

En 1998, une étude a été réalisée par van der Kooi *et coll.* sur une centaine de patients atteints de LGMD aussi bien autosomiques, dominante (26 patients) et récessive (38 patients), que sporadiques (33 patients). Leur travail a montré que 10% des patients étudiés présentaient des anomalies cardiaques, et notamment des CMD dans le groupe des LGMD autosomiques récessives. Cette étude a été la première à prouver que les altérations cardiaques développées par les patients atteints de LGMD n'étaient pas rares, contrairement à ce que les cliniciens pensaient auparavant. L'analyse statistique réalisée sur les données récoltées a également permis de mettre en évidence une forte association entre la présence de CMD et l'absence d' α -sarcoglycane.²⁰¹ Ce résultat suggère qu'un grand nombre de patients atteints de sarcoglycanopathies est susceptible de développer une CMD étant donné que l' α -sarcoglycane est quasiment toujours absent dans le cas des LGMD2D, 2E et 2F. Mais, l'ADN des patients n'ayant pas été séquencé, aucune corrélation claire entre le génotype et le phénotype de ces patients n'a pu être établie, et la possibilité d'une mutation dans un autre gène n'a pas pu être exclue.

Cependant, l'importance de la proportion de patients atteints de sarcoglycanopathies primaires associées à une atteinte cardiaque a été confirmée par d'autres travaux et il est aujourd'hui largement admis que la cardiomyopathie accompagne couramment les sarcoglycanopathies. En 1999, Melacini *et coll.* ont publié une étude réalisée sur 13 patients atteints de LGMD2C, 2D et 2E, âgés de 5 à 50 ans (moyenne d'âge de 24,6 ans), et ne présentant pas de symptômes cardiaques. Ils ont pu observer que 30% des patients présentaient des anomalies à l'électrocardiographie ou à l'échocardiographie. En conclusion de cet article, les auteurs suggèrent qu'une évaluation cardiologique et un suivi à long terme soient réalisés chez tous les patients présentant un déficit primaire en sarcoglycane quel qu'il

soit.¹³⁵ En 2001, une évaluation cardiaque a été effectuée par Politano *et coll.* sur 20 patients atteints de sarcoglycanopathies primaires (LGMD2C, 2D, 2E et 2F) et âgés de 4 à 48 ans (moyenne d'âge de 22,2 ans).¹⁵⁴ Dans cette étude, une cardiomyopathie pré-symptomatique a été observée chez 40% des patients environ et une cardiomyopathie dilatée était présente dans quasiment 20% des cas. Les résultats obtenus par Politano *et coll.* ont également montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre l'atteinte des muscles squelettiques et l'atteinte cardiaque.¹⁵⁴ L'atteinte cardiaque dans les sarcoglycanopathies semble donc être concomitante à la dystrophie musculaire, et non pas secondaire à celle-ci.

Au vu de ces résultats, il semble donc que seule une partie des patients atteints de LGMD2 développe une cardiomyopathie, ce qui reste pour l'instant inexplicé. Cependant, il faut souligner que chacune des études précédemment citées a étudié des populations différentes, utilisé différentes méthodes d'évaluation de la fonction cardiaque et définit ses propres paramètres de diagnostic pour la cardiomyopathie. En effet, il n'existe aucune directive internationale concernant l'évaluation de la fonction cardiaque chez les patients atteints de dystrophies musculaires. Dans ces conditions, est possible d'envisager qu'une standardisation de cette évaluation ainsi que le choix d'outils et de paramètres communs de diagnostic permettraient de détecter une plus grande proportion de patients présentant une cardiomyopathie chez les patients atteints de sarcoglycanopathies.

Par ailleurs, la mise en évidence, par le groupe de Campbell, que la rupture du complexe sarcoglycane – sarcospane dans les muscles lisses vasculaires entraîne une altération de la fonction vasculaire qui initie le développement de la cardiomyopathie et aggrave la dystrophie musculaire, chez des souris déficientes pour le δ -sarcoglycane, apporte une nouvelle hypothèse quant à la présence d'une cardiomyopathie chez les patients atteints de sarcoglycanopathies.⁴¹ Une dysfonction au niveau de la microcirculation, due à l'absence de sarcoglycane, pourrait être un mécanisme supplémentaire expliquant le développement d'une cardiomyopathie. Il est intéressant de noter que les sarcoglycanopathies les plus fréquemment associées à une cardiomyopathie sont celles qui sont secondaires au déficit des deux sarcoglycanes exprimés dans les muscles striés et lisses, c'est-à-dire β - et δ -sarcoglycanes. Mais des cardiomyopathies sont également retrouvées chez des patients atteints de LGMD2C et 2D, bien que les sarcoglycanes déficients dans ces pathologies, respectivement γ - et α -sarcoglycanes, ne soient pas exprimés dans les muscles lisses vasculaires. Il est donc vraisemblable que d'autres facteurs soient impliqués dans le développement d'une atteinte cardiaque dans les sarcoglycanopathies.

Il est actuellement reconnu que les atteintes cardiaques sont fréquentes dans les sarcoglycanopathies et qu'il est indispensable, dans ces pathologies, de traiter non seulement l'atteinte squelettique mais également l'altération cardiaque afin d'améliorer la survie de ces patients.²⁷

b. De la cardiomyopathie dilatée à l'insuffisance cardiaque

La cardiomyopathie dilatée (CMD), qui est une pathologie du muscle cardiaque, est caractérisée par une dilatation du ventricule gauche (VG) et/ou du ventricule droit (VD) et par une altération de la fonction systolique ventriculaire gauche.¹⁹²

La CMD est définie, dans le cas d'autre pathologie myocardique inconnue, par une anomalie de la contractilité (fraction de raccourcissement inférieure à 25% et/ou fraction d'éjection inférieure à 45%) associée à une anomalie de la structure du cœur (diamètre du VG supérieur à 117% en fin de diastole).¹⁹² La fraction de raccourcissement cardiaque correspond au ratio entre la différence des diamètres en fin de diastole et en fin de systole sur le diamètre de fin de diastole. La fraction d'éjection est le rapport du volume d'éjection du cœur sur le volume en fin de diastole.

La figure suivante représente les différents compartiments cardiaques et permet de comparer un cœur dilaté à un cœur normal (Figure 13).¹⁹⁵

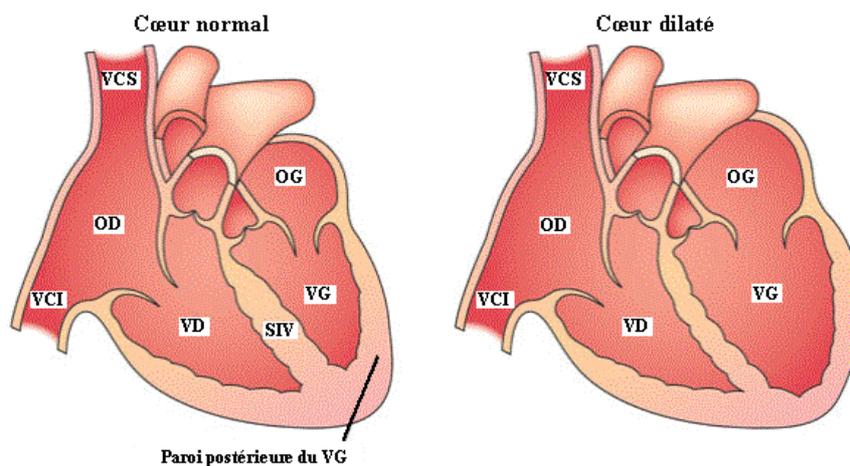


Figure 13. Cardiomyopathie dilatée. A droite, un cœur normal; à gauche, un cœur dilaté présentant une dilatation du ventricule gauche (VG) et de l'oreillette gauche (OG), et un amincissement du septum interventriculaire (SIV); VD = ventricule droit; OD = oreillette droite; VCI = veine cave inférieure; VCS = veine cave supérieure. Modifié d'après Towbin *et coll.*, Nature, 2002.

La prévalence de la CMD, c'est-à-dire la proportion de patients atteints dans une population donnée, se situe entre 40 et 50 cas pour 100 000 habitants dans la population générale.⁷¹ L'incidence annuelle, à savoir le nombre de nouveaux cas de CMD par an dans une population donnée, varie entre 5 et 8 cas pour 100 000 habitants.¹⁹⁵ Cependant, ces données sous-estiment très probablement l'incidence réelle de la CMD sachant qu'un grand nombre de cas asymptomatiques n'est pas diagnostiqué. Quelle que soit la cause sous-jacente, la progression de la CMD est rapide car la moitié des patients diagnostiqués décèdent dans les 4 à 5 ans après le diagnostic et 50% des patients sévèrement atteints décèdent dans l'année. Le décès des patients atteints de CMD est dû soit à une mort subite, soit à une altération de la pompe cardiaque.

La CMD est évolutive et aboutit inexorablement à l'insuffisance cardiaque (IC) chronique qui est définie par la Société Européenne de Cardiologie comme "un état physiopathologique dans lequel une anomalie de la fonction cardiaque est responsable de la défaillance cardiaque à pomper le sang à un niveau en rapport avec les demandes des tissus à fonction métabolique".⁶⁵ Parmi les cardiomyopathies, la CMD est la plus fréquente et est également la cause majeure d'insuffisance cardiaque chronique.¹⁹⁵ Les signes cliniques de la CMD sont progressifs et sont ceux retrouvés dans l'insuffisance cardiaque. Ils comprennent, entre autre, la dyspnée, c'est-à-dire des difficultés à respirer, une fatigabilité augmentée, une intolérance à l'effort, des syncopes, des vertiges ou encore la mort subite.¹⁹⁵ Cependant, dans le cas des patients atteints de CMD associée à une dystrophie musculaire, les manifestations précoces de l'insuffisance cardiaque, telles que la fatigue, la perte de poids, les vomissements ou encore les troubles du sommeil, sont souvent mal reconnues du fait de l'inactivité physique des patients et de l'absence de spécificité des signes d'altération cardiaque.

Les patients atteints d'insuffisance cardiaque sont habituellement répartis en quatre classes, établies par la New York Heart Association, selon la sévérité de leurs symptômes, et notamment la limitation de leur activité physique. La classification NYHA est la suivante :^{1,65}

- Classe I : pas de limitation ; l'activité physique ordinaire n'entraîne pas de fatigue anormale, de dyspnée ou de palpitations ;
- Classe II : limitation modeste de l'activité physique ; à l'aise au repos, mais l'activité ordinaire entraîne une fatigue, des palpitations ou une dyspnée ;
- Classe III : réduction marquée de l'activité physique ; à l'aise au repos, mais une activité physique moindre qu'à l'accoutumée provoque des symptômes ;
- Classe IV : impossibilité de poursuivre une activité physique sans gêne ; les symptômes de l'IC sont présents, même au repos, et la gêne est accrue par toute activité physique.

c. Cycle du calcium et insuffisance cardiaque

Au cours de l'insuffisance cardiaque, la contractilité myocardique est altérée. Or, la fonction de contraction cardiaque est fortement dépendante des mouvements du calcium intracellulaire et des études récentes ont montré que, dans de nombreux cas, l'altération du cycle du calcium précède l'apparition de l'insuffisance cardiaque.^{209,224} La dépolarisation électrique de la membrane entraîne la contraction du cardiomyocyte grâce au processus de couplage excitation – contraction. Dans les cardiomyocytes, la libération de Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique permet d'initier la contraction au moment de la systole. A l'inverse, la recapture du Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique, ou sa sortie à l'extérieur de la cellule, permet la relaxation au cours de la diastole. La force de contraction du cardiomyocyte est proportionnelle à l'amplitude du courant calcique généré par la libération de Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique, *via* des canaux intracellulaires libérateurs de calcium appelés récepteurs-2 de la ryanodine (RyR2).²⁰⁹

La figure ci-dessous représente le processus d'excitation – contraction qui a lieu dans les cardiomyocytes (Figure 14).²⁰⁹

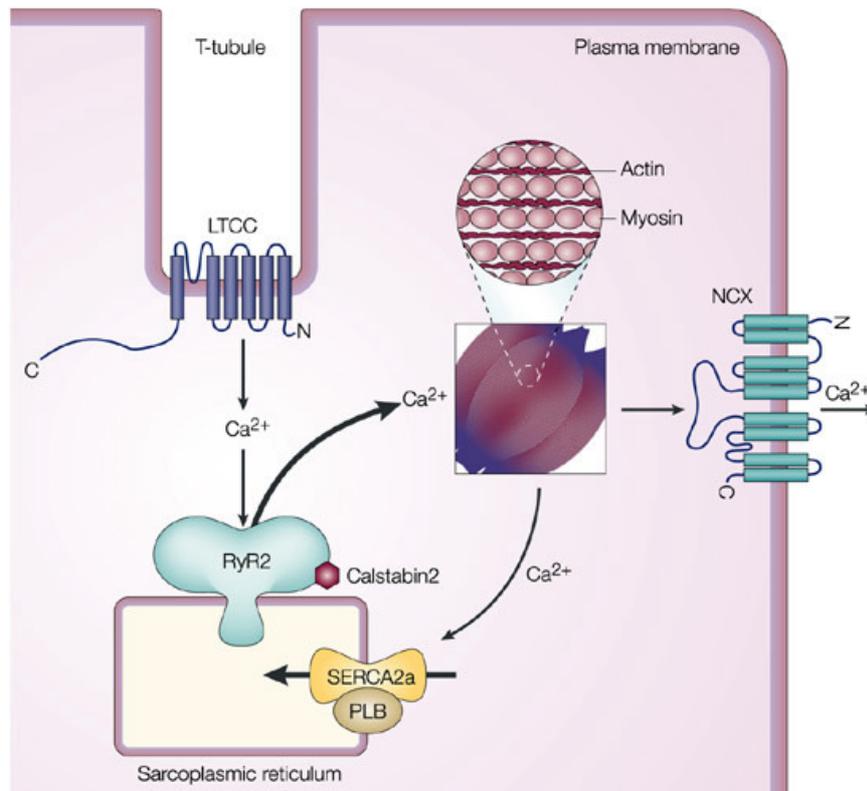


Figure 14. Couplage excitation - contraction dans le cœur. La dépolarisation au niveau des tubules transverses (T-tubule) permet d'activer les canaux calciques voltage-dépendant de type L (LTCC), laissant ainsi entrer le Ca^{2+} . L'entrée de Ca^{2+} dans la cellule active le récepteur à la ryanodine (RyR2). RyR2, qui est régulé par la calstabin 2 (ou FKBP12.6), libère le Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique dans le cytoplasme. L'augmentation de la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} induit la contraction au niveau des myofilaments. Pendant la relaxation, le Ca^{2+} est soit re-capté par le réticulum sarcoplasmique *via* une ATPase, SERCA2a, qui est régulée par le phospholamban (PLB), soit libéré dans l'espace extracellulaire *via* l'échangeur sodium/calcium (NCX). D'après Wehrens & Marks, Nat. Rev. Drug Discov., 2004.

Dans des conditions normales, la dépolarisation de la membrane plasmique, qui a lieu pendant la propagation du potentiel d'action, entraîne l'activation de canaux calciques voltage-dépendant de type L (LTCC, pour L-Type Ca^{2+} Channels), encore appelés récepteurs de la dihydropyridine (DHPR, pour DiHydroPyridine Receptor), qui sont localisés dans la membrane sarcolemmale au niveau des tubules T. L'entrée de calcium à l'intérieur du cardiomyocyte peut également se faire par les canaux calciques de type T (TTCC, pour T-Type Ca^{2+} Channels). Cette petite quantité de calcium entrant dans la cellule permet d'activer RyR2, qui va libérer une grande quantité de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique dans le cytoplasme. La libération de calcium dépendante du calcium a lieu exclusivement dans le cœur et est appelée "Ca²⁺-Induced Ca²⁺-Release" (CICR). Dans le cœur, l'activité de RyR2 est modulée par une sous-unité régulatrice appelée protéine 12.6 de liaison au FK506, ou FKBP12.6 (FK506 Binding Protein 12.6), encore appelée calstabin 2. Le calcium cytoplasmique va ensuite se fixer sur la troponine C au niveau des myofilaments pour

permettre l'amarrage de la tête de myosine sur l'actine et aboutir ainsi à la contraction musculaire. Au cours de la diastole, la relaxation myocardique est initiée par la dissociation du Ca^{2+} de la troponine C. Puis le Ca^{2+} cytoplasmique retourne dans le réticulum sarcoplasmique *via* une ATPase transmembranaire, la "Sarcoplasmic Reticulum ATPase 2a" (SERCA2a). L'activité de la SERCA2a est régulée par la fixation du phospholamban (PLN ou PLB). Sous sa forme non phosphorylée, PLN inhibe l'activité de SERCA2a. A l'inverse, sous sa forme phosphorylée, PLN active SERCA2a. Le calcium intracellulaire peut également être libéré dans l'espace extracellulaire en passant à travers le sarcolemme au niveau de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX, pour $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger), qui n'est autre que le TTCC en mode inverse.^{209,224}

Dans l'insuffisance cardiaque, l'homéostasie du calcium est perturbée. Le cycle intracellulaire du Ca^{2+} est ralenti et la concentration en Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique est diminuée.⁷² Ceci implique que chaque potentiel d'action conduisant à phénomène de CICR libère moins de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique et produit une force moins importante au cours du processus d'excitation – contraction. De nombreux patients insuffisants cardiaques présentent une diminution de l'amplitude du courant calcique intracellulaire et un transitoire calcique ralenti.²¹⁰ Chacune des étapes du couplage excitation – contraction peut être altérée, ayant pour conséquence une diminution de la contractilité cardiaque.^{72,209} La plupart des anomalies dans le cycle du Ca^{2+} résultent en des altérations de la fonction du réticulum sarcoplasmique. Ceci peut s'expliquer notamment par une diminution de l'expression et de la fonction de SERCA2a, une augmentation de l'activité ou de la quantité de NCX, ou encore une dysfonction de RyR2. Des fuites de Ca^{2+} peuvent également être impliquées. Enfin, l'augmentation du Ca^{2+} diastolique, c'est-à-dire le Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique ou extracellulaire, pourrait également altérer l'expression de gènes chez les patients insuffisants cardiaques.⁸²

d. Traitement de l'atteinte cardiaque dans les sarcoglycanopathies

En 2002, des recommandations spécifiques, sur la prise en charge de l'atteinte cardiaque dans les dystrophies musculaires ont été faites lors du 107^{ème} atelier de travail d'un groupe de spécialistes de la myologie et de cardiologues européens de l'ENMC (European NeuroMuscular Centre).²⁷ Comme nous l'avons vu précédemment, il est connu que les patients atteints de dystrophinopathies et de sarcoglycanopathies sont très susceptibles de développer une CMD. De ce fait, au moment du diagnostic de leur dystrophie musculaire, les patients présentant des anomalies cardiaques à l'examen sont plus nombreux que ceux présentant des symptômes avérés. Dans ces conditions, il existe peu d'études ayant fait la preuve de l'efficacité des traitements habituellement utilisés pour l'insuffisance cardiaque due à une CMD, ce qui ne permet pas d'établir des directives internationales pour la prise en charge de l'atteinte cardiaque dans les dystrophies musculaires.

i- Les recommandations de l'ENMC

Les patients atteints de sarcoglycanopathie associée à une CMD doivent être suivis de la même façon que les patients atteints de myopathie de Duchenne ou de Becker.²⁷ Pour ces derniers, le groupe de l'ENMC recommande des examens cardiaques, tels que l'échocardiographie ou l'électrocardiogramme (ECG), dès le diagnostic de leur dystrophie musculaire ainsi qu'un suivi avant n'importe quelle opération chirurgicale, tous les deux ans avant l'âge de dix ans et tous les ans ensuite. L'échocardiographie et l'ECG sont considérés comme des outils d'investigation appropriés pour le bilan clinique initial et pour le suivi des patients.

Les patients doivent être traités avec des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) de l'angiotensine II dès l'apparition d'altérations cardiaques, puis des β -bloquants peuvent être ensuite ajoutés au traitement. D'autre part, la transplantation cardiaque est indiquée chez des patients sélectionnés qui ne répondent plus aux traitements et dont l'insuffisance cardiaque continue de progresser. Toutefois, les déformations de la colonne vertébrale ainsi que l'insuffisance respiratoire qui sont fréquemment retrouvées chez ces patients les empêchent de bénéficier d'une transplantation cardiaque. Enfin, le groupe de l'ENMC préconise de surveiller les arythmies avec un ECG Holter, car des troubles du rythme, de type tachycardie ou bradycardie, peuvent être retrouvés chez ces patients.²⁷

ii- Les traitements classiques

A l'heure actuelle, les seuls traitements disponibles de la CMD, due à une dystrophie musculaire ou non, sont des traitements symptomatiques. En effet, à ce jour, il n'existe aucun traitement étiologique. Le but des traitements disponibles est de contrôler les symptômes de la pathologie et d'en ralentir l'évolution. Ces traitements sont identiques à ceux prescrits aux patients insuffisants cardiaques et sont en constante évolution. D'après un rapport de la Société Européenne de Cardiologie, "au cours de la dernière décennie, l'approche thérapeutique de l'insuffisance cardiaque s'est considérablement modifiée. Le traitement actuel ne se préoccupe pas seulement d'améliorer les symptômes, mais se concentre à prévenir le passage d'une dysfonction cardiaque asymptomatique à une insuffisance cardiaque symptomatique, à influencer sur la progression de la maladie et à réduire la mortalité".⁶⁵

Les prescriptions faites aux patients atteints de sarcoglycanopathies avec CMD sont basées sur l'extrapolation des effets des traitements classiques de l'insuffisance cardiaque due à une CMD.²⁷ Dans cette dernière, il existe de forts arguments en faveur de l'utilisation des IEC et aussi des β -bloquants, en cas de présence d'anomalies cardiaques détectables mais probablement, également de manière préventive. Aujourd'hui, le traitement de référence pour l'insuffisance cardiaque est constitué d'une association d'IEC et de β -bloquants.^{1,190}

Lors du 107^{ème} atelier de travail de l'ENMC en 2002, les participants avaient souligné le besoin urgent de réaliser des essais cliniques multicentriques afin de déterminer si le

traitement de la CMD chez les patients atteints de DMD, avant l'apparition des symptômes, pouvait améliorer le pronostic et la qualité de vie.²⁷ Cependant, une étude publiée en 1999 avait déjà montré qu'une thérapie associant des IEC et des β -bloquants permet d'améliorer les symptômes de l'insuffisance cardiaque et d'augmenter la survie des patients atteints de DMD.⁹⁹ Une étude réalisée par Duboc *et coll.* a également mis en évidence l'intérêt d'un traitement précoce des patients atteints de DMD avec un IEC, le perindopril, qui a retardé l'apparition et la progression de la dysfonction ventriculaire gauche.⁵⁸ Les auteurs préconisent un traitement avec le perindopril avant 10 ans et quelle que soit la fonction ventriculaire gauche des patients.

Le rôle des IEC est d'empêcher la production d'angiotensine II afin de diminuer la vasoconstriction et d'augmenter l'élimination d'eau et de sel dans les urines. L'enzyme de conversion de l'angiotensine, sécrétée essentiellement par le foie, permet la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II. Cette dernière, qui est une hormone possédant un puissant effet vasoconstricteur et un faible effet antidiurétique, entraîne donc une augmentation de la tension et de la perfusion au niveau des reins. L'angiotensine II stimule également la production d'aldostérone, un puissant antidiurétique, qui renforce son action. Les IEC ralentissent la progression de l'insuffisance cardiaque et sont considérés comme le traitement de choix pour ce syndrome car ils réduisent la mortalité et les hospitalisations.¹⁹² Néanmoins, en raison de leur effet vasodilatateur, les IEC peuvent être mal tolérés par les patients atteints de sarcoglycanopathies qui possèdent des complexes des sarcoglycanes déficients dans leurs muscles lisses.

Les β -bloquants, encore appelés antagonistes des récepteurs β -adrénergiques, bloquent les effets des médiateurs du système adrénergique en prenant leur place sur les récepteurs β -adrénergiques. Lorsque le cœur est défaillant, le système adrénergique, qui possède un rôle cardio-accélérateur, est stimulé pour essayer de compenser l'action de pompage affaiblie du muscle cardiaque et ainsi augmenter la fréquence des battements. Le principal médiateur du système adrénergique est l'adrénaline, qui agit par l'intermédiaire de récepteurs adrénergiques tissu-spécifiques. Les β -bloquants ont pour effet de réduire le rythme cardiaque (effet chronotrope négatif), de diminuer l'excitabilité cardiaque (effet bathmotrope négatif) et la contractilité myocardique (effet inotrope négatif), et enfin de limiter la vasodilatation. Les β -bloquants sont souvent utilisés en association avec les IEC. Tout comme les IEC, les β -bloquants agissent sur les muscles lisses et peuvent donc être mal tolérés par les patients atteints de sarcoglycanopathies.

Depuis le 107^{ème} atelier de l'ENMC en 2002, quelques études se sont intéressées à l'atteinte cardiaque dans les dystrophies musculaires, et notamment chez les patients atteints de DMD, et ont montré le bénéfice apporté par les thérapies associant les IEC et les β -bloquants chez ces patients.^{58,102} Cependant, le développement de nouvelles approches thérapeutiques spécifiques de l'atteinte cardiaque, et principalement de la CMD, dans les dystrophies musculaires apparaît aujourd'hui indispensable. La mise au point de nouveaux

traitements de la CMD est rendue possible grâce à l'utilisation de modèles animaux pertinents.

3) Modèles animaux de saroglycanopathies et de dystrophinopathies

Actuellement, il existe un grand nombre de modèles animaux de dystrophies musculaires permettant l'étude de ces pathologies et la mise au point de thérapies nouvelles. Les modèles naturels et transgéniques de dystrophinopathies et de sarcoglycanopathies écrits dans cette partie sont représentés sur la figure suivante (Figure 15).¹¹

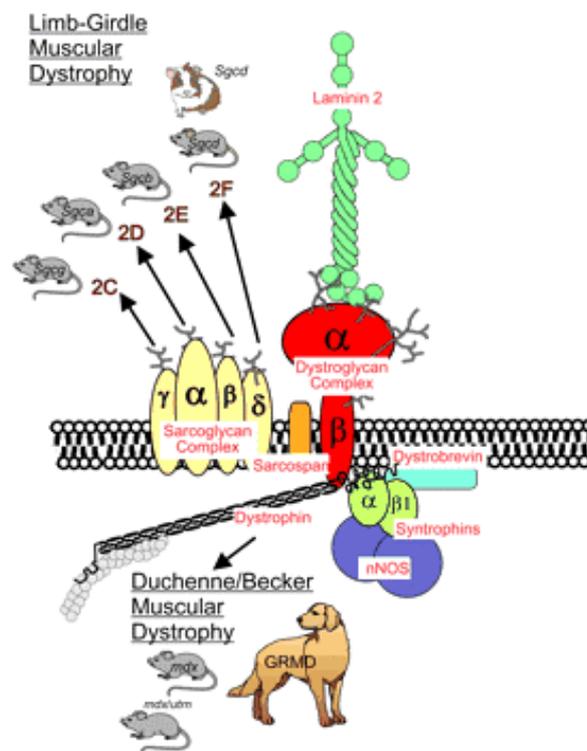


Figure 15. Principaux modèles animaux de dystrophinopathies et de sarcoglycanopathies. La souris *mdx* et le chien GRMD, déficients en dystrophine, ainsi que le hamster déficient en δ -sarcoglycane sont des modèles naturels. La souris *mdx/utr*, déficiente en dystrophine et en utrophine, ainsi que les souris *Sgcg*, *Sgca*, *Sgcb* et *Sgcd*, déficientes respectivement en γ -, α -, β - et δ -sarcoglycane, sont des modèles transgéniques. Modifié d'après Allamand & Campbell, Hum. Mol. Genet., 2000.

Des modèles porteurs de mutations spontanées ont été utilisés par les scientifiques depuis de nombreuses années, et même bien avant l'identification des gènes responsables de leur pathologie. Depuis lors, il a été montré que leurs mutations, bien que dans certains cas différentes de celles retrouvées chez l'Homme, avaient des conséquences similaires au niveau phénotypique. Les principaux modèles animaux de dystrophies musculaires naturelles sont la souris *mdx*, le chien dystrophique et le hamster cardiomyopathe.

En marge des modèles naturels et grâce aux progrès de la biologie moléculaire, les chercheurs ont également pu développer un grand nombre de modèles murins transgéniques de dystrophies musculaires, obtenus par invalidation de gène au moyen des techniques de

“knock-out” (KO) ou de mutagenèse dirigée.¹⁴⁵ Cette technique, réalisée chez la souris, permet de supprimer un gène (KO) ou de remplacer un gène sauvage par un gène porteur d’une mutation identifiée chez l’Homme (mutagenèse dirigée) afin d’obtenir une lignée de souris modélisant la pathologie humaine. Les animaux transgéniques de dystrophies musculaires permettent de contourner des obstacles bien souvent rencontrés chez les patients. Par exemple, dans ces pathologies, classées dans les maladies rares, le nombre de malades est souvent faible, rendant leur étude difficile. Les modèles animaux ont permis d’étendre largement le champ des connaissances en ce qui concerne la physiopathologie des dystrophies musculaires ainsi que le rôle du DAPC et de ses différents constituants.

a. Modèles animaux naturels

Parmi les principaux modèles animaux de mutations spontanées conduisant à des dystrophinopathies ou des sarcoglycanopathies, on retrouve la souris *mdx*, le chien dystrophique et le hamster cardiomyopathe.

La souris *mdx*, identifiée en 1984, est porteuse d’une mutation non-sens dans l’exon 23 du gène murin de la dystrophine entraînant une absence totale de la protéine.²⁰⁸ Les signes dystrophiques chez la souris *mdx* sont présents pendant les six premières semaines de vie puis le rythme de dégénérescence musculaire ralentit.²¹² A l’inverse de la DMD retrouvée chez l’Homme, la souris *mdx* ne présente qu’un phénotype modéré de dystrophie musculaire et sa durée de vie est quasiment normale.^{61,145} Ce modèle présente une dégénérescence musculaire et une fibrose moindre ainsi qu’une régénération musculaire plus importante que les patients DMD.¹⁷⁹ D’autre part, la plupart des muscles des membres de la souris *mdx* ne sont pas touchés, ce qui lui permet de garder sa mobilité. Seul le diaphragme présente des signes de dystrophie musculaire importants, tels que la fibrose et une perte de fibres musculaires.²¹² Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer l’atténuation du phénotype dystrophique observée chez la souris *mdx* par rapport au phénotype humain qui est sévère. Celle-ci pourrait être notamment due à une régénération musculaire plus importante chez la souris *mdx* que chez les patients DMD, ou bien à une compensation de l’absence de dystrophine par son homologue, l’utrophine.^{61,97,212} Malgré des différences importantes entre les phénotypes dystrophiques murin et humain, la souris *mdx* est largement utilisée pour l’étude des mécanismes de la pathologie ainsi que pour le développement de nouveaux traitements. Il faut toutefois noter que la souris *mdx* ne présente pas de pathologie cardiaque associée à la dystrophie musculaire.⁹⁷ De ce fait, la souris *mdx* ne constitue pas un modèle pertinent pour la mise au point de nouvelles thérapeutiques de l’atteinte cardiaque dans la dystrophie musculaire.

Le chien dystrophique, ou GRMD, pour Golden Retriever Muscular Dystrophy, a été identifié en 1958.¹⁷⁹ La dystrophie musculaire du chien GRMD est liée au chromosome X, comme chez l’Homme, et est due à une mutation ponctuelle dans le site accepteur d’épissage de l’exon 6 du gène canin de la dystrophine, entraînant une délétion de l’exon 7 et l’apparition

d'un codon stop prématuré dans l'exon 8. Ceci résulte en une absence de la dystrophine.¹⁴⁵ Le chien GRMD présente une dystrophie musculaire progressive phénotypiquement similaire à la DMD. Les premiers signes cliniques apparaissent vers l'âge de huit semaines et évoluent vers une perte graduelle de la masse musculaire et le développement d'une faiblesse ainsi que de contractures musculaires.^{145,179} Le chien GRMD connaît également une réduction de sa fonction respiratoire et une atteinte cardiaque identique à celle retrouvée chez les patients DMD.^{145,179} Toutes ces caractéristiques phénotypiques font du chien GRMD un modèle de choix pour la DMD. De plus, le chien est considéré comme un meilleur modèle animal que les rongeurs, du fait de sa plus grande taille et de son poids qui sont plus proches de ceux de l'Homme. Néanmoins, différentes portées de chiens GRMD, mais également différents animaux d'une même portée, peuvent présenter des variabilités phénotypiques importantes et le maintien d'un chenil n'est pas aisé.¹¹

Le hamster cardiomyopathe de la lignée BIO 1.50 a été identifié au début des années 1960. Il est utilisé depuis de nombreuses années comme un modèle animal de dystrophie musculaire et de cardiomyopathie, car il présente une atteinte musculaire squelettique et cardiaque.^{90,145} Le hamster cardiomyopathe est le seul modèle spontané de sarcoglycanopathie. Il porte une mutation, transmise de manière autosomique récessive, dans le gène du δ -sarcoglycane. Différentes lignées de hamsters cardiomyopathes ont été dérivées à partir de la lignée originelle BIO 1.50 et, de manière intéressante, peuvent présenter soit une CMH, soit une CMD.¹⁴⁵ Ceci implique qu'il existerait d'autres facteurs que le déficit génétique primaire pouvant influencer sur les caractéristiques phénotypiques des sarcoglycanopathies. La lignée qui est actuellement la plus utilisée est la lignée BIO 14.6. De même que dans la pathologie humaine, la perte primaire du δ -sarcoglycane chez le hamster entraîne un déficit secondaire des autres membres du complexe des sarcoglycanes. Les muscles squelettiques du hamster BIO 14.6 manifestent les signes typiques de dystrophie musculaire, tels que des noyaux centraux, une variation du diamètre des fibres musculaires, de la nécrose ou encore la prolifération de tissu conjonctif.^{145,208} D'autre part, dans la plupart des cas, le cœur des hamsters cardiomyopathes est plus affecté que ses muscles squelettiques et les animaux meurent d'insuffisance cardiaque.¹⁷⁹ Cependant, une différence importante entre la pathologie du hamster BIO 14.6 et les patients atteints de LGMD-2F réside dans le fait que l'atteinte cardiaque chez le hamster se manifeste d'abord par une hypertrophie puis éventuellement par la dilatation, alors que chez l'Homme il n'existe pas de phase hypertrophique.²⁰⁸ Néanmoins, d'autres lignées de hamsters cardiomyopathes issues de la lignée BIO 14.6, comme par exemple les lignées TO-2 ou CHF147, présentent une dilatation cardiaque sans étape d'hypertrophie.⁹⁷ Ces dernières lignées sont donc de meilleurs modèles que la lignée BIO 14.6 pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques de la CMD dans les dystrophies musculaires.

La pertinence de chacun de ces modèles animaux par rapport aux pathologies humaines a soulevé de nombreux débats au sein de la communauté scientifique. En effet, si on considère la souris *mdx*, celle-ci ne présente pas de phénotype clinique comparable à celui

des patients DMD et n'est en fait, de par son déficit en dystrophine, qu'un modèle de dystrophinopathie. Dans quelle mesure de nouvelles approches thérapeutiques développées chez la souris *mdx* peuvent-elles être appliquées à l'Homme ? Le chien GRMD manifeste, quant à lui, des signes cliniques qui ne sont pas retrouvés chez l'Homme, ou dans de moindres mesures, comme par exemple de très importants problèmes de déglutition qui sont propres à sa morphologie.

b. Modèles animaux transgéniques

Suite à l'identification des différents gènes responsables des dystrophinopathies et des sarcoglycanopathies humaines, les chercheurs ont généré autant de modèles animaux transgéniques à la fin des années 1990. Ainsi, des lignées de souris porteuses de mutations nulles pour chacun des sarcoglycanes ont été développées.^{86,145} Tous ces modèles murins manifestent des dystrophies musculaires progressives plus sévères que celle retrouvée chez la souris *mdx*, avec de larges foyers de myofibres en dégénérescence – régénération.¹⁴⁵ Le premier modèle transgénique de sarcoglycanopathie disponible a été la lignée murine *gsg*^{-/-} invalidée pour le gène du γ -sarcoglycane. Les souris *gsg*^{-/-} développent une dystrophie musculaire comparable à celle retrouvée chez les patients LGMD-2C, qui touche à la fois les muscles squelettiques et le cœur. Mais la cardiomyopathie des souris *gsg*^{-/-} est d'abord hypertrophique et évolue éventuellement ensuite vers la dilatation. Dans le cas des souris *asg*^{-/-}, qui modélisent la LGMD2D, l'atteinte musculaire est uniquement squelettique et les animaux ne présentent pas de phénotype cardiaque. Enfin, les souris *bsg*^{-/-} et *dsg*^{-/-}, qui sont les modèles des LGMD2E et 2F respectivement, ont un phénotype dystrophique identique à celui des souris *gsg*^{-/-}, c'est-à-dire qu'elles présentent des atteintes à la fois squelettiques et cardiaques.⁸⁶

Du fait du phénotype modéré et de l'absence d'atteinte cardiaque chez la souris *mdx*, un modèle murin transgénique a été développé, dans lequel les gènes de la dystrophine et de son homologue, l'utrophine, ont été invalidés. Les souris de la lignée *mdx/utr*^{-/-} montrent un phénotype très semblable à celui retrouvé chez les patients DMD, à l'inverse des souris *mdx*. Leur dystrophie musculaire est progressive et les animaux meurent prématurément entre 4 et 20 semaines environ.^{61,145} Bien qu'elles présentent une cardiomyopathie, les souris *mdx/utr*^{-/-} meurent d'insuffisance respiratoire, à l'inverse des patients DMD qui décèdent dans la plupart des cas de leur atteinte cardiaque.⁶¹

Un des inconvénients majeurs des modèles transgéniques de dystrophies musculaires réside dans le fait qu'ils sont souvent très bien caractérisés d'un point de vue génétique mais pas d'un point de vue phénotypique. Or, il est connu que des patients porteurs d'une même mutation peuvent présenter des différences cliniques et des profils protéiques différents. Les modèles animaux KO ne reflètent donc pas la complexité des dystrophinopathies et des sarcoglycanopathies humaines, notamment si on s'intéresse à la grande variabilité des mutations présentes chez l'Homme (faux-sens, non-sens, délétions, épissage...)⁴⁷

Il faut souligner que chacun de ces modèles animaux de dystrophinopathies et de sarcoglycanopathies, qu'ils soient naturels ou transgéniques, possède ses propres spécificités. D'autre part, il semble également important de rappeler que l'étude de chacun de ces modèles n'est pertinente que pour répondre à une question posée. La souris *mdx*, par exemple, est un très bon modèle pour l'étude des effets d'un déficit en dystrophine mais n'est pas un modèle de la DMD, contrairement à ce qui est fréquemment retrouvé dans la littérature. Il ne semble donc pas approprié de développer de nouvelles approches thérapeutiques dans ce modèle.

C-Un modèle animal de dystrophie musculaire associée à une cardiomyopathie dilatée : le hamster de la lignée CHF147

1) Généalogie de la lignée CHF147

La lignée CHF147 de hamsters (*Mesocricetus Auratus*) cardiomyopathes dont nous disposons au laboratoire est issue de la lignée BIO 1.50 identifiée au début des années 1960. Les différentes lignées de hamsters cardiomyopathes dérivées de cette lignée mère sont indiquées sur l'arbre généalogique ci-dessous (Figure 16).

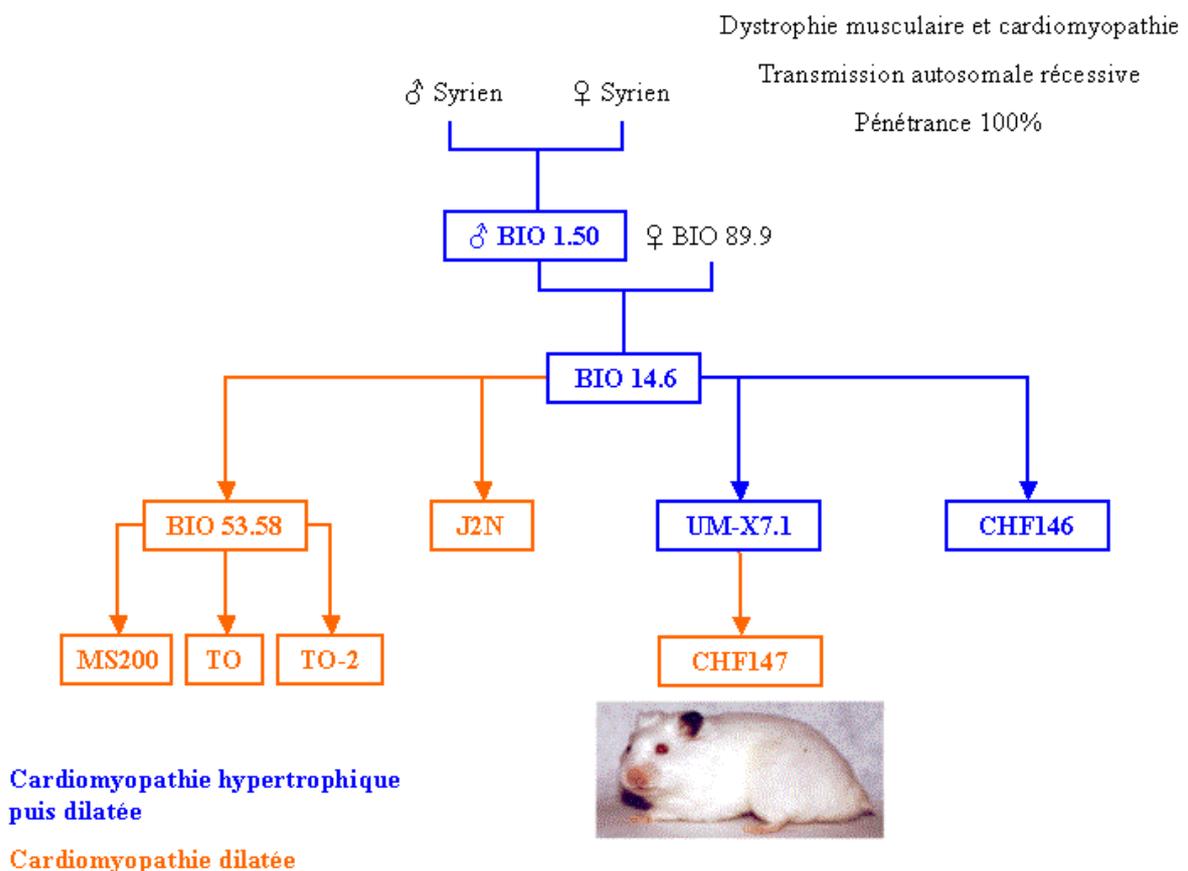


Figure 16. Arbre généalogique de la famille des hamsters cardiomyopathes. Les lignées en noires sont des lignées de hamsters sains. Toutes les lignées indiquées en gras sont atteintes d'une dystrophie musculaire et d'une cardiomyopathie à transmission autosomale récessive dont la pénétrance est de 100%. Les lignées de hamsters dont le nom est en bleu ont une cardiomyopathie hypertrophique qui évolue éventuellement vers une cardiomyopathie dilatée. Les lignées de hamsters dont le nom est en orange ont une cardiomyopathie dilatée.

La souche de hamsters BIO 1.50, décrite par Homburger *et coll.* en 1962, est dérivée de l'accouplement entre un mâle et une femelle Syriens sains et a été maintenue par reproduction entre frères et sœurs.⁹⁰ Les hamsters BIO 1.50 présentent une myopathie progressive généralisée qui touche à la fois les muscles striés squelettiques et cardiaques, et

qui peut apparaître dès l'âge de 20 jours. La pénétrance de la pathologie est de 100% et sa transmission est autosomale récessive.⁹¹ Les animaux survivent en moyenne 220 jours alors que des animaux de lignées contrôles vivent 700 jours en moyenne.⁹⁰ Cependant, après trois à quatre ans d'élevage, correspondant à environ 25 générations, l'évolution de la myopathie est devenue moins rapide et la survie des animaux a augmenté, passant de 220 jours à plus d'un an.⁹³ Afin de maintenir la lignée de hamsters cardiomyopathes, en 1964, un mâle de la lignée BIO 1.50 a été accouplé avec une femelle saine issue de la lignée BIO 89.9. A partir de cet accouplement, la reproduction d'animaux affectés entre eux a permis d'obtenir la lignée BIO 14.6.⁹³ La transmission de la pathologie dans la lignée BIO 14.6 est autosomale récessive, tout comme dans la lignée BIO 1.50. Plusieurs lignées de hamsters ont été dérivées de la lignée BIO 14.6, et notamment les lignées BIO 53.58, UM-X7.1, CHF146 et J2N.¹⁷³ La lignée BIO 53.58 a été obtenue aux Etats-Unis par le groupe de Homburger au Bio-Research Institute, de même que les lignées BIO 1.50 et BIO 14.6.⁹³ Plusieurs lignées, telles que les lignées TO, TO-2 ou MS200, issues de la lignée BIO 53.58 ont été élaborées par le groupe de Sole à l'université de Toronto au Canada.¹⁷³ La lignée UM-X7.1 a été développée à l'université de Montréal au début des années 1970 et a donné naissance à la lignée CHF147. Les lignées CHF146 et CHF147 ont été produites au Canada par le centre d'élevage Canadian Hybrid Farms.⁹⁴ Enfin, la lignée J2N a été développée au Japon à la fin des années 1990.¹³⁸

Il est intéressant de noter que l'atteinte musculaire squelettique est la même pour tous les hamsters cardiomyopathes dérivés de la lignée BIO 1.50, alors que leur atteinte cardiaque peut être, quant à elle, soit hypertrophique, soit dilatée. Dans le cas de la lignée BIO 14.6 par exemple, les animaux développent à l'âge de 5 mois une CMH qui évolue vers une CMD entre l'âge de 7,5 mois et 10 mois puis une insuffisance cardiaque congestive aux alentours d'un an.¹²⁷ Les hamsters UM-X7.1 et CHF146 ont également une atteinte cardiaque de type hypertrophique. A l'inverse, dans le cas de la lignée BIO 53.58, la pathologie cardiaque est une CMD sans phase hypertrophique qui progresse rapidement puisque la survie moyenne de ces hamsters est de 6 mois environ.^{93,127} Les lignées issues des hamsters BIO 53.58 ainsi que les lignées J2N et CHF147 ont aussi une CMD.

2) Identification de la mutation portée par les hamsters cardiomyopathes

Dans la première moitié des années 90, deux groupes de chercheurs, l'un aux Etats-Unis et l'autre au Japon, ont successivement montré que les hamsters cardiomyopathes présentent une désorganisation du DAPC, voire une perte totale de certains de ses composants, notamment des sarcoglycanes, qui pourrait être la cause primaire de la dystrophie musculaire et de la cardiomyopathie observée chez ces animaux.^{100,139,163}

En 1996, la construction d'une carte de liaison génétique du hamster de la lignée BIO 14.6, au moyen de générations d'animaux obtenues par backcross, a permis de cartographier le locus de la cardiomyopathie sur le chromosome 9qa2.1-b1 du hamster.¹⁴⁶ Au début de l'année suivante, Nigro *et coll.* ont pu localiser, par analyse de FISH, le gène du

δ -sarcoglycane sur ce même locus. Leur analyse génétique a montré que la mutation portée par les hamsters BIO 14.6 est une délétion des séquences régulatrices et du premier exon du gène du δ -sarcoglycane.¹⁴³

Dans l'année de la publication des résultats du groupe de Nigro, une étude réalisée par l'équipe de Sakamoto a mis en évidence que des hamsters atteints soit d'une cardiomyopathie hypertrophique (lignées BIO 14.6 et UM-X7.1), soit d'une cardiomyopathie dilatée (lignée TO-2) ont en commun une délétion du gène du δ -sarcoglycane. Leur travail d'analyse par restriction sur l'ADN génomique du hamster a également permis d'affiner la localisation de la délétion. Ils ont, en effet, constaté qu'une région de plus de 27,4 kb incluant le premier exon du gène du δ -sarcoglycane est délétée chez tous les hamsters cardiomyopathes étudiés, et que l'extrémité 3' de la délétion est située à 6,1 kb en amont de l'extrémité 5' de l'exon 2 du gène.¹⁷¹ Cette délétion contient le site majeur d'initiation de la transcription du gène. De plus, l'équipe japonaise a rapporté l'existence d'un promoteur cryptique permettant, chez les hamsters cardiomyopathes, la production d'un transcrite contenant un premier exon alternatif qui est situé en amont de la région délétée. La production de ce transcrite alternatif δ -sarcoglycane à partir du promoteur cryptique pourrait expliquer la présence d'un faible niveau d'expression d'ARNm δ -sarcoglycane, malgré la délétion d'une large région du gène du δ -sarcoglycane retrouvée chez ces hamsters. En effet, Sakamoto *et coll.* ont observé une forte réduction, mais pas une absence totale d'ARNm δ -sarcoglycane dans les muscles des hamsters cardiomyopathes. Cette observation a également été faite par le groupe de Nigro. Cependant, le groupe japonais suggère que les transcrits δ -sarcoglycane alternatifs sont probablement incapables de compenser le déficit en transcrits δ -sarcoglycane authentiques. Leur hypothèse est que la perte du polypeptide δ -sarcoglycane observée pourrait être la cause pathogénétique commune de la cardiomyopathie et de la dystrophie musculaire chez tous les hamsters cardiomyopathes, que leur atteinte cardiaque soit hypertrophique ou dilatée.¹⁷¹

En 1999, ce même groupe de chercheurs a cartographié la région génomique contenant la délétion du δ -sarcoglycane, chez des hamsters sains et chez des hamsters cardiomyopathes des trois lignées étudiées précédemment, soit les lignées BIO 14.6, TO-2 et UM-X7.1 (Figure 17).^{79,172} En plus des deux exons 1A et 1B, appelés respectivement exon alternatif et exon authentique, identifiés lors de l'étude précédente, Sakamoto *et coll.* ont pu mettre en évidence, un nouvel exon 1, l'exon 1C, dans la région génomique située entre l'exon 1B et l'exon 2. Chez les hamsters normaux, les exons 1B et 1C sont respectivement situés à 24,7 kb et 21,2 kb en amont de l'exon 2. L'exon 1A est, quant à lui, localisé à plus de 58 kb en amont de l'exon 2. Les extrémités 5' et 3' de la délétion sont respectivement situées à 35,9 kb et 6,1 kb en amont de l'extrémité 5' de l'exon 2 chez le hamster sain, ce qui correspond à une délétion génomique totale de 29,8 kb. Sakamoto *et coll.* ont également démontré que l'expression relative des différents transcrits épissés à partir des exons 1A, 1B et 1C est spécifique de chaque tissu musculaire. L'exon 1A est détecté dans le cœur et le muscle lisse, l'exon 1B est modérément ou fortement exprimé dans le cœur, le muscle squelettique et le muscle lisse et enfin, l'exon 1C est surtout présent dans le muscle lisse mais également, à de plus faibles niveaux, dans le cœur et le muscle squelettique.¹⁷²

Les auteurs ont tout d'abord observé qu'il n'existe aucune corrélation entre la pathologie et le sexe des animaux. D'autre part, jusqu'à l'âge de 30 jours, les hamsters CHF147 ont un poids comparable à celui de hamsters contrôles. Après cet âge, l'évolution de la courbe de croissance des hamsters CHF147 est moins importante que celle des animaux contrôles.⁹⁴

Au niveau cardiaque, Hunter *et coll.* ont observé que la dilatation du cœur commence dès l'âge de 30 jours par le ventricule droit, mais sans lésions microscopiques, celles-ci apparaissant dans le ventricule gauche à l'âge de 60 jours. Elles se manifestent notamment par des calcifications, qui sont également retrouvées dans le ventricule droit, bien que moins étendues. A 90 jours, les lésions sont sévères, les calcifications sont très répandues dans les deux ventricules et la dilatation de l'oreillette droite devient apparente. Des lésions microscopiques modérées dans l'oreillette droite deviennent visibles à partir de 120 jours, telles que de la fibrose interstitielle ou des calcifications. Ainsi, le développement des lésions dans le myocarde est progressif. Les premières lésions sont constituées d'une myolyse focale avec disparition du cytoplasme, d'une infiltration cellulaire modérée et une fibrose très modérée à l'âge de 60 jours. Puis, à 90 jours, le myocarde contient des zones plus importantes de nécrose et de fibrose, ainsi que quelques zones de calcium. A 120 jours, les lésions sont étendues et essentiellement constituées de fibrose et de calcifications, la fibrose laissant la place aux calcifications à 150 jours. Il faut noter que le myocarde est plus sévèrement touché par la fibrose que les muscles squelettiques, et que le ventricule gauche est plus lésé que le ventricule droit.⁹⁴

En ce qui concerne le muscle squelettique, Hunter *et coll.* ont observé dès l'âge de 30 jours des altérations constituées par une infiltration cellulaire importante. Parmi les différents muscles squelettiques étudiés, le diaphragme est le plus sévèrement atteint à cet âge, ainsi que tout au long de la vie des hamsters CHF147, et présente de nombreuses fibres nécrotiques avec des noyaux pycnotiques de même que de larges régions infiltrées principalement par des lymphocytes, mais aussi des fibroblastes et quelques macrophages. D'autre part, également dès l'âge de 30 jours, les fibres avec noyaux centraux, indiquant la présence d'une activité de dégénérescence – régénération musculaire, sont une caractéristique des muscles squelettiques du hamster CHF147. A partir de 60 jours, des régions de calcifications sont communément visibles dans le diaphragme, et occasionnellement dans les autres muscles squelettiques étudiés. Cependant, il est intéressant de noter que les hamsters CHF147 dont nous disposons au laboratoire ne présentent pas de calcifications au niveau du diaphragme, ce qui est probablement dû à une dérive de la lignée. Enfin, la taille des fibres musculaires est très hétérogène, quel que soit le muscle étudié, contrastant avec les muscles normaux dans lesquels la taille des fibres est homogène. L'évolution des lésions dans les muscles squelettiques est beaucoup plus lente que dans le muscle cardiaque.⁹⁴

L'étude des organes internes a montré des anomalies typiques de l'insuffisance cardiaque au niveau du foie et des reins. Le foie présente de nombreuses régions focales hémorragiques, ce qui lui donne, d'après les auteurs, une apparence de noix de muscade. Des

signes classiques de glomérulonéphrite sont visibles au niveau des reins. La glomérulonéphrite est une conséquence mais aussi une cause d'aggravation de l'atteinte cardiaque. Le seul autre organe présentant des signes pathologiques visibles est le pancréas. En effet, les auteurs ont observé, chez des hamsters CHF147 dès l'âge de 90 jours, des infiltrations graisseuses, qui s'aggravent progressivement avec l'âge. Enfin, à 120 et 150 jours, les hamsters CHF147 manifestent des hydrothorax et des ascites étendus.⁹⁴

En ce qui concerne leur durée de vie, les hamsters CHF147 meurent à l'âge de 350 jours en moyenne alors que des animaux contrôles ont une survie de plus de 600 jours. Dans les quinze derniers jours de leur vie, les hamsters déficients en δ -sarcoglycane présentent des signes de prostration et de cyanose.⁹⁴

De plus, bien que n'ayant pas été décrites par Hunter *et coll.*, certaines caractéristiques décrites dans d'autres lignées de hamsters cardiomyopathes sont aussi retrouvées chez les hamsters CHF147. Tout d'abord, des comparaisons de coupes histologiques de hamsters cardiomyopathes à différents âges a montré qu'il n'existe pas de cas de stagnation ou de régression de la myopathie.⁹² Ensuite, Factor *et coll.* ont décrit chez des hamsters BIO 53.58 une localisation de la nécrose myocardique dans les deux ventricules avec une prédilection pour les zones ventriculaires médianes et sous-épicardique, et pour le ventricule gauche par rapport au ventricule droit.⁶⁷ Enfin, l'inspection de la surface inférieure de la langue des hamsters a été utilisée pour différencier les animaux cardiomyopathes des animaux sains. En effet, toutes les lignées de hamsters cardiomyopathes présentent, après l'âge de 55 jours, des taches blanchâtres d'environ 1 à 5 mm de diamètre, qui sont des calcifications, sous et sur les côtés de la langue.⁹³

b. Dans les muscles lisses vasculaires

La nature des lésions retrouvées dans le muscle cardiaque, c'est-à-dire des régions focales lésées entourées par du myocarde normal, a très tôt laissé penser à l'implication d'une altération de la microcirculation myocardique dans la cardiomyopathie du hamster. En effet, une ischémie tissulaire localisée, due à une vasoconstriction d'un petit vaisseau, peut entraîner une nécrose focale. L'étude des microvaisseaux au niveau du cœur au moyen de techniques d'histologie ou de microscopie électronique n'avait pas mis en évidence d'anomalies structurelles. La visualisation de la microcirculation myocardique en 3D, par perfusion d'un liquide opaque durcissant, a, quant à elle, permis d'observer des altérations de la structure des vaisseaux. En effet, Factor *et coll.* ont pu remarquer un grand nombre de constriction vasculaires focales au niveau de la microcirculation myocardique ainsi qu'un rétrécissement diffus des vaisseaux et des irrégularités au niveau de la lumière de ces vaisseaux chez des hamsters cardiomyopathes dès l'âge de 30 jours (lignée BIO 53.58).⁶⁷ Les auteurs émettent l'hypothèse que ces anomalies morphologiques des vaisseaux au niveau du cœur sont le reflet de spasmes microvasculaires qui pourraient être la cause des lésions nécrotiques focales retrouvées dans la cardiomyopathie du hamster. Ces observations ont confirmé, dès 1982, soit

bien avant la description du δ -sarcoglycane et de sa présence dans le sarcolemme des muscles lisses vasculaires, l'existence d'altérations morphologiques des microvaisseaux.

Cependant, certains auteurs pensent que les spasmes vasculaires sont dus à l'absence du δ -sarcoglycane dans les cardiomyocytes et non pas dans les muscles lisses vasculaires. En effet, un travail réalisé par le groupe de McNally a montré que la restauration de l'expression du δ -sarcoglycane, spécifiquement dans le myocarde de souris $dsg^{-/-}$, permet de corriger les altérations morphologiques de la microcirculation, habituellement observées chez ces souris, alors qu'une réexpression du δ -sarcoglycane uniquement dans les muscles lisses artériels ne le permet pas.²¹⁶ Bien que la mutation portée par les souris $dsg^{-/-}$ ne soit pas la même que celle portée par les hamsters cardiomyopathes, les résultats obtenus par le groupe de McNally peuvent très probablement être transposés à notre modèle animal. En effet, les conséquences de la mutation du δ -sarcoglycane chez la souris $dsg^{-/-}$ et chez le hamster cardiomyopathe sont identiques.

D'un point de vue fonctionnel, une hyperréactivité de la paroi de l'aorte à l'angiotensine II ainsi qu'une activité tissulaire augmentée de l'enzyme de conversion au niveau de l'aorte ont été observées chez des hamsters cardiomyopathes (lignée TO-2) dès l'âge de deux mois.⁴³ Les hamsters cardiomyopathes ont également une fonction endothéliale aortique altérée, qui se manifeste par une réduction de la relaxation induite par l'acétylcholine. Or, la NOS est responsable de la relaxation induite par l'acétylcholine. Il semblerait donc que la dysfonction endothéliale aortique soit due à une production et/ou une libération altérée(s) de NO.⁴³ En marge de cette étude, Crosbie *et coll.* ont observé qu'un déficit en sarcoglycane entraîne une diminution très importante de la nNOS, entre autre dans les muscles de hamsters cardiomyopathes (lignée BIO 14.6) et Heydemann *et coll.* ont relevé une augmentation focale de la eNOS associée à une augmentation de la production de NO, spécifiquement au niveau des cardiomyocytes endommagés.^{48,87} Heydemann *et coll.* n'ont pas regardé si cette augmentation de eNOS est située au niveau des vaisseaux cardiaques. Néanmoins, il est possible d'envisager que l'endothélium vasculaire augmente sa production de NO, par l'intermédiaire d'une augmentation de eNOS, pour compenser la perte de la nNOS dans les cellules des muscles lisses vasculaires déficientes en δ -sarcoglycane qui constituent la média vasculaire.

Il faut toutefois souligner que tous ces auteurs relient les altérations morphologiques des microvaisseaux observées à des micro-spasmes vasculaires.^{67,216} Or, ces derniers correspondent à des modifications fonctionnelles de la microcirculation alors que toutes les expériences présentées dans les articles cités se sont intéressées uniquement aux altérations morphologiques des vaisseaux. D'autre part, les résultats obtenus à partir des études fonctionnelles réalisées sur l'aorte ne peuvent pas être transposés aux petits vaisseaux responsables de la régulation de la perfusion myocardique. Des études fonctionnelles complémentaires permettant, par exemple, de montrer des défauts de perfusion au niveau des petits vaisseaux, semblent donc nécessaires pour faire le lien direct entre des altérations

fonctionnelles et les anomalies morphologiques de la microcirculation observées par certains auteurs.

Jusqu'à aujourd'hui, l'origine des atteintes focales retrouvées dans le cœur des hamsters cardiomyopathes reste inexpliquée. L'hypothèse proposée à partir des résultats de l'étude d'Heydemann *et coll.* permet uniquement d'expliquer la présence des lésions focales situées autour des vaisseaux. En ce qui concerne les lésions focales situées en dehors des vaisseaux, elles pourraient être dues aux forces de cisaillement existant au niveau de la bande ventriculaire myocardique. Ce concept de bande ventriculaire myocardique a été développé par Torrent-Guasp qui a montré que le cœur est formé d'une bande musculaire unique repliée sur elle-même.¹¹¹

4) Conséquences moléculaires de la délétion en δ -sarcoglycane au niveau du DAPC chez le hamster cardiomyopathe

De même que chez l'Homme, la délétion en δ -sarcoglycane chez le hamster cardiomyopathe a des répercussions sur le DAPC. Effectivement, plusieurs études ont montré que l'intégrité du DAPC au sein du sarcolemme, à la fois dans le cœur mais aussi dans le muscle squelettique, est altérée dans ce modèle animal.^{100,163}

Dans le cœur des hamsters cardiomyopathes, au niveau protéique, Iwata *et coll.* ont observé un déficit complet en α -sarcoglycane et une forte diminution des dystroglycans (réduction de 90% et 60% respectivement pour l' α -dystroglycane et le β -dystroglycane), de même que de la dystrophine (réduction de 50%). A l'inverse, la laminine n'est pas modifiée.¹⁰⁰ Ces résultats ont été corroborés par Straub *et coll.* qui ont également montré un déficit complet des composants du complexe des sarcoglycans.¹⁸⁷ Aucune donnée concernant l'effet de la délétion en δ -sarcoglycane sur les niveaux d'expression de l' ϵ -sarcoglycane, du ζ -sarcoglycane et du sarcospane dans le cœur n'est actuellement disponible.

Un travail similaire a été réalisé dans le muscle squelettique par le groupe de Campbell.¹⁶³ Cette étude a montré que l' α -sarcoglycane est indétectable, tout comme dans le cœur, alors que la dystrophine et l' α -dystroglycane sont peu ou pas diminués. Cependant, ils ont également découvert que ces derniers sont moins fortement associés au sarcolemme chez les hamsters cardiomyopathes. Un an plus tard, en 1994, Yamanouchi *et coll.* ont également noté un déficit complet en 35DAG, c'est-à-dire en γ - et/ou δ -sarcoglycane (le clonage du δ -sarcoglycane n'a été réalisé qu'en 1996), mais un niveau normal de β -dystroglycane.²²² Les résultats obtenus par le groupe de Campbell et par Yamanouchi *et coll.* ont été confirmés par Mizuno *et coll.* en 1995.¹³⁹ Straub *et coll.* ont quant à eux noté que le niveau d'expression de l' α -dystroglycane pouvait varier d'un animal à l'autre, allant du déficit complet à un niveau normal.¹⁸⁷ Enfin, le niveau d'expression du sarcospane est très fortement réduit, voire nul, dans les muscles squelettiques des hamsters cardiomyopathes.⁴⁶

En ce qui concerne les muscles lisses, Straub *et coll.* ont montré que la perte de δ -sarcoglycane chez les hamsters BIO 14.6 résulte en une forte réduction des niveaux d'expression des sarcoglycanes β et ϵ ainsi que de l' α -dystroglycane, alors que ceux de la dystrophine et du β -dystroglycane ne sont pas modifiés.¹⁸⁸ L'expression de la laminine est, quant à elle, quasi normale.¹⁸⁸

Certains résultats ont été obtenus chez la souris *dsg*^{-/-}, déficiente en δ -sarcoglycane, et peuvent probablement être extrapolés au hamster cardiomyopathe, notamment en ce qui concerne les niveaux d'expression du ζ -sarcoglycane dans les muscles squelettiques et lisses, et du sarcospane dans les muscles lisses.^{15,214} Enfin, il n'existe pas de donnée sur le niveau d'expression de l' ϵ -sarcoglycane dans le muscle squelettique du hamster cardiomyopathe.

Le tableau ci-dessous récapitule les effets de la délétion en δ -sarcoglycane sur le DAPC des hamsters cardiomyopathes, dans le cœur, les muscles squelettiques et les muscles lisses (Tableau 4).

Tableau 4. Niveaux d'expression des composants du DAPC dans les différents types de muscles du hamster cardiomyopathe.

| Composants du DAPC | Types de muscles | | |
|--------------------------|------------------|-----------------------|----------|
| | Cardiaque | Squelettique | Lisse |
| Laminine $\alpha 2$ | Normal | Normal | Normal |
| α -dystroglycane | -90% | Normal à très diminué | Normal |
| β -dystroglycane | -60% | Normal | Normal |
| α -sarcoglycane | Absent | Absent | / |
| β -sarcoglycane | Absent | Absent | Absent |
| γ -sarcoglycane | Absent | Absent | / |
| δ -sarcoglycane | Absent | Absent | Absent |
| ϵ -sarcoglycane | ? | ? | Absent |
| ζ -sarcoglycane | ? | Absent * | Normal * |
| Sarcospane | ? | Absent | Absent * |
| Dystrophine | -50% | Peu diminué | Normal |

* = Montré chez la souris déficiente en δ -sarcoglycane, voir Wheeler *et coll.*, Hum. Mol. Genet., 2002 et Barresi *et coll.*, JBC, 2000.

La diminution des dystroglycanes dans les muscles striés pourrait s'expliquer par le clivage du β -dystroglycane par les MMP, comme nous l'avons vu précédemment.²¹⁹ En effet, des travaux du groupe de Matsumura ont montré que le processus de protéolyse du β -dystroglycane est activé *in vivo* dans les muscles squelettiques, cardiaques et lisses des hamsters BIO 14.6 et TO-2.¹²⁸ De plus, dans un modèle cellulaire, ils ont pu identifier les

MMP, et plus particulièrement, les MMP 2 et 9, comme responsables du clivage du β -dystroglycane et de la dégradation de son domaine extracellulaire.^{128,232}

Différentes analyses ont mis en évidence que les niveaux d'ARNm et les séquences d'ADNc pour les sarcoglycanes α , β , et γ étaient normaux chez les hamsters cardiomyopathes, à la fois dans les muscles squelettiques et dans le cœur.^{81,164,187} Les hamsters cardiomyopathes présentent également un niveau normal d'ARNm α -dystroglycane dans le cœur et dans les muscles squelettiques.¹⁸⁷

A l'inverse, tous les composants du complexe des sarcoglycanes sont perdus ou fortement réduits dans les muscles striés des hamsters cardiomyopathes.¹⁸⁷ Dans les muscles squelettiques, le lien entre la dystrophine et la laminine est intact étant donné que les niveaux de dystrophine, dystroglycanes et laminine sont bien préservés. Toutefois, la perte du complexe des sarcoglycanes entraîne une déstabilisation de l'interaction entre les dystroglycanes et entre la dystrophine et le β -dystroglycane, comme l'a montré l'analyse de muscles striés de souris ou de hamsters déficients en sarcoglycanes.¹⁸¹ D'autre part, la meilleure préservation du β -dystroglycane par rapport à l' α -dystroglycane peut s'expliquer par le fait que celui-ci est transmembranaire et directement ancré à la dystrophine.¹⁷¹

5) Utilisation du hamster cardiomyopathe pour le développement de nouvelles thérapeutiques de l'atteinte cardiaque

La cardiomyopathie est, dans la plupart des cas, la cause de mort subite et prématurée pour les différentes lignées de hamsters cardiomyopathes.^{90,94,187} Elle l'est également chez les patients atteints de sarcoglycanopathies, comme nous avons pu le voir précédemment. Dans ces conditions, il paraît indispensable de traiter spécifiquement l'atteinte cardiaque, en parallèle de l'atteinte des muscles squelettiques, et pour cela, deux approches thérapeutiques distinctes sont envisageables. La première approche consiste à traiter l'étiologie de la pathologie, c'est-à-dire à apporter le δ -sarcoglycane manquant afin de restaurer le complexe des sarcoglycanes. La seconde approche est de traiter les altérations cardiaques secondaires au déficit du δ -sarcoglycane, elle correspond donc à un traitement symptomatique.

a. Développement de traitements étiologiques

Le hamster cardiomyopathe sert de modèle pour le développement de traitements étiologiques de l'atteinte cardiaque dans le contexte des myopathies. Celui-ci consiste à apporter le gène manquant, c'est-à-dire le gène du δ -sarcoglycane, spécifiquement dans les cardiomyocytes. Deux stratégies distinctes peuvent être considérées : la thérapie génique, grâce à laquelle le gène du δ -sarcoglycane est inséré directement dans les cardiomyocytes, le plus souvent au moyen de vecteurs viraux, et la thérapie cellulaire, qui consiste à transplanter dans le cœur des cellules contenant le gène manquant.

Dans le cadre d'une approche par thérapie cellulaire, de nombreux types cellulaires ont été utilisés, tels que les myoblastes squelettiques, les cardiomyocytes fœtaux et embryonnaires et les progéniteurs dérivés de la moelle osseuse. Mais ces cellules n'ont pas montré d'efficacité substantielle dans la réparation myocardique.¹³⁶ Par exemple, un travail publié par le groupe de Ménasché, dans lequel des cœurs de hamsters CHF147 ont été transplantés avec des myoblastes squelettiques autologues, n'a pas montré d'effet bénéfique fonctionnel majeur chez les animaux transplantés.¹⁵⁵

La thérapie génique est l'approche la plus utilisée dans le cœur. Dans ce contexte, l'efficacité du transfert de gène dans le myocarde est dépendante de la voie d'administration ainsi que du type de vecteur choisis, de même que de la dose et du volume administrés.¹³⁶ Il existe cinq méthodes d'administration principalement utilisées pour délivrer du matériel génétique dans le myocarde (Figure 18).

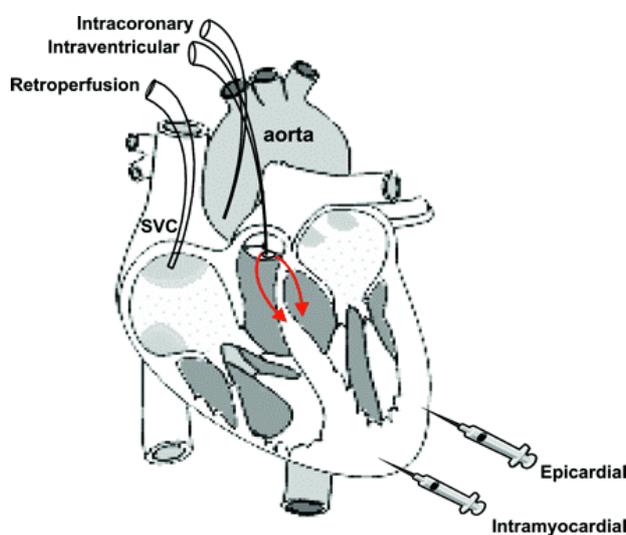


Figure 18. Différentes voies d'administration de gènes thérapeutiques dans le cœur. Plusieurs voies d'abord sont possibles selon que le vecteur est apporté directement dans le muscle, par voies épiscopardiques (epicardial) ou intramyocardiques (intramyocardial), ou *via* la circulation, par rétroperfusion (retroperfusion) ou par voies intracoronaires (intracoronary) ou intraventriculaire (intraventricular). Aorta = aorte, SVC = veine cave supérieure. D'après Melo *et coll.*, FASEB J., 2004.

Les voies épiscopardiques et intramyocardiques permettent d'injecter localement à la surface de l'épicarde et dans le myocarde, respectivement. Dans ces cas, la concentration de matériel injecté diminue avec l'éloignement par rapport au site d'injection. L'administration par voie intracoronaire permet, grâce à un cathéter, de délivrer le vecteur dans la région du cœur alimentée par l'artère coronaire. La délivrance intraventriculaire (par la racine aortique ou dans la cavité du VG) après occlusion aortique entraîne une distribution du vecteur dans le myocarde par perfusion antérograde. Lors d'une injection au niveau du sinus coronaire ou de la veine cardiaque le vecteur est distribué dans le myocarde par voir rétrograde.¹³⁶

Le premier transfert du gène du δ -sarcoglycane dans le cœur de hamsters cardiomyopathes a été rapporté en 1999 par l'équipe de Toyo-Oka.¹⁰⁵ Cette équipe a injecté un plasmide contenant le gène du δ -sarcoglycane dans la paroi libre du VG de hamsters TO-2, âgés de 10 semaines soit avant la progression de la dégénérescence myocardique. Le plasmide

a été enveloppé dans un liposome, constitué de lipides et de glycoprotéines du virus Sendai, lui permettant de pénétrer dans les cellules de manière beaucoup plus efficace qu'un plasmide nu. Sept jours après l'injection, le transgène δ -sarcoglycane est exprimé par les cellules myocardiques. D'autre part, les autres sarcoglycanes du complexe, α -, β - et γ -sarcoglycanes sont également détectés dans les cardiomyocytes dont le δ -sarcoglycane a été restauré, au niveau du sarcolemme mais également du cytoplasme.¹⁰⁵ Cependant, le vecteur utilisé ne permet d'obtenir qu'une expression transitoire du transgène, d'une à quatre semaines.

Dans les années qui ont suivi, plusieurs types de vecteurs viraux ont été testés pour transférer le gène du δ -sarcoglycane dans le cœur du hamster cardiomyopathe, et principalement les adénovirus (AdV) et les AAV. Les AdV ne sont pas particulièrement indiqués pour cette approche étant donné qu'ils ne s'intègrent pas dans le génome de la cellule hôte, ne permettant qu'une expression transitoire du transgène, et qu'ils induisent une réponse immunitaire importante de la part de l'hôte. Par contre, les AAV sont considérés comme des vecteurs appropriés car ils peuvent infecter des cellules quiescentes, ils n'induisent pas ou peu de réaction immunitaire et ils s'intègrent de manière stable dans le génome de la cellule hôte. Un de leurs inconvénients majeurs est qu'ils sont difficiles à produire.

En 2002, des hamsters BIO 14.6 âgés de 7 à 9 semaines, ont été injectés, sous hypothermie et cardioplégie froide, avec un AdV5 contenant le gène du δ -sarcoglycane, après une occlusion transitoire de l'aorte et de l'artère pulmonaire.⁹⁸ Ikeda *et coll.* obtiennent une expression du δ -sarcoglycane au niveau du sarcolemme et des tubules T, après une semaine et trois semaines suivant le transfert de gène, ainsi qu'une restauration des sarcoglycanes α et β à la membrane des cardiomyocytes. D'autre part, les hamsters traités présentent une fonction cardiaque préservée par rapport à celle des animaux non traités.⁹⁸ Cette approche paraît, cependant, difficilement applicable à l'Homme, étant donné que cette méthode d'injection n'est utilisée que chez l'animal et que le vecteur viral utilisé n'est pas particulièrement adapté.

L'équipe de Toyo-Oka a poursuivi son travail de restauration du δ -sarcoglycane chez le hamster cardiomyopathe en utilisant un vecteur viral, l'AAV recombinant de type 2.¹⁰⁶ Le transfert du gène du δ -sarcoglycane a été réalisé par injection directe intramyocardique dans l'apex et le ventricule gauche du cœur de hamsters TO-2 âgés de 5 semaines. La transfection d'un gène rapporteur, qui permet d'évaluer l'efficacité de transfert, indique que 40% des cardiomyocytes sont transfectés au niveau du site d'injection. A dix et vingt semaines après l'injection, le transcrit et la protéine δ -sarcoglycane sont détectés dans les cœurs de hamsters. Comme dans l'étude précédente, Kawada *et coll.* montrent une restauration du complexe des sarcoglycanes au niveau du sarcolemme dans le cœur des hamsters traités. De plus, les animaux traités présentent des améliorations de la morphologie et de la fonction diastolique.¹⁰⁶ L'équipe de Toyo-Oka a également observé que la restauration du δ -sarcoglycane permet de protéger les cardiomyocytes jusqu'à 35 semaines après l'injection.¹⁰⁷ Enfin, la survie des hamsters traités est significativement augmentée par rapport aux animaux contrôles, puisqu'ils ont une survie supérieure à celle des hamsters TO-2.¹⁰⁷

Dans une autre étude, publiée en 2003 par Li *et coll.*, des cœurs de hamsters BIO 14.6 âgés d'un à deux mois ont été isolés, puis infusés *ex vivo* par voie coronarienne avec un AAV2 contenant le gène du δ -sarcoglycane et transplantés chez des animaux syngéniques.¹²² Les résultats ont montré une expression du transgène au niveau de la membrane et du cytoplasme, voire une surexpression dans certains cardiomyocytes, ainsi que la restauration des trois autres sarcoglycanes du complexe au sarcolemme, permettant de protéger l'intégrité de la membrane plasmique. A l'inverse, l'expression du transgène n'est pas détectée dans les vaisseaux sanguins cardiaques.¹²² Toutefois, la technique chirurgicale utilisée dans cette étude ne permet pas d'évaluation de la fonction physiologique. L'étude n'a donc pas pu montrer d'effet bénéfique sur la fonction cardiaque.

Enfin, un travail très récent de l'équipe de Xiao a étudié les effets de l'administration systémique du gène du δ -sarcoglycane humain au moyen d'AAV8, chez des hamsters TO-2 nouveau-nés (10 jours) et adultes (1,5 mois).²³³ Une injection unique d'AAV8- δ SG chez des hamsters TO-2 nouveau-nés ou adultes a permis d'obtenir une expression persistante du δ -sarcoglycane dans le cœur, ainsi que dans tous les muscles étudiés, pendant au moins 6 mois et avec une efficacité proche de 100%. D'autre part, la réexpression du δ -sarcoglycane conduit au recrutement des autres constituants du complexe des sarcoglycanes et donc à la restauration de l'intégrité de la membrane des cellules musculaires. Pour finir, Zhu *et coll.* ont également démontré l'efficacité thérapeutique de l'AAV8- δ SG, à la fois morphologique et fonctionnelle, au niveau cardiaque chez les hamsters TO-2.²³³

Toutes ces études ont montré le bénéfice thérapeutique obtenu après restauration du δ -sarcoglycane chez des hamsters cardiomyopathes nouveau-nés ou jeunes, à un âge auquel le cœur ne présente pas encore de lésion. Cette approche peut donc être envisagée comme une thérapie nouvelle dans les cas où les patients sont diagnostiqués très précocement pour leur sarcoglycanopathie. Cependant, un grand nombre de patients n'est diagnostiqué qu'à un âge plus tardif, généralement celui auquel ils développent leurs premiers symptômes musculaires et donc bien souvent, à un âge auquel l'atteinte cardiaque est déjà installée. Dans ce contexte, il semble indispensable de développer de nouvelles approches thérapeutiques permettant de traiter les symptômes de la dysfonction cardiaque.

b. Développement de traitements symptomatiques

Chez l'Homme, deux systèmes physiologiques jouent un rôle important dans la progression de la dysfonction cardiaque : le système nerveux sympathique et le système rénine-angiotensine-aldostérone. Les principaux médicaments utilisés actuellement dans le traitement de l'insuffisance cardiaque, comme les β -bloquants, les IEC, les antagonistes de l'aldostérone ou encore les antagonistes du récepteur de type 1 de l'angiotensine II, bloquent l'activation de ces systèmes. Ils permettent d'améliorer les symptômes en préservant la fonction cardiaque et diminuent ainsi la morbidité et la mortalité chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque congestive modérée à sévère.¹¹⁵

Le hamster cardiomyopathe présente également une activation anormale du système rénine-angiotensine-aldostérone et du système nerveux sympathique, cette dernière se traduisant par une augmentation du renouvellement de la noradrénaline cardiaque et des enzymes impliquées dans sa voie de synthèse.^{80,183} Pour cette raison, ce modèle a été utilisé pour tester l'efficacité de traitements symptomatiques de l'atteinte cardiaque en général, et pas seulement dans le contexte des dystrophies musculaires. Depuis la fin des années 1970 environ, les effets de nombreux agents pharmacologiques, notamment des IEC, des β -bloquants ou encore des digitaliques, des antagonistes de l'aldostérone et des inhibiteurs calciques, ont été testés chez le hamster cardiomyopathe. Parmi ces différentes molécules, plusieurs sont efficaces chez l'Homme et sont actuellement utilisées en clinique. Les effets observés chez le hamster cardiomyopathe sont identiques à ceux observés chez l'Homme, ce qui valide la pertinence du modèle animal utilisé. Par exemple, en 1991, Haleen *et coll.* ont traité de façon prolongée pendant 120 jours avec du quinapril, un IEC, des hamsters cardiomyopathes âgés de 180 jours (lignée CHF146). Ils ont montré que ce traitement permet de préserver la fonction ventriculaire gauche, ralentit la dilation ventriculaire et améliore significativement la survie des animaux.⁸⁰

Grâce à une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque, des thérapies combinant les différentes classes de médicaments ont progressivement été mises en place chez les patients, afin de traiter les différents symptômes de manière concomitante. Ces multi-thérapies ont démontré des effets bénéfiques additifs par rapport à chacun des traitements séparés. De plus, certaines études ont montré que ces médicaments, utilisés à des doses différentes de celles prescrites classiquement dans le traitement de l'insuffisance cardiaque, possèdent des effets bénéfiques supplémentaires, particulièrement sur le remodelage ventriculaire. Laviolle *et coll.* ont notamment mesuré les effets d'une bithérapie, associant un IEC (enalapril) et un β -bloquant (metoprolol) ou un IEC et un antagoniste de l'aldostérone (spironolactone), et d'une trithérapie IEC – β -bloquant – antagoniste de l'aldostérone, administrés chroniquement à des doses faibles chez des hamsters cardiomyopathes (lignée TO-2) entre l'âge de 150 et 240 jours. Les doses ont été choisies afin d'améliorer le remodelage cardiaque sans agir sur la pression systémique sanguine. Laviolle *et coll.* ont effectivement mis en évidence une absence d'effet hémodynamique systémique et régional, ainsi qu'une diminution de la cavité du VG et de la densité en collagène dans le VD, avec les deux bithérapies. De plus, la trithérapie a permis une diminution plus importante de la densité en collagène dans le VD.¹¹⁵

Cependant, il est reconnu que le traitement de l'insuffisance cardiaque est limité par les agents pharmacologiques actuellement disponibles. Il semble donc indispensable de développer de nouvelles approches thérapeutiques et pour cela, un grand nombre de cibles est envisageable.¹⁰⁸ Parmi ces nombreuses cibles, plusieurs études ont mis en évidence l'intérêt des facteurs de croissance, et notamment de l'Insulin-like Growth Factor-1, ou IGF-1, dans le traitement de l'insuffisance cardiaque.^{52,148,158,167,207} Dans ce contexte, nous proposons d'étudier les effets d'une administration d'IGF-1 sur la cardiomyopathie dilatée du hamster CHF147.

D-L'Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1)

1) Généralités sur les IGF

Les Insulin-like Growth Factors, ou IGF, ont été découverts à la fin des années 1950, grâce à leur capacité à stimuler la sulfatation, c'est-à-dire l'incorporation de groupements sulfates, au niveau du cartilage, et ainsi à remplacer l'activité de facteur de sulfatation de l'hormone de croissance (GH, pour Growth Hormone). Au début des années 1970, le facteur de sulfatation, du fait de sa capacité pléiotrope, a été renommé somatomédine, signifiant "médiateur des effets de la somatotrophine" (somatotrophine étant l'ancien nom de la GH). La somatomédine a été incluse dans la classe des facteurs de croissance, contenant notamment le Platelet Derived Growth Factor (PDGF), le Fibroblast Growth Factor (FGF) ou encore l'Epidermal Growth Factor (EGF).¹⁰³

Au moment de la caractérisation des effets biologiques du facteur de sulfatation, des études parallèles ont essayé d'identifier les facteurs sériques qui pourraient stimuler des effets similaires à ceux de l'insuline. Ces facteurs étant connus pour être distincts de l'insuline, les tests biologiques permettant leur identification ont donc été basés sur leurs activités "insulin-like" ne pouvant pas être abolies par l'addition simultanée d'anticorps dirigés contre l'insuline. Pour cette raison, ils ont été appelés "non-suppressible insulin-like activity", ou NSILA.¹⁰³

En 1978, le groupe de Rinderknecht a séquencé l'isoforme 1 des NSILA sous sa forme protéique.¹⁶¹ Ils ont pu caractériser le NSILA-1 comme une simple chaîne polypeptidique de 70 résidus dont le poids moléculaire calculé est de 7 649 Da. De plus, ils ont montré que le NSILA-1 possède une homologie importante avec la pro-insuline humaine. En effet, la pro-insuline humaine est constituée de 51 acides aminés dont 25 sont identiques à ceux du NSILA-1, soit 48% d'homologie entre les deux protéines. L'équipe de Rinderknecht avait auparavant mis en évidence que les NSILA, isolés à partir de sérum humain, avaient des effets leur permettant de promouvoir la croissance *in vitro*. Après le séquençage du NSILA-1, la nomenclature a été modifiée et les NSILA ont été renommés IGF.¹⁶¹ En 1980, la purification de la forme C de la somatomédine et son séquençage ont montré que la somatomédine-C est identique à l'IGF-1.¹⁰³

L'IGF-1 peut mimer toutes les activités de la GH qui induisent la croissance. Il appartient à la famille des IGF, qui comprend deux isoformes, 1 et 2, elles-mêmes incluses dans la famille des protéines structurellement reliées à l'insuline, telles que la relaxine. La majorité de l'IGF-1 disponible dans l'organisme est sécrétée par le foie. Elle est circulante et agit de manière endocrine. Mais l'IGF-1 peut également être synthétisé directement par les tissus non-hépatiques et, dans ce cas, agir par l'intermédiaire de mécanismes autocrines ou paracrines.^{50,103} La transcription du gène de l'IGF-1, de même que sa traduction, et leurs régulations respectives sont très complexes, comme nous le verrons par la suite. La sécrétion

d'IGF-1 est, elle aussi, contrôlée, entre autre par la GH, mais également par d'autres hormones. De plus, la disponibilité de la protéine dans l'organisme est soumise à la fixation d'IGF-1 sur des protéines de liaison, les IGF Binding Proteins ou IGFBP. En effet, dans la circulation, la concentration d'IGF-1 libre est évaluée entre 1% et 5% de sa concentration totale.⁷³ Enfin, la liaison d'IGF-1 à son récepteur induit une cascade de signalisation mettant en jeu plusieurs voies moléculaires finement régulées, qui seront décrites dans cette partie. La régulation d'IGF-1 intervient donc à toutes les étapes entre la transcription du gène et l'activité biologique de la protéine.

2) IGF-1, du gène à la protéine

a. Structure du gène IGF-1 humain et sa transcription

Chez l'Homme, la structure du gène de l'IGF-1 a été décrite en 1986 par le groupe de Rotwein.¹⁶⁸ Le gène de l'IGF-1 est constitué de 5 exons et s'étend sur 45 kb au moins. La taille exacte du gène n'a pas pu être déterminée car l'extrémité 5' n'a pas été complètement cartographiée et une partie de l'intron situé entre les exons 2 et 3 n'a pas pu être clonée. Le premier exon contient une séquence codante de 63 nucléotides. Il est suivi par un intron d'environ 4,8 kb. L'exon 2 contient 157 nucléotides et code pour 52 acides aminés. Le 53^{ème} codon de l'exon 2, un résidu asparagine, est interrompu après la première base par un large intron de 21 kb et se termine dans l'exon 3. Celui-ci comprend 182 bases codant pour 60 acides aminés. L'exon 4, qui contient 515 bases, est localisé à 1,5 kb de l'extrémité 3' de l'exon 3. Il code pour 61 acides aminés qui sont suivis par un codon de terminaison TGA et de 329 bases non traduites. Enfin, l'exon 5 est à 17 kb de l'exon 3. Il contient 344 nucléotides codant pour 19 acides aminés suivis d'un codon de terminaison TGA et de 284 bases d'ADN non traduit.¹⁶⁸

Quatre ans plus tard, à partir de transcrits de foie humain, le groupe de Rotwein a identifié un nouvel exon dans le gène de l'IGF-1, localisé entre les exons 1 et 2 décrits précédemment.¹⁹⁴ Ce nouvel exon, de par sa localisation et sa séquence nucléotidique, est homologue à l'exon 1a du gène de l'IGF-1 de rat.¹⁹⁴ Au cours du "Second International Symposium on Insulin-like Growth Factors (IGFs)" à San Francisco en janvier 1991, la nomenclature a été modifiée et les exons du gène de l'IGF-1 ont été numérotés de 1 à 6, l'exon 1a devenant ainsi l'exon 2, l'ancien exon 2 devenant l'exon 3, et ainsi de suite jusqu'à l'exon 6.

Le gène de l'IGF-1 humain est transcrit en de multiples pré-ARNm dont les tailles varient entre 0,8 kb et 7,5 kb.¹¹⁷ En effet, il est constitué de deux exons leaders, les exons 1 et 2, qui contiennent plusieurs sites d'initiation de la transcription et qui sont contrôlés par deux régions promotrices distinctes.¹¹⁸ L'initiation de la transcription à partir de l'exon 1 se fait au niveau de deux sites majeurs et deux sites mineurs répartis sur une centaine de bases, alors que dans l'exon 2, l'initiation de la transcription a lieu à partir de plusieurs sites regroupés à

l'extrémité 3' de l'exon.^{2,118} L'existence de sites multiples d'initiation de la transcription du gène de l'IGF-1 entraîne la production de deux classes majeures de transcrits pré-ARNm codant pour la même protéine mature mais contenant des régions 5' non-traduite (ou UTR, pour UnTranslated Region) différentes. Les transcrits initiés à partir de l'exon 1 sont retrouvés dans tous les tissus alors que les transcrits initiés à partir de l'exon 2 ne sont retrouvés que dans le foie.^{2,117} Les derniers sont principalement régulés par la GH et pourraient coder pour la forme endocrine de l'IGF-1, alors que les premiers pourraient coder pour la forme autocrine/paracrine de l'IGF-1, étant donné qu'ils sont exprimés dans tous les tissus.¹¹⁷

Après la transcription, les différents pré-ARNm de l'IGF-1 humain peuvent subir un épissage alternatif au niveau de l'exon 5. Les ARNm ne contenant pas l'exon 5 sont majoritaires dans tous les tissus alors que ceux qui le contiennent sont retrouvés dans tous les tissus mais de manière plus abondante dans le foie.¹¹⁷ Enfin, l'exon 6 contient plusieurs sites de poly-adénylation permettant de générer des pré-ARNm ayant des régions 3'-UTR différentes.² L'utilisation des sites de poly-adénylation les plus éloignés de la fin de la phase ouverte de lecture entraînent la production des plus grands ARNm, qui représentent environ 30% des ARNm IGF-1 présents dans le foie et la majorité, voire la totalité, de ceux présents dans les tissus extra-hépatiques.²

Les structures du gène de l'IGF-1 et de ses transcrits chez l'Homme sont illustrées sur la figure suivante (Figure 19).

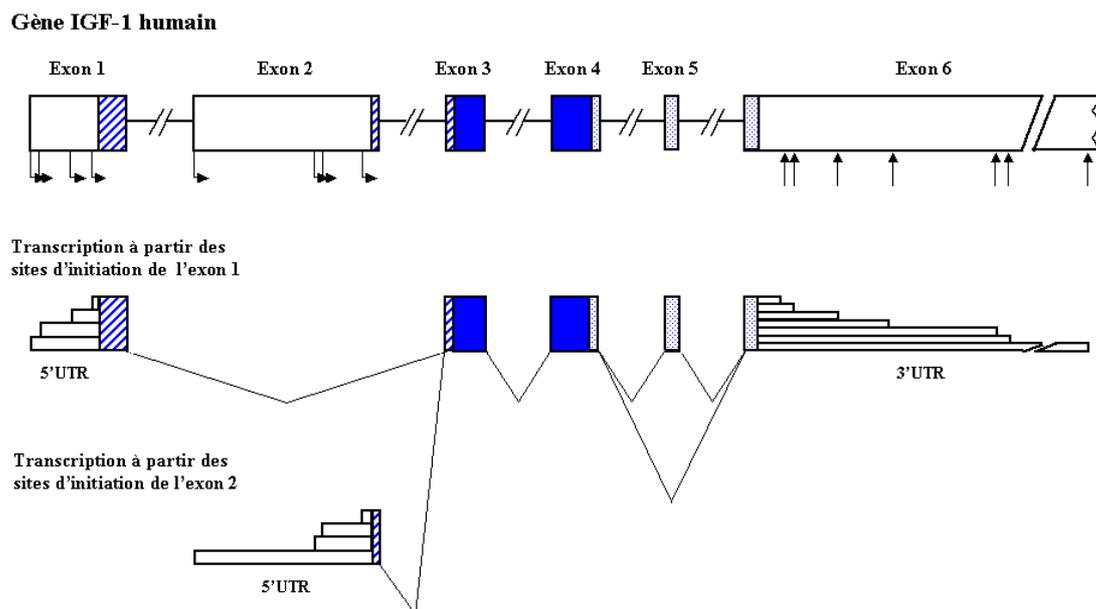


Figure 19. Organisation schématique du gène de l'IGF-1 humain et de ses différents transcrits. Les rectangles et les lignes représentent respectivement les exons et les introns. Les régions codant pour la protéine mature sont en bleu (exons 3 et 4). L'exon 5 peut être alternativement épissé. Les régions codant pour le peptide signal et pour le peptide E sont respectivement en bleu hachuré et en bleu pointillé. Les régions non codantes aux extrémités 5' et 3' du gène sont en blanc. Les différents sites d'initiation de la transcription (exons 1 et 2) et de polyadénylation (exon 6) sont respectivement représentés par des flèches à angles et des flèches verticales. Les introns et l'exon 6 ne sont pas à l'échelle. Modifié d'après LeRoith & Roberts, Ann. N. Y. Acad. Sci., 1993.

b. Traduction et maturation de la protéine IGF-1 humaine

Le gène de l'IGF-1 est donc régulé au cours de l'initiation de la transcription puis des étapes d'épissage alternatif et de poly-adénylation, permettant ainsi la production d'ARNm variés. Ces ARNm sont traduits à partir de deux codons d'initiation de la traduction, présents dans les exons 1 et 2. Les deux premiers exons du gène de l'IGF-1 contiennent chacun un codon d'initiation de la traduction AUG alternatif, en phase avec le cadre ouvert de lecture des exons 3 et 4. Les exons 1 et 2 codent également pour 21 et 5 acides aminés, respectivement, qui correspondent à des extrémités N-terminales différentes du peptide signal. L'exon 3 contient les codons de l'extrémité C-terminale commune du peptide signal de 27 acides aminés, ainsi que les 25 premiers acides aminés et la première base du 26^{ème} codon du domaine B de la protéine. Les deux dernières bases du codon 26 et les 3 derniers résidus du domaine B sont contenus dans l'exon 4, de même que les domaines C, A et D, longs de 12, 21 et 8 acides aminés respectivement. L'exon 4 comprend également 16 codons de l'extrémité N-terminale du peptide E. La partie centrale du domaine E est codée par la séquence de l'exon 5. Enfin, l'exon 6 contient les codons de l'extrémité C-terminale du peptide E et également une région 3'-UTR.^{118,168}

Le précurseur de la protéine IGF-1, la forme "pré-pro-IGF-1" possède un peptide signal à son extrémité N-terminale et un peptide E à son extrémité C-terminale. Sa partie centrale est constituée d'une chaîne A et d'une chaîne B, homologues à celles de l'insuline, qui sont connectées par une chaîne C de 12 acides aminés formant des ponts disulfures entre les domaines A et B.¹¹⁸ Lors de la maturation de la protéine, la forme "pré-pro-IGF-1" perd son peptide signal et devient "pro-IGF-1". Enfin, le peptide E est clivé au cours la dernière étape de maturation, permettant ainsi la production de la protéine mature qui comporte uniquement les domaines B, C, A et D.¹¹⁸

En plus du clivage du peptide E, la forme pro-IGF-1 subit une autre modification post-traductionnelle. Un triplet d'acides aminés, glycine-proline-glutamate, peut être clivé au niveau de l'extrémité N-terminale du domaine B. Ce clivage permet la production d'une protéine mature plus active que la protéine circulante. En effet, l'absence de ces trois résidus diminue l'affinité de l'IGF-1 pour les IGFBP et permet donc d'augmenter celle pour son récepteur. Cette forme clivée est retrouvée dans les tissus alors que la forme complète est circulante. La protéine tissulaire pourrait donc représenter la forme autocrine/paracrine de l'IGF-1 et la protéine circulante complète, la forme endocrine.¹¹⁷

Enfin, l'épissage alternatif subit par les pré-ARNm de l'IGF-1 humain au niveau de l'exon 5 entraîne la traduction de deux formes de peptides E : le peptide Ea est codé par les séquences des exons 4 et 6 et le peptide Eb est codé par les séquences des exons 4, 5 et 6. D'autre part, le peptide Eb semble être plus associé avec l'activité endocrine de l'IGF-1 que le peptide Ea. Toutefois, la corrélation entre les variations de l'extrémité N-terminale de la protéine et son activité est moins prononcée que celle qui existe entre les variations de l'extrémité 5' du gène et l'activité de la protéine.¹¹⁷ De plus, le peptide Ea contient deux sites

de glycosylation qui ne sont pas retrouvés dans la forme Eb. Cependant, la signification biologique de la présence ou de l'absence de ces sites de glycosylation n'est pas connue.¹¹⁷

La figure suivante représente la structure de la protéine IGF-1 humaine et les différentes étapes de sa maturation (Figure 20).

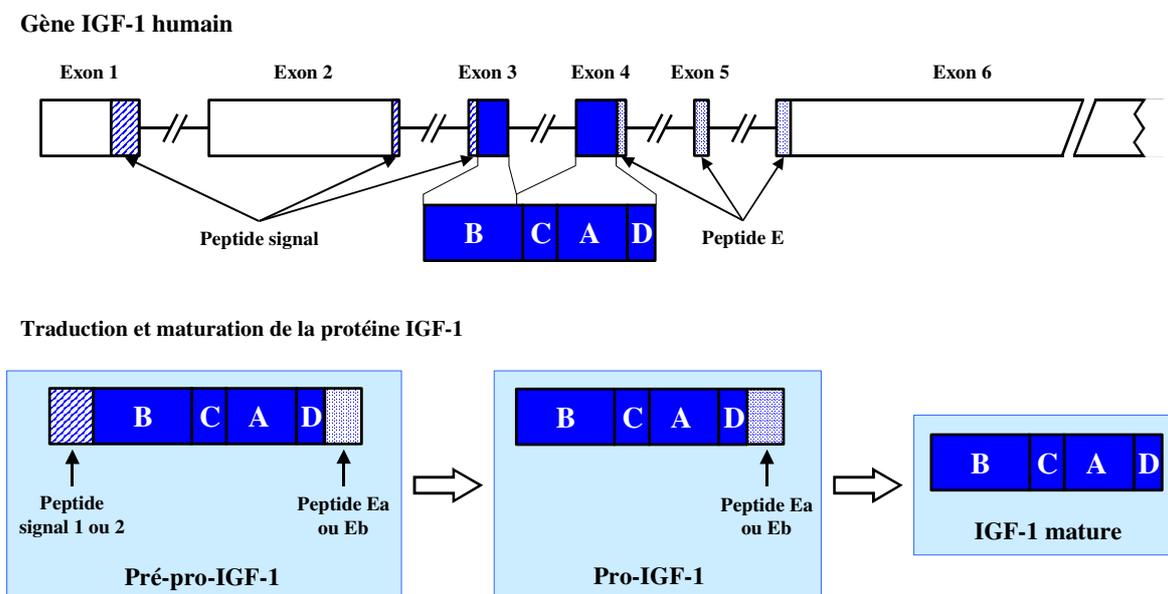


Figure 20. Représentation schématique de la protéine IGF-1 humaine et de sa maturation. La structure du gène est rappelée à titre indicatif (la nomenclature est la même que sur la figure précédente). Les quatre domaines de la protéine mature (B, C, A et D) sont codés par les exons 3 et 4. Le peptide signal, situé à l'extrémité N-terminale de la protéine, est codé par les exons 1, 2 et 3. Le peptide E, à l'extrémité C-terminale, est codé par les exons 4, 5 et/ou 6; le peptide Ea est codé par l'exon 6 et le peptide Eb, par les exons 5 et 6. Le gène de l'IGF-1 est transcrit puis traduit en une forme pré-pro-IGF-1 contenant le peptide signal, les quatre domaines de la protéine mature et le peptide E. L'étape suivante de la maturation de la protéine est la forme pro-IGF-1 qui est constituée des quatre domaines de la protéine mature et du peptide E. Enfin, le peptide E est clivé permettant ainsi d'obtenir la protéine mature qui est composée des domaines B, C, A et D. Modifié d'après LeRoith & Roberts, Mol. Cell. Endocrinol., 1991.

c. Régulation de la synthèse et de la disponibilité d'IGF-1

Les IGF ont longtemps été considérés comme agissant, tels des hormones, uniquement par l'intermédiaire de mécanismes endocrines, à distance de leur site de synthèse. Toutefois, en 1984, D'Ercole *et coll.* ont mis au point une méthode d'extraction et de mesure de l'IGF-1 tissulaire qui leur a permis de montrer que de nombreux tissus, tels que les reins, les poumons, le cœur ou encore le cerveau, sont capables de synthétiser de l'IGF-1, sous la dépendance de la GH.⁵⁰

Le foie est le site majeur de production d'IGF-1. En effet, il est très enrichi (entre 50 et 100 fois) en ARNm IGF-1 par rapport aux tissus non-hépatiques. Cet enrichissement ne permet pas de conclure sur l'importance de l'activité systémique de l'IGF-1 par rapport à son activité locale, mais reflète très probablement l'importance de la quantité d'IGF-1 à

synthétiser nécessaire pour obtenir une activité endocrine par rapport à celle nécessaire pour obtenir une activité autocrine/paracrine. La quantité circulante d'IGF-1, synthétisée et libérée par le foie, est sous la dépendance de la GH, mais également de l'insuline et de constituants métaboliques essentiels, tels que les acides aminés. L'activité biologique d'IGF-1 est donc régulée par le statut hormonal et nutritionnel et pas uniquement par les niveaux de GH.¹⁵³ Bien que la forme endocrine d'IGF-1 contribue majoritairement aux niveaux d'IGF-1 circulant, elle n'est pas cruciale pour la croissance postnatale, ce qui montre l'importance du rôle de la forme autocrine/paracrine d'IGF-1.⁶⁸ Dans les tissus extra-hépatiques, l'IGF-1 est synthétisé localement et agit de manière autocrine/paracrine.¹⁰³ Les niveaux d'IGF-1 tissulaire sont régulés par la GH, tout comme ceux d'IGF-1 circulant, mais peuvent également être contrôlés indépendamment de la GH, comme par exemple dans l'utérus où l'IGF-1 est synthétisé sous la dépendance des œstrogènes.^{103,153} La sécrétion locale d'IGF-1 est donc due à une régulation par des hormones anaboliques générales, comme la GH et l'insuline, mais également par des hormones tissulaires spécifiques.¹⁵³

La figure suivante schématise la régulation, par la GH, de la sécrétion de l'IGF-1 dans le foie et les tissus non-hépatiques, comme par exemple l'os et le muscle (Figure 21).¹¹⁹

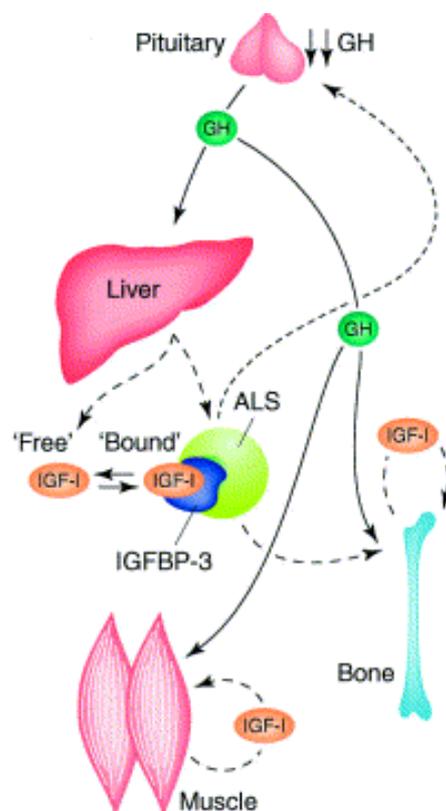


Figure 21. Régulation de la sécrétion d'IGF-1 par la GH. L'hypophyse (pituitary) sécrète de la GH qui agit sur le foie (liver) et les tissus extra-hépatiques, tels que le muscle ou l'os (bone). L'action de la GH sur le foie entraîne la production et la libération dans la circulation d'IGF-1 endocrine, d'IGFBP (principalement IGFBP3) et d'ALS. Le complexe IGF-1 - IGFBP - ALS, de même que la GH, agissent directement sur le squelette, permettant ainsi la sécrétion locale d'IGF-1. La sécrétion locale d'IGF-1 tissulaire est également régulée directement par la GH. Enfin, la sécrétion de GH par l'hypophyse est régulée de manière rétrograde par le niveau circulant d'IGF-1 complexé. D'après LeRoith *et coll.*, Trends in Endocrinology & Metabolism, 2001.

En plus de la régulation de sa sécrétion, l'IGF-1 est soumis à une régulation fine de son activité biologique par l'intermédiaire de sa fixation à des protéines de liaison spécifiques, les IGFBP. En effet, la quasi-totalité de l'IGF-1 présent dans la circulation et au niveau de l'espace extracellulaire se lie avec une forte affinité aux membres la famille des IGFBP. En tout, sept isoformes ont été identifiées, IGFBP1 à IGFBP7, chacune étant le produit d'un gène unique.^{103,141,158} Les IGFBP partagent une homologie importante au niveau de leurs séquences en acides aminés, bien que chacune possède des propriétés structurelles et biochimiques uniques. De plus, elles sont secrétées de manière tissu-spécifique mais également de manière spécifique à certains stades du développement, et sont présentes à différentes concentrations dans divers compartiments du corps humain. D'autre part, elles peuvent moduler l'activité biologique d'IGF-1 de façon positive ou négative et aussi exercer des effets indépendamment d'IGF-1.¹⁷⁵ La liaison d'IGF-1 aux IGFBP se fait avec une affinité au moins égale ou supérieure à celle de son récepteur R-IGF1.¹⁵⁸ Leurs fonctions principales sont notamment de servir de protéine de transport de l'IGF-1, de prolonger sa demi-vie, de permettre une localisation spécifique d'un tissu ou d'une cellule et enfin de moduler l'interaction d'IGF-1 avec son récepteur.¹⁰³ D'autre part, certaines IGFBP possèdent une activité propre qui est indépendant d'IGF-1. Par exemple, IGFBP3 pourrait empêcher la fixation d'IGF-1 sur son récepteur et ainsi inhiber la croissance cellulaire.¹⁵⁸

Dans la circulation sanguine, entre 75 et 95% de l'IGF-1 est lié à un complexe protéique de 150 kDa constitué d'IGFBP3 et d'une sous-unité labile, appelée ALS pour Acid-Labile Subunit.¹⁰³ L'IGFBP3 et l'ALS sont tous deux synthétisés par le foie et leurs concentrations sériques sont en grande partie régulées par le niveau de GH circulante.⁶⁸ Dans le plasma, les demi-vies d'IGF-1 et des IGFBP libres sont estimées à moins de 10 minutes et de 30 à 90 minutes, respectivement, alors que la formation du complexe de 150 kDa permet de prolonger la demi-vie d'IGF-1 jusqu'à 12 à 15 heures.¹⁰³

Parmi les différentes IGFBP, IGFBP5 est l'isoforme la plus conservée entre les espèces. Par exemple, il existe plus de 97% d'identité entre les séquences en acides aminés de l'Homme, de la souris et du rat. De même qu'IGFBP3, dans le sérum humain, IGFBP5 est capable de former un complexe ternaire de 130 kDa avec IGF-1 et l'ALS.¹⁷⁵ Elle est la principale IGFBP exprimée dans le muscle squelettique *in vivo*.⁶⁹ D'après les données disponibles dans la littérature, IGFBP5 pourrait jouer un rôle dans l'adaptation à long terme du muscle aux changements de charge. Il a également été montré qu'IGFBP5 agit comme un facteur de survie sur les myoblastes en différenciation.¹⁷⁵

3) Rôle d'IGF-1 dans le cœur

Il est connu depuis de nombreuses années que les IGF, et IGF-1 en particulier, font partie des facteurs de croissance essentiels pour la croissance et le développement.¹¹⁹ En plus de ses effets généraux, IGF-1 possède des effets spécifiques dans le cœur.¹⁵⁸ IGF-1 et son récepteur sont présents dans le myocarde fœtal et adulte.¹⁵⁸ Il a été montré que les niveaux

d'IGF-1 sont faibles pendant la vie fœtale puis commencent à augmenter peu de temps après la naissance et atteignent un maximum pendant l'adolescence.^{73,153} Dans le myocarde, l'expression d'IGF-1 est strictement parallèle au niveau de GH circulante.⁶⁸

In vitro, IGF-1 induit directement l'hypertrophie cardiaque, *via* l'activation de plusieurs voies de signalisation, dont celle de la PI3 kinase et des MAP kinases. Ceci permet de stimuler la transcription de gènes spécifiques du muscle et d'augmenter la synthèse protéique, ce qui conduit à une accumulation de myofibrilles et à l'augmentation de la masse et du volume des cardiomyocytes.^{68,73,158}

Chez l'Homme et l'animal, IGF-1 contribue à la croissance et à la régulation de la structure et de la fonction cardiaques.^{68,158} En effet, IGF-1 augmente la synthèse d'ADN et de protéines cardiaques, réduit la dégradation protéique et participe à la prolifération et à la maturation des cardiomyocytes néonataux.^{54,158} Il a été notamment montré qu'IGF-1 induit la synthèse de protéines contractiles telles que l'actine, la troponine I, la chaîne légère de la myosine squelettique (myosine 2), la chaîne lourde β de la myosine et l' α -actine squelettique dans les cardiomyocytes de rats nouveau-nés.⁶⁹ De plus, IGF-1 joue un rôle essentiel dans la réponse hypertrophique du myocarde.¹⁵⁸

En plus de son rôle critique dans la croissance du cœur, IGF-1 est aussi un acteur important de la fonction cardiaque. En effet, IGF-1 améliore la fonction myocardique chez les rats adultes normaux et après infarctus du myocarde, ainsi que chez les patients insuffisants cardiaques et les sujets sains.^{53,60,158} IGF-1 augmente la contractilité cardiaque grâce à sa capacité à augmenter la synthèse de protéines contractiles. Mais IGF-1 peut de plus agir sur le Ca^{2+} , soit en augmentant directement sa concentration intracellulaire soit en augmentant la sensibilité des cardiomyocytes au Ca^{2+} .¹⁵⁸ IGF-1 aussi est capable de réguler des canaux ioniques, tels que le canal calcique de type L ou encore le canal K^+ .^{104,158,189} Ceci permet donc de moduler l'excitabilité et la contraction cardiaques et d'augmenter les propriétés inotropes du cœur.

Un des effets d'IGF-1 est également de promouvoir la régénération des cellules myocardiques chez l'Homme. Jusque très récemment, il était communément admis que le myocarde est un organe post-mitotique qui est caractérisé par un nombre prédéterminé de myocytes, défini juste après la naissance et préservé au cours de la vie jusqu'à la mort. Mais des études ont montré l'existence de cellules souches cardiaques chez l'adulte, qui pourraient être une source de renouvellement myocardique, notamment dans le contexte de l'insuffisance cardiaque. Toutefois, leur origine exacte et leur proportion restent actuellement controversées. (voir la revue d'Opgaard & Wang¹⁴⁸)

Par ailleurs, IGF-1 joue un rôle important dans la régulation de la survie cellulaire et la prévention de l'apoptose, notamment dans les cardiomyocytes.^{68,148,158,204} L'apoptose, qui est le processus de mort cellulaire programmée, contribue au développement de l'insuffisance cardiaque lorsqu'elle a lieu dans les cardiomyocytes.¹⁵⁸ Le rôle anti-apoptotique d'IGF-1 passe principalement par l'activation concomitante de la voie des Mitogen Activated Protein (MAP) kinases, qui sont également appelées Extracellular signal-Regulated Kinases (ERK), et

de la voie de la Phosphatidyl Inositol-3 (PI3) kinase.²⁰⁷ L'activation de la voie PI3 kinase active Akt qui inhibe des facteurs de transcription pro-apoptotiques, comme Bad, et augmente des facteurs de transcription anti-apoptotiques, tels que Bcl-2, Bcl-x ou encore NF- κ B.^{125,204} Akt pourrait également réduire, de manière indirecte, l'activité de p53, une molécule clé de l'apoptose.²⁰⁴ Il est intéressant de noter que l'action anti-apoptotique d'IGF-1 peut être observée à des concentrations physiologiques, ce qui n'est pas le cas pour d'autres facteurs de croissance qui sont incapables d'empêcher l'apoptose des cardiomyocytes, même à des doses pharmacologiques.¹⁴⁸

Pour finir, IGF-1 agit sur les cellules non-cardiaques retrouvées dans le cœur, telles que les fibroblastes ou les cellules endothéliales. En effet, ces cellules expriment également de l'IGF-1 au niveau local, et sont impliquées dans le remodelage myocardique qui a lieu au cours du développement ou dans des conditions pathologiques.¹⁵⁸

La figure suivante résume les effets d'IGF-1 sur la croissance et le remodelage du myocarde (Figure 22).¹⁵⁸

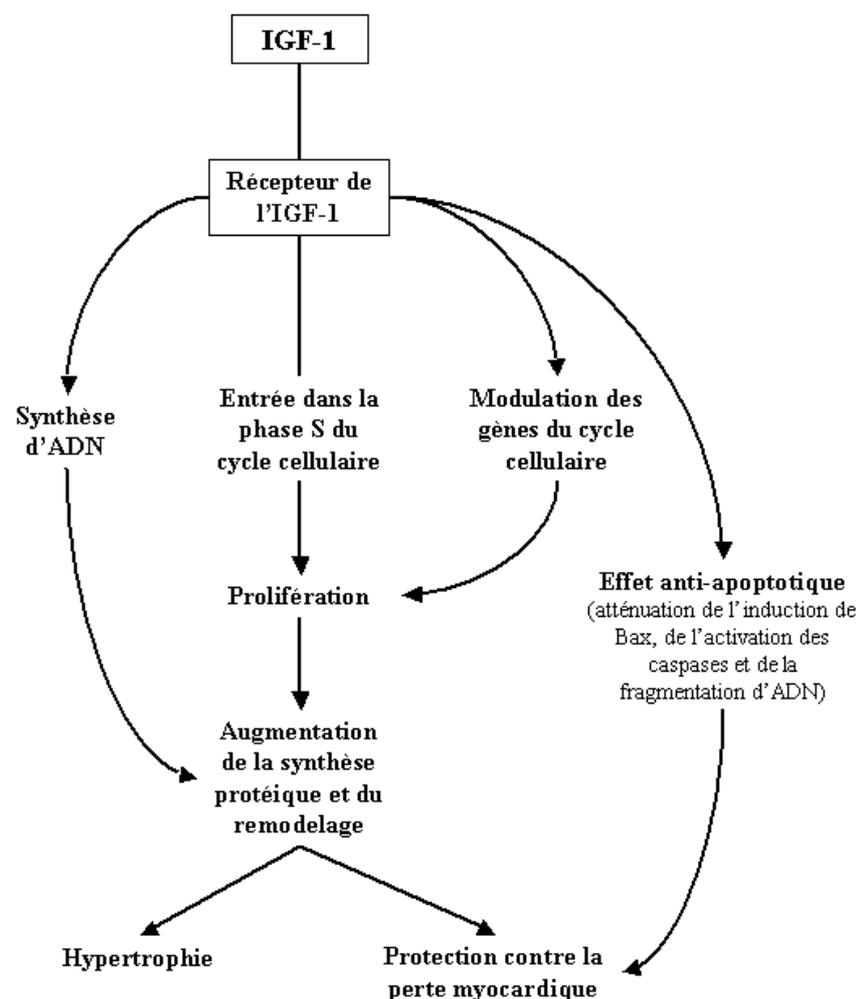


Figure 22. Rôle d'IGF-1 dans la croissance et le remodelage myocardiques. D'après Ren *et coll.*, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1999.

4) Hypertrophie physiologique et pathologique

Un des rôles majeurs d'IGF-1 *in vivo* au niveau du cœur est d'induire une hypertrophie. Or, il existe deux types d'hypertrophies cardiaques, qui sont l'hypertrophie physiologique et la maladie hypertrophique, bien que, par abus de langage, dans la littérature, le terme "hypertrophie cardiaque" se réfère dans la plupart des cas à l'hypertrophie pathologique. Une revue récente publiée par McMullen & Jennings décrit les différences entre l'hypertrophie cardiaque physiologique et pathologique.¹³⁰

Chez l'adulte, la croissance du cœur est habituellement étroitement liée à sa capacité fonctionnelle, et toute modification de cette capacité fonctionnelle est contrebalancée par une réponse hypertrophique, soit de type physiologique, soit de type pathologique, permettant de diminuer les contraintes sur les parois cardiaques. Ces deux formes d'hypertrophies sont causées par des stimuli différents, sont fonctionnellement distinctes et sont associées à des phénotypes structurels et moléculaires indépendants.

L'hypertrophie pathologique est associée à la présence de fibrose cardiaque, à une altération fonctionnelle et à une augmentation de la morbidité et de la mortalité. Elle peut être due à divers stimuli, comme par exemple l'hypertension, le rétrécissement valvulaire aortique ou encore des mutations génétiques. Au niveau fonctionnel, elle évolue d'une phase compensée vers une phase décompensée, pour aboutir à l'insuffisance cardiaque. Au niveau structurel, les fibroblastes cardiaques et les protéines de la matrice extracellulaire s'accumulent de manière excessive. D'un point de vue moléculaire, l'hypertrophie pathologique est souvent associée à la surexpression de gènes fœtaux et peut être accompagnée par une diminution d'expression de gènes normalement exprimés à des niveaux plus importants chez l'adulte que chez l'embryon. La voie de signalisation impliquée dans l'induction et la régulation de l'hypertrophie pathologique est celle de la protéine G_{α_q} , qui est une sous-unité des protéines G_q , elles-mêmes appartenant à la famille des protéines G.

L'hypertrophie physiologique est, quant à elle, caractérisée par une organisation normale de la structure du myocarde et par une fonction cardiaque normale ou augmentée. Elle a lieu en réponse à la pratique d'une activité physique régulière et n'aboutit pas à un stade d'insuffisance cardiaque. Dans le contexte de l'hypertrophie physiologique, les cardiomyocytes sont entourés par un fin réseau de fibres de collagène qui leur procure une armature. Au niveau moléculaire, à l'inverse de ce qui est observé dans l'hypertrophie pathologique, les gènes fœtaux ne sont pas réexprimés. L'hypertrophie physiologique est régulée par la voie de signalisation IGF-1/PI3 kinase

5) Voies de signalisation moléculaire stimulées par IGF-1

Le récepteur d'IGF-1, R-IGF1, est un membre de la famille des récepteurs de facteur de croissance à activité tyrosine kinase, qui deviennent activés lors de la fixation de leur ligand. La fixation du ligand sur son récepteur entraîne un changement de conformation

conduisant à l'autophosphorylation de plusieurs résidus tyrosine essentiels servant de sites de recrutement pour des protéines cytoplasmiques spécifiques contenant des domaines SH2.⁶⁹

Cependant, à l'inverse des autres récepteurs à activité tyrosine kinase, R-IGF1 interagit avec un intermédiaire de 185 kDa qui sert de médiateur entre le récepteur et les molécules de signalisation cytoplasmiques.⁶⁹ Cet intermédiaire est le substrat du récepteur de l'insuline, IRS-1 (pour Insulin Receptor Substrate-1), et possède des sites de reconnaissance pour des protéines à domaine SH2. L'autophosphorylation de R-IGF1 induit la phosphorylation d'IRS-1, lui permettant ainsi de fixer au moins deux protéines à domaine SH2, dont les plus importantes sont Grb2 et la sous-unité régulatrice p85 de la PI3 kinase. La fixation de ces deux protéines sur IRS-1 est le point de départ de deux cascades de signalisation principales, qui sont, d'une part la voie des "Extracellular signal-Related Kinases", ERK1 et ERK2, encore appelées MAP kinases, et d'autre part la voie de la PI3 kinase. L'activation de la première voie de signalisation permet la croissance, la prolifération et la survie cellulaires alors que l'activation de la seconde voie est responsable du métabolisme cellulaire, de la croissance et de la réponse anti-apoptotique.^{77,148} Dans le muscle cardiaque, les deux voies, MAP kinases et PI3 kinase, sont activées par IGF-1.¹⁴⁸

a. R-IGF1, le récepteur de l'IGF-1

Le récepteur de l'IGF-1, R-IGF1, aussi connu sous le nom de récepteur d'IGF de type 1, possède une forte homologie avec le récepteur de l'insuline. Il a pour rôle de transmettre les effets de l'IGF-1. Le récepteur est formé par l'assemblage de deux structures identiques, chacune étant constituée de deux sous-unités, α et β , issues du clivage d'une simple chaîne polypeptidique, et reliées entre elles par des ponts disulfures (Figure 23).

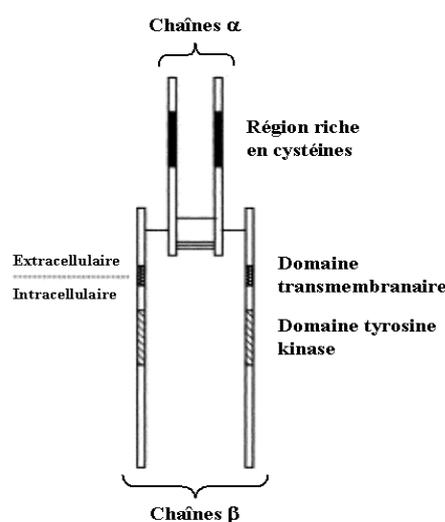


Figure 23. Structure du récepteur de l'IGF-1, R-IGF1. Il est constitué de deux chaînes α et deux chaînes β reliées entre elles par des ponts disulfures. Les régions riches en cystéines des chaînes α lui confèrent sa spécificité de liaison à son ligand et les domaines tyrosines kinases des chaînes β contiennent des sites d'autophosphorylation essentiels pour l'activation des voies de signalisation d'IGF-1. Modifié d'après Vincent & Feldman, Growth Horm. IGF Res., 2002.

La sous-unité α est extracellulaire et possède des régions riches en cystéines qui lui confèrent sa spécificité de liaison à l'IGF-1. La sous-unité β est transmembranaire et contient la région responsable de l'activité tyrosine kinase de R-IGF1 sur son domaine cytoplasmique. Les deux sous-unités α , par l'intermédiaire de ponts disulfures, permettent la formation du récepteur mature $\alpha_2\beta_2$.¹⁰³ Bien qu'il existe des similarités structurales importantes entre l'insuline et les IGF, et également entre leurs récepteurs respectifs, les récepteurs fixent spécifiquement leur ligand. Par exemple, R-IGF1 lie l'IGF-1 avec une très forte affinité, mais peut aussi fixer l'IGF-2 et l'insuline avec des affinités moindres, qui sont respectivement 2 à 15 fois et 100 à 1000 fois plus faibles.¹⁰³

Le domaine catalytique tyrosine kinase de la sous-unité β , de même que les résidus tyrosines qui sont les cibles de la kinase, sont hautement conservés. L'activité tyrosine kinase de R-IGF1 permet de transférer un groupement phosphate de l'ATP sur un résidu tyrosine du récepteur, et ainsi d'initier la cascade de signalisation d'IGF-1. La liaison d'IGF-1 sur son récepteur entraîne la phosphorylation *in vivo* des résidus tyrosine et sérine situés dans le domaine cytoplasmique de R-IGF1. L'autophosphorylation sur les résidus tyrosine est une trans-réaction intramoléculaire, ainsi la partie tyrosine kinase d'une sous-unité β phosphoryle les résidus de l'autre sous-unité β du récepteur. La sous-unité tyrosine kinase β de R-IGF1 est requise pour la signalisation. En effet, la propagation du signal dans le cytoplasme a lieu suite à l'autophosphorylation du récepteur.¹⁰³

b. Voie de signalisation des MAP kinases

La voie de signalisation des MAP kinases (MAPK) est activée en réponse à l'IGF-1 dans un grand nombre de tissus, et pas seulement dans les muscles. Bien que son rôle dans l'hypertrophie ne soit pas totalement élucidé, cette voie semble activée, indépendamment d'IGF-1, dans des conditions de stress résultantes d'une hypertrophie cardiaque pathologique.^{56,77} En effet, les MAPK sont notamment des effecteurs de la protéine G_q , dont la voie de signalisation a été impliquée dans l'induction et la régulation de l'hypertrophie pathologique.¹³⁰

Cette voie de signalisation consiste en une séquence d'activations successives de protéines kinases qui résulte en une phosphorylation et une activation des ERK. L'activation de ces kinases permet de phosphoryler de nombreuses cibles intracellulaires, dont des facteurs de transcription qui permettent de reprogrammer l'expression de gènes cardiaques.⁸⁵

La figure suivante schématise la voie de signalisation des MAP kinases activée dans l'hypertrophie (Figure 24).

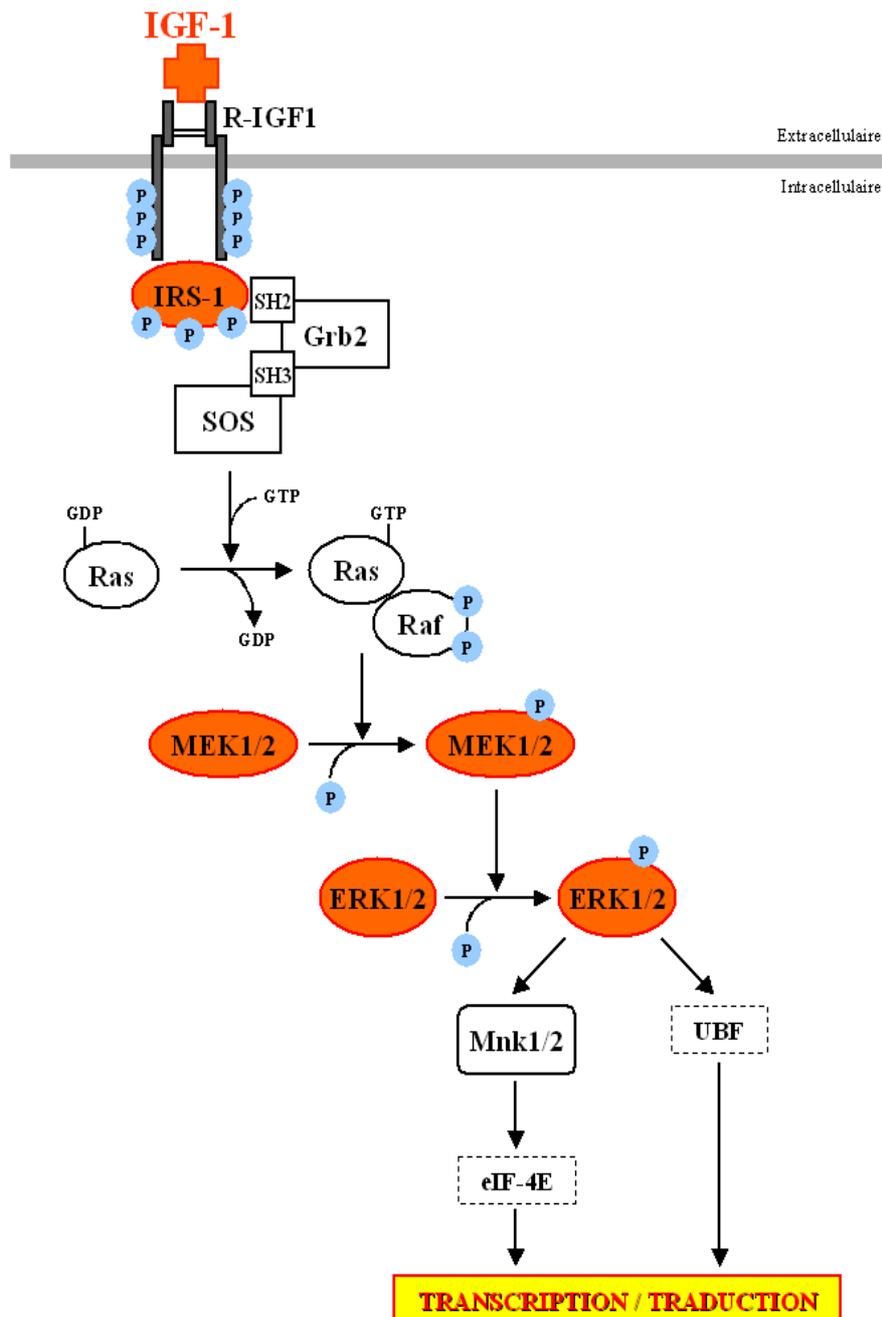


Figure 24. Voie de signalisation des MAP kinases. Le déroulement de la voie de signalisation induite après fixation d'IGF-1 sur son récepteur, ainsi que les abréviations sont explicités dans le texte. Les éléments clés de la voie sont indiqués en orange et les sites phopshorylés en bleu. Adapté d'après Glass, Trends Mol. Med., 2003.

La phosphorylation d'IRS-1 permet de fixer Grb2 par l'intermédiaire de son domaine SH2. De plus, grâce à son domaine SH3, Grb2 lie également SOS (Son Of Sevenless), un facteur qui transforme le guanosine diphosphate (GDP) en guanosine triphosphate (GTP). Ceci entraîne la formation d'un complexe IRS-1-Grb2-SOS et l'activation de SOS.¹⁰³ La forme activée de SOS induit ensuite l'activation de Ras, une protéine de liaison au GTP. Comme toutes les GTPases, Ras est sous sa forme inactive lorsqu'elle est liée au GDP et sous sa forme active lorsqu'elle est liée au GTP. SOS permet de cliver la liaison entre le GDP et Ras, conduisant à l'activation de ce dernier.

La forme activée de Ras, Ras·GTP, se fixe ensuite sur Raf, permettant ainsi d'activer ce dernier. Dans le cytosol, Raf est à l'état inactif et est lié à un complexe protéique contenant notamment la protéine 14-3-3 ζ . Cette conformation inactive est stabilisée par la liaison d'un dimère 14-3-3 ζ au niveau de deux résidus phosphorylés de Raf, P-Ser259 et P-Ser621. La présence de Ras·GTP permet sa liaison avec une très forte affinité au niveau de deux sites spécifiques sur Raf, déplaçant le dimère 14-3-3 ζ de la P-Ser259 sur un autre site phosphorylé de liaison de Raf. La liaison du dimère 14-3-3 ζ sur ce nouveau site et sur P-Ser621 permet de stabiliser Raf dans une conformation ouverte active et ainsi de se libérer de Ras·GTP en conservant un état actif. Raf est désactivé par déphosphorylation grâce à l'action d'une sérine/thréonine phosphatase.¹⁴

L'activité protéine kinase de Raf, un membre de la super famille des MAPK kinases (MAPKKK), permet de phosphoryler les MEK. Ces dernières, qui appartiennent à la famille des MAPK kinases (MAPKK), sont retrouvées sous deux isoformes, MEK1 et MEK2. Les formes actives phosphorylées des MEK activent les ERK par phosphorylation, celles-ci existant sous deux isoformes chez les mammifères, ERK1 et ERK2, aussi appelées p44 et p42 MAPK, respectivement.¹⁵⁶

La voie de signalisation conduit ensuite à l'activation de Mnk 1 et 2, qui sont des "MAP kinase-signal integrating kinases" et dont le substrat le plus connu est le facteur d'initiation de la traduction eIF-4E (eIF, pour "eukaryote Initiation Factor"), également appelée protéine de liaison de la coiffe des ARNm (mRNA cap-binding protein). La phosphorylation d'eIF-4E module sa capacité à se fixer aux ARNm coiffés et pourrait soit augmenter cette affinité, soit la diminuer. Le rôle des ERK dans le contrôle de la synthèse protéique reste donc à approfondir. Enfin, les ERK permettent également l'activation du facteur UBF (Upstream Binding Factor) qui joue un rôle dans la transcription des gènes des ARN ribosomiaux.¹⁵⁶

L'activation de cette voie de signalisation est suffisante pour déclencher l'hypertrophie *in vivo* mais ne semble pas impliquée dans l'hypertrophie physiologique.¹⁵⁶

c. Voie de signalisation de la PI3 kinase

De même que la voie des MAPK, la voie de la PI3 kinase (PI3K) est une voie de signalisation ubiquitaire activée par la fixation d'IGF-1 sur son récepteur.

La voie de la PI3K est une voie de signalisation critique dans l'induction de l'hypertrophie physiologique, par opposition à l'hypertrophie pathologique.^{19,56} L'hypertrophie physiologique est une caractéristique de la croissance postnatale cardiaque normale alors que l'hypertrophie pathologique se développe en réponse à une surcharge hémodynamique. L'activité de la PI3K est nécessaire et suffisante pour permettre à IGF-1 d'induire l'hypertrophie.⁷⁷

La voie de signalisation de la PI3K dans l'hypertrophie est représentée sur la figure ci-dessous (Figure 25).

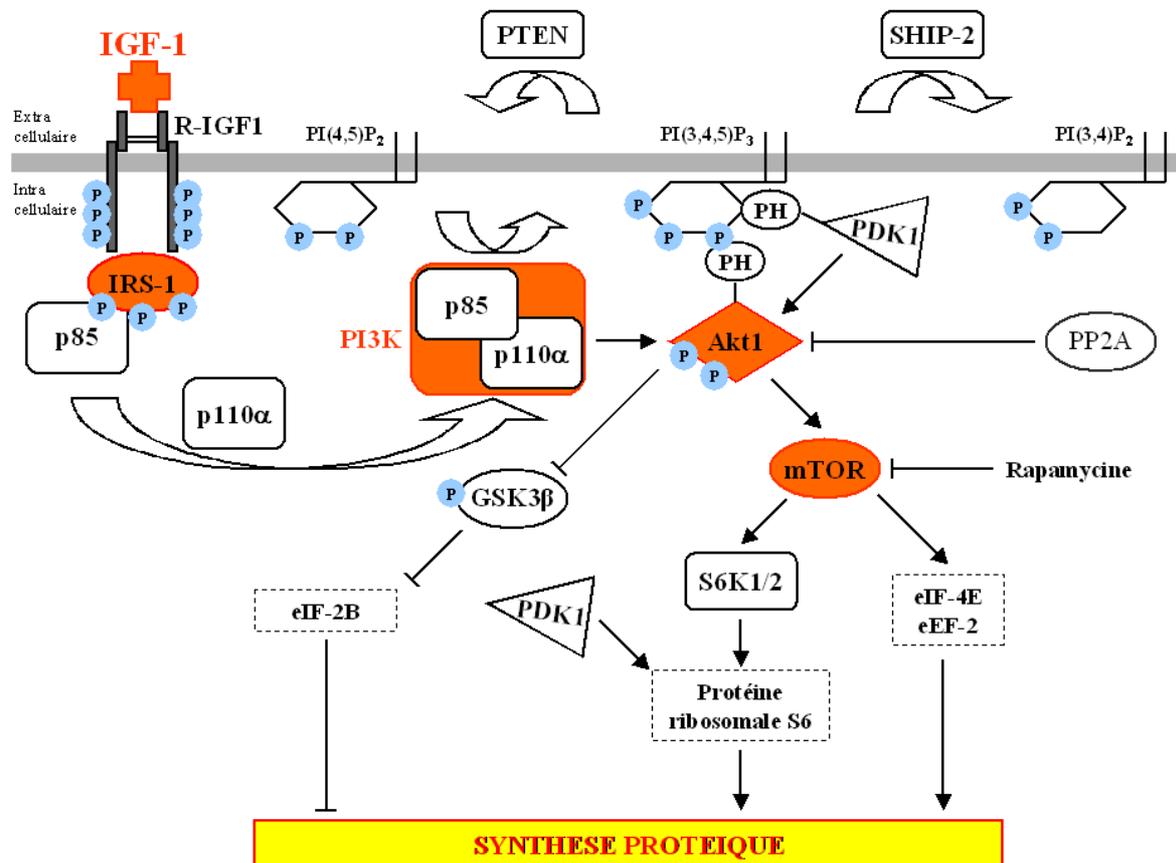


Figure 25. Voie de signalisation de la PI3 kinase. Le déroulement de la voie de signalisation induite après fixation d'IGF-1 sur son récepteur, ainsi que les abréviations, sont explicités dans le texte. Les éléments clés de la voie sont indiqués en orange et les sites phosphorylés en bleu. Adapté d'après Glass, Trends Mol. Med., 2003.

La fixation de la sous-unité p85 de la PI3K à IRS-1 après fixation d'IGF-1 sur son récepteur permet le recrutement à la surface interne de la membrane plasmique de la sous-unité p110 et ainsi l'activation de la PI3K α . La PI3K α , appartenant à la classe 1A de PI3K, est un hétérodimère constitué d'une sous-unité régulatrice p85 de 85 kDa, et d'une sous-unité catalytique p110 (α , β ou δ) de 110 kDa.⁸⁵ Une fois localisée à la membrane, la PI3K α phosphoryle le phospholipide membranaire phosphatidyl-inositol (4,5)-bisphosphate (PI(4,5)P₂) en position 3 pour produire le phosphatidyl-inositol (3,4,5)-trisphosphate (PI(3,4,5)P₃).^{56,77} L'hypertrophie physiologique est activée par la sous-unité p110 α de la PI3K tandis que l'hypertrophie pathologique est activée par la sous-unité p110 γ de classe 1B.⁸⁵

Deux kinases peuvent se fixer au PI(3,4,5)P₃ par l'intermédiaire de leurs domaines PH : Akt, une sérine-thréonine kinase aussi connue sous le nom de PKB, et la "3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1", ou PDK1, qui est l'activateur d'Akt.^{77,85} Il existe trois isoformes d'Akt, Akt1 (ou PKB α), Akt2 (ou PKB β) et Akt3 (ou PKB γ), qui possèdent plus de 80% d'identité au niveau de leurs séquences.¹⁰ Parmi ces trois isoformes,

seules Akt1 et Akt2 sont fortement exprimées dans le cœur, et Akt1 joue un rôle prédominant dans la croissance normale du cœur par rapport à Akt2.^{56,85} La co-localisation d'Akt1 et de PDK1 au niveau de la membrane entraîne la phosphorylation et l'activation d'Akt1 par PDK1.^{56,77,85} PDK1 est indispensable à l'activation d'Akt1 dans les cardiomyocytes et deux sites de phosphorylation sur Akt1 sont critiques pour son activité, la thréonine 308 au niveau de son domaine catalytique et la sérine 473 dans la région C-terminale.^{10,33} L'activité d'Akt1 peut donc être modulée soit en contrôlant directement son état de phosphorylation, soit en modifiant le niveau de PI(3,4,5)P₃.⁷⁷ Akt1 peut être déphosphorylé par la protéine phosphatase 2A (PP2A). Le PI(3,4,5)P₃ peut être déphosphorylé par deux phosphatases, la "SH2-domain-containing inositol phosphate" (SHIP) et la "phosphatase and tensin homologous on chromosome 10" (PTEN). SHIP possède deux formes, SHIP1 et SHIP2, qui déphosphorylent le PI(3,4,5)P₃ en phosphatidyl-inositol (3,4)-bisphosphate (PI(3,4)P₂). SHIP2 est l'isoforme exprimée dans le muscle. PTEN est un régulateur négatif de la PI3K α et déphosphoryle le PI(3,4,5)P₃ en PI(4,5)P₂.^{56,77} L'activation d'Akt1 par l'IGF-1 au niveau de la membrane plasmique est suivie par la translocation d'Akt1 dans le noyau.¹⁰

Akt1 est le point d'embranchement de deux cascades de signalisation, la première conduisant à la "glycogen synthase kinase-3 β " (GSK-3 β) et la seconde conduisant à la cible mammifère de la rapamycine, mTOR (mammalian target of rapamycin), qui sont toutes deux des régulateurs de la machinerie de synthèse protéique.⁵⁶ GSK-3 β et mTOR sont impliqués dans la modulation de l'hypertrophie.

La GSK-3 β , qui est normalement active, voit son activité inhibée par la phosphorylation d'Akt1 et régule négativement la plupart de ses substrats.⁵⁶ Par exemple, elle inhibe des facteurs de transcription directement impliqués dans la croissance cardiaque, tels que c-Myc, GATA4, NFAT et la β -caténine. GATA4 est un facteur de transcription qui régule l'expression de gènes hypertrophiques et la β -caténine est une protéine de structure du cytoplasme qui peut se transloquer dans le noyau et induire l'expression de gènes grâce à sa fixation sur des facteurs de transcription.⁸⁵ GSK-3 β phosphoryle et inhibe également le facteur d'initiation de la traduction eIF-2B.^{56,85,156}

Akt1 peut également augmenter la synthèse protéique en phosphorylant mTOR, une sérine/thréonine kinase.^{77,85} Lorsqu'il est inhibé par la rapamycine, mTOR atténue l'hypertrophie cardiaque pathologique et rétablit la fonction myocardique. La régulation de la synthèse protéique par mTOR a lieu grâce à deux voies de signalisation. En effet, mTOR active la p70/85 S6 kinase-1 (S6K1) et la p54/56 S6 kinase-2 (S6K2) qui elles-mêmes augmentent la synthèse ribosomale et la traduction protéique en phosphorylant la protéine ribosomale S6. La protéine S6 peut également être activée par PDK1.²⁰⁶ Mais la S6K1 et la S6K2 ne sont pas nécessaires pour induire l'hypertrophie, qu'elle soit physiologique ou pathologique.^{77,85} Il existe donc d'autres cibles de mTOR qui ne font pas partie de la voie de synthèse ribosomale mais qui sont des facteurs régulant l'activation de la machinerie de traduction. Ces cibles sont le facteur d'initiation de la traduction eIF-4E et le facteur d'élongation eEF-2 (eEF, pour "eukaryote Elongation Factor"). Les facteurs eIF-4E et eEF-2

sont respectivement réprimés par les protéines de liaison 4E-BP1/2 et la protéine kinase eEF-2. Les 4E-BP se fixent au facteur eIF-4E, l'empêchant ainsi de se lier aux autres facteurs d'initiation de la traduction et la phosphorylation de eEF-2 induit son inactivation en réprimant sa fixation au ribosome. mTOR libère eIF-4E et prévient la phosphorylation de eEF-2 permettant ainsi à la traduction d'avoir lieu.^{56,156}

En plus de son rôle dans l'induction de l'hypertrophie, la surexpression d'Akt a un effet sur la contractilité myocardique *in vitro* et *in vivo*, dont le mécanisme exact n'a pas encore été élucidé mais qui passerait probablement par l'intermédiaire de SERCA2a.³³

d. Régulation croisée des voies des MAPK et de la PI3K

Les deux voies principales de signalisation induites dans l'hypertrophie après fixation d'IGF-1 sur son récepteur, à savoir la voie des MAPK et celle de la PI3K, précédemment décrites, ne sont pas indépendantes. En effet, plusieurs études semblent indiquer que la voie des MAPK serait inactivée dans le cas de l'hypertrophie physiologique, alors que la voie PI3K serait activée, et inversement dans le cas de l'hypertrophie pathologique. Il existerait donc une régulation croisée de ces deux voies.

En 1999, il a effectivement été montré par Rommel *et coll.*, notamment dans des myoblastes en culture, que l'activation de ces deux voies induit des effets opposés sur l'hypertrophie des myotubes. La voie des MAPK inhibe le développement du phénotype hypertrophique alors que la voie de la PI3K le favorise. Ce travail a également mis en évidence l'existence d'une régulation croisée des deux cascades de signalisation, l'activation de la voie PI3K inhibant celle des MAPK, qui est spécifique des cellules musculaires différenciées. La forme activée d'Akt s'associe en un complexe Raf – Akt, lui permettant d'inhiber la phosphorylation de Raf au niveau de la sérine 338 et ainsi de diminuer son activation.¹⁶⁶ La phosphorylation de la sérine 338 sur Raf est un obstacle au repliement de Raf sur lui-même dans une conformation inactive, limitant ainsi son auto-inhibition.¹⁴

En 2002, un travail de Moelling *et coll.* a d'autre part révélé qu'Akt peut directement phosphoryler Raf au niveau de la sérine 259, ce qui résulte en une diminution de l'activité de Raf.¹⁴⁰ En effet, la phosphorylation de Ser259 permet la fixation du dimère 14-3-3ζ sur Raf, ce qui conserve Raf dans son état inactif.¹⁴

Bien que le mécanisme précis de régulation croisée des voies des MAPK et de la PI3K, respectivement au niveau de Raf et Akt, ne soit pas totalement élucidé, il permet d'expliquer la concomitance de l'activation de la voie PI3K et de l'inhibition de la voie MAPK observée dans l'hypertrophie physiologique.

PROBLEMATIQUE DE LA THESE

Le but de ce travail de thèse a été de développer une nouvelle approche thérapeutique de la cardiomyopathie dilatée, dans le contexte des dystrophies musculaires, basé sur la délivrance d'IGF-1. L'hypothèse de départ est que l'induction d'un phénomène compensateur devrait être capable de stabiliser la dilatation des ventricules et ainsi, de ralentir l'évolution de la cardiomyopathie dilatée et d'améliorer le pronostic vital. L'effet compensateur est induit par l'administration d'IGF-1. Le développement de cette nouvelle approche thérapeutique *in vivo* est réalisé dans un modèle animal de cardiomyopathie héréditaire, le hamster de la lignée CHF147.

Deux approches thérapeutiques ont été testées. La première est basée sur la délivrance systémique de la protéine recombinante, rhIGF-1. Les effets de l'administration de rhIGF-1 à court terme et à long terme ont été évalués, et les voies de signalisation moléculaires permettant d'induire les effets bénéfiques observés ont été étudiées. La seconde approche a consisté à tester les effets à court terme d'une administration directe dans le cœur d'un plasmide codant pour le gène de l'IGF-1.

MATERIELS ET METHODES

A- Animaux

1) Modèles animaux

Les hamsters Syrien sains (lignée Rj:AURA) ont été achetés au centre d'élevage René Janvier (France).

La colonie de hamsters CHF147 est maintenue à l'Institut de Myologie à partir de couples fondateurs fournis par le centre d'élevage canadien, Canadian Hybrid Farms. Les animaux sont hébergés dans des cages, situées à l'intérieur d'enceintes ventilées, à une température de 20°C avec des cycles jour-nuit de 10h-14h et disposent de nourriture et de boisson à volonté.

Des hamsters mâles Syrien, sains et CHF147, âgés de 6 à 8 mois, ont été utilisés au cours des différents protocoles expérimentaux. Des hamsters sains et CHF147 non-traités ont servi à établir les groupes de référence.

2) Génotypage des hamsters par PCR

Le génotypage des hamsters CHF147 est réalisé par PCR sur l'ADN génomique (ADNg) extrait à partir d'un fragment de peau d'oreille. Pour chaque hamster à génotyper un fragment tissulaire est prélevé puis digéré pendant la nuit dans un bain-marie à 55°C dans 500 µL de solution de digestion (100 mM Tris-HCl, pH 8,5 + 5 mM EDTA + 0,2% SDS + 200 mM NaCl + 0,1 mg/mL protéinase K).

Les suspensions tissulaires lysées sont centrifugées pendant 10 min à 14 000 rotations par minute (rpm) puis l'ADNg contenu dans le surnageant est précipité par ajout de 500 µL d'isopropanol. La solution d'ADNg est centrifugée pendant 5 min à 14 000 rpm pour former un culot qui est lavé par centrifugations successives pendant 5 min à 14 000 rpm dans 500 µL d'éthanol 70% à -20°C puis d'éthanol 100%. Les culots d'ADNg sont séchés, tubes ouverts, par chauffage à sec à 37°C et sont resuspendus dans 50 µL d'eau stérile pendant la nuit à 4°C. La densité optique (DO) est mesurée par spectrophotométrie sur une solution d'ADNg diluée au 1/100. Les rapports DO_{260nm}/DO_{280nm} sont de l'ordre de 1,4 – 1,6 et les concentrations d'ADNg finales sont d'environ 1 µg/µL.

La PCR de génotypage est réalisée avec 2 couples d'oligonucléotides différents afin de détecter les trois génotypes possibles : homozygote sauvage, homozygote pour la délétion en δ -sarcoglycane et hétérozygote. Des ADNg de hamsters homozygotes sauvages et

hétérozygotes sont utilisés comme contrôles de PCR. Les oligonucléotides utilisés sont ceux dont la séquence a été publiée par Sakamoto *et coll.*¹⁷² Le couple d'oligonucléotides tttcctctgagaagtgtgcc (5bp-F2)/ctcaaatgagctagtgccagg (3bp-R2) permet d'obtenir un produit de PCR de 361 pb chez les individus porteurs d'un allèle délété. En effet, les oligonucléotides sont situés de part et d'autre de la délétion dans le gène du δ -sarcoglycane. Le couple d'oligonucléotides 5bp-F2/ gataggatttctctgtattg (5bp-R2) permet d'obtenir un produit de PCR de 276 pb chez les individus porteurs d'un allèle sauvage. L'oligonucléotide 5bp-R2 est situé dans la région génomique délétée chez le hamster CHF147 (Figure 26).

```

-510 cagtaaggtaatgactgccttggtgtgccaatgcctaggagtcagtagttcac agctctctccctgt
-442 ttccc agttcttagagtctttctcccccttattccttagtgagccctgatccttagggtgatagaagtgt
-372 ctcatctagcttagc actgaactctactaatagattccctgagattccataatgtttaaatacaagcaa
-302 tttcattgactataagaccctgtgaagttattatctccactatgaatgggtttgattttctgac atttt
-229 ctccaactcatttctctgagaagtgtgtcc tcaatccatgc agagtagc ctaactatctctggaga
-160 gcatgcctagaagcataaataactgaactctgttcac gctgtgctctttctacataggtataccca
-91 tgataaagttaatatgcaatgggaatagcaagatattc acaataacaaaagtgtaggtagagtcagg
-24 cagatctctgagtttgagcccagYctggtttacagaaagagttccaggacagcccaaaaaaca
atcacagaaatcctatcttgaaaagccaaaaaaaaattcaatgaataataacttcaataaac
cttagtgcttggaaatttcactcctgggtctcagagcta .....
.....//.....
.....atitaaccittttgttcttcatgtattc
agtcactctagatgaaattatgggttgatataacattaaccgttgactattatgcctatctaattgg
aaagcaagattaaaattgatatattcctcctgggaacataaYtctattgtactttatacttgag +23
aaacagattatgtaagtctactgcattgttgtgaacaggtgaacactgaaaataaccttgtaac +91
gtgtggtgtaatgcttggatttaagccttctggc actagctcattgagcttagaa +150

```

Figure 26. Séquence nucléotidique de l'ADN génomique d'un hamster sain entourant la délétion dans le gène du δ -sarcoglycane. La séquence nucléotidique délétée chez le hamster CHF147 est en italique. Les points de cassure en 5' et en 3' dans la séquence d'ADN génomique sont indiqués par des pointes de flèches. Les deux bases conservées les plus proches des points de cassure en 5' et en 3' sont en rouge et sont numérotées -1 et +1, respectivement. Les oligonucléotides utilisés pour les PCR de génotypage sont sur fonds colorés: en bleu, 5bp-F2, en rose, 5bp-R2 et en vert, 3bp-R2. Modifié d'après Sakamoto *et coll.*, FEBS Lett., 1999.

Deux approches ont été utilisées pour réaliser les PCR de génotypage. La première approche est identique à celle utilisées par Sakamoto *et coll.*, et est basée sur deux PCR.¹⁷² La

seconde approche a consisté à mettre au point une PCR unique avec les trois oligonucléotides, 5bp-F2, 3bp-R2 et 5bp-R2. Afin de stabiliser l'amorce 5bp-R2, 5 bases ont été ajoutées au niveau de l'extrémité 5' et le nouvel oligonucléotide ainsi obtenu a été nommé 5bp-R3 (ttcaagataggatttctctgtattg). Une fois mise au point, la PCR unique a été employée en routine pour le génotypage des hamsters CHF147.

La solution de PCR est constituée de la manière suivante : 100 à 200 ng d'ADNg, 40 pmol pour chacun des oligonucléotides, 200 μ M de dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$, 2,5 unités d'AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, France), 1X de tampon de l'enzyme (Applied Biosystems, France). Le volume final de PCR est de 20 μ L.

Les conditions de PCR sont les suivantes : 1 cycle de dénaturation de 2 min à 94°C puis 35 cycles d'hybridation de 30 s à 94°C puis 35 s à 56°C et 35 s à 72°C, 1 cycle de fusion de 35 s à 56°C et 1 cycle de refroidissement de 35 s à 40°C.

La taille des produits de PCR est vérifiée par migration sur gel d'agarose à l'aide d'un marqueur de taille.

3) Anesthésie et sacrifice des animaux

Les hamsters ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale d'un mélange de Kétamine (Imalgene®, Merial, France) à 75 mg/kg, de Xylazine (Rompun®, Bayer, France) à 15 mg/kg et de Midazolam (Hypnovel®, Roche, France) à 0,75 mg/kg. Ce mélange est appelé KXM.

A la fin des différents protocoles expérimentaux, les animaux ont été sacrifiés par injection d'une surdose de mélange KXM.

4) Technique d'administration de la protéine recombinante rhIGF-1

La protéine recombinante humaine IGF-1 (rhIGF-1, Millipore, France) utilisée contient 70 acides aminés et correspond à la forme mature de l'IGF-1 humaine, sans le peptide signal et le peptide E (voir figure 20 dans la partie "Introduction"). Elle a été délivrée au moyen de pompes osmotiques Alzet® (Alzet, USA) implantées en sous-cutané au niveau de l'abdomen, après anesthésie des animaux avec le mélange KXM (Figure 27).



Figure 27. Pompe osmotique Alzet®. Les pompes utilisées (modèles 2002 et 2004) ont une longueur de 3 cm et une largeur de 7 mm. Leur poids à vide est de 1,1 g et leur réservoir peut contenir un volume de 200 μ L.

Les pompes osmotiques Alzet® permettent une délivrance continue de la solution qu'elles contiennent pendant un temps donné selon le modèle choisi. Le modèle Alzet® 2002 délivre son contenu de manière continue pendant 2 semaines avec un débit moyen de 0,5 µL/h. Pour le modèle Alzet® 2004, la délivrance se fait sur 4 semaines avec un débit moyen de 0,25 µL/h. Grâce aux caractéristiques données par le fournisseur pour chacun des lots de pompes (débit, volume de remplissage et temps de délivrance), il a été possible de calculer le temps nécessaire pour que les pompes se vident. Ainsi, les modèles Alzet® 2002 et 2004 permettent une délivrance de leur contenu pendant 19 jours et 35 jours, respectivement.

Les pompes ont été pesées avant et après remplissage afin de calculer la quantité de protéine rhIGF-1 délivrée pendant la durée du traitement. Les hamsters ont reçu une dose totale de protéine recombinante comprise entre 22 µg et 30 µg. Les animaux contrôles (groupes Sham) ont été implantés avec des pompes remplies avec du sérum physiologique.

5) Technique d'injection du plasmide pCMV-IGF1

Après anesthésie, les hamsters ont été intubés puis ventilés (ventilateur SAR-830/P, Bioseb, France) pendant la durée de l'opération. Le cœur a été rendu accessible grâce à une petite laparotomie et une phrénotomie ventrale gauche. L'ADN complémentaire (ADNc) IGF-1, sous la forme du plasmide pCMV-IGF1, a été injecté, à une dose totale comprise entre 500 µg et 650 µg, en des sites multiples à travers la paroi du ventricule gauche, à l'aide d'une aiguille de calibre 31 Ga. Les hamsters contrôles ont été injectés avec du sérum physiologique.

6) Suivi des animaux

L'état général des animaux a été observé quotidiennement et les hamsters ont été pesés toutes les semaines à partir du début des différents protocoles expérimentaux ainsi qu'au moment du sacrifice.

7) Prélèvement du sang et du cœur

Avant le sacrifice des animaux, des échantillons de sang ont été prélevés. Les sera ont été extraits du sang par centrifugation à 5 000 rpm pendant 10 min, puis congelés à -80°C.

Au moment du sacrifice, les cœurs ont été prélevés, puis rincés dans du sérum physiologique, et les oreillettes ont été disséquées. Les ventricules ont été pesés et coupés en deux au niveau de la médiane ventriculaire, selon le petit axe transversal du cœur. Les moitiés de cœurs ont été soit congelées dans de l'isopropanol refroidit à l'azote liquide pour réaliser des coupes au cryostat, soit découpées en fragments et congelées directement dans l'azote liquide pour extraire des ARN ou des protéines.

B- Protocoles d'études

Quatre protocoles expérimentaux, représentés sur la figure suivante, ont été réalisés pendant ce travail de thèse (Figure 28).

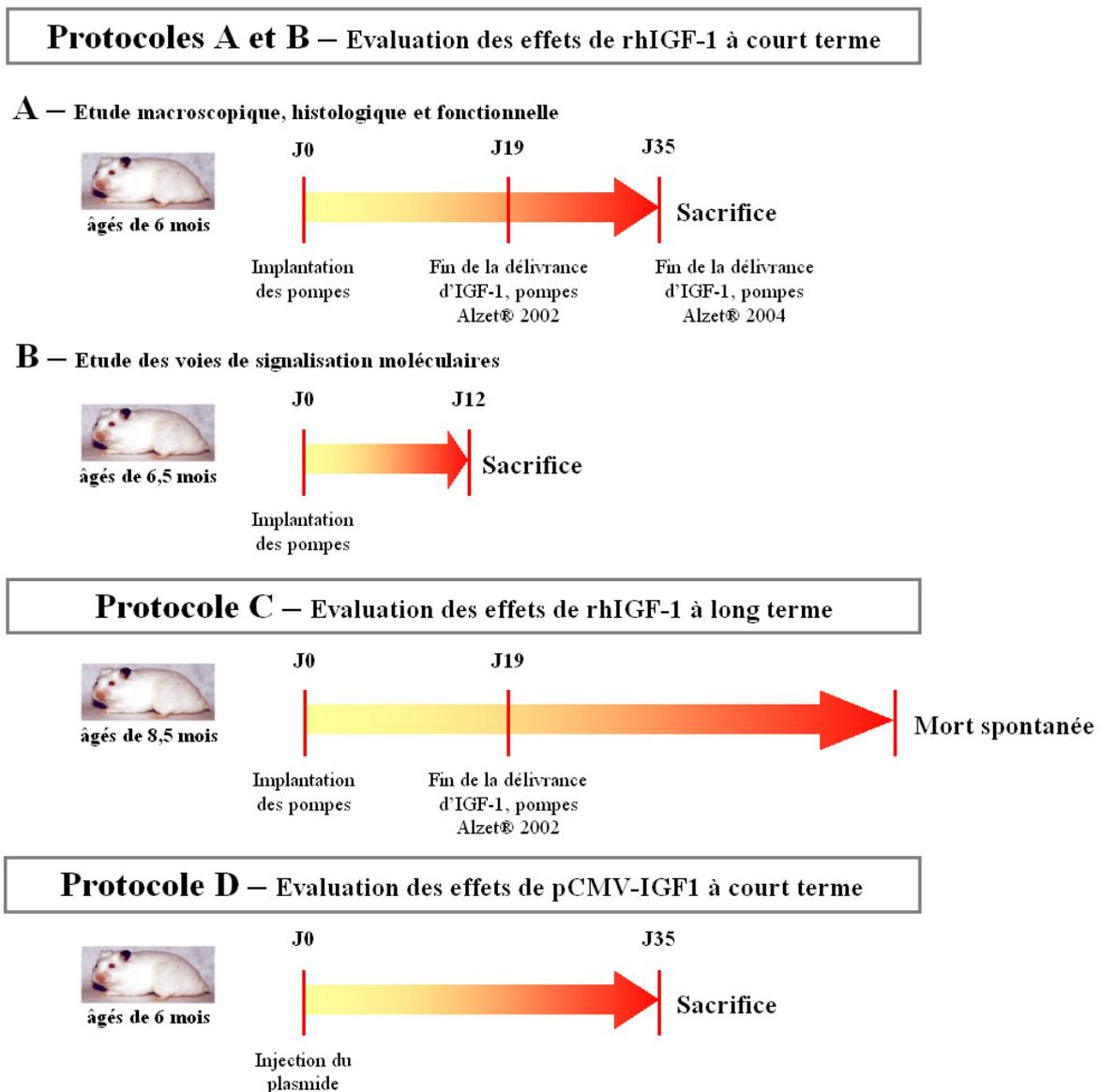


Figure 28. Représentation schématique des différents protocoles d'études réalisés sur les hamsters CHF147. Chaque protocole est détaillé dans le texte.

Le premier protocole (protocole A) a consisté à étudier les effets à court terme d'une administration courte de protéine rhIGF-1 sur la CMD des hamsters CHF147, grâce à des analyses macroscopiques, histologiques, immunohistochimiques et fonctionnelles. Pour cela,

des hamsters CHF147 âgés de 6 mois ont été traités avec rhIGF-1 pendant 35 jours, puis sacrifiés 35 jours après le début du traitement :

- 3 hamsters CHF147 ont été implantés avec des pompes Alzet® modèle 2004, remplies avec du sérum physiologique (groupe Sham (A)) ;
- 5 hamsters CHF147 ont été implantés avec des pompes Alzet® modèle 2002, remplies avec 21 µg de rhIGF-1 en moyenne ;
- 7 hamsters CHF147 ont été implantés avec des pompes Alzet® modèle 2004, remplies avec 22 µg de rhIGF-1 en moyenne (groupe rhIGF-1 (A)).

Le second protocole (protocole B) a donné lieu à l'étude des voies de signalisation moléculaires potentiellement impliquées dans l'induction des effets bénéfiques observés au cours du protocole 1, au moyen d'analyses moléculaires et biochimiques. Des hamsters CHF147 âgés de 6,5 mois ont été traités avec rhIGF-1 puis sacrifiés après 12 jours de traitement :

- 1 hamster CHF147 a été implanté avec une pompe Alzet® modèle 2002, remplie avec du sérum physiologique (groupe Sham (B)) ;
- 2 hamsters CHF147 ont été implantés avec des pompes Alzet® modèle 2002, remplies avec 27 µg de rhIGF-1 en moyenne (groupe rhIGF-1 (B)).

Le troisième protocole (protocole C) a été constitué de l'étude des effets à long terme de l'administration courte de protéine recombinante IGF-1 sur la CMD des hamsters CHF147, grâce à des évaluations macroscopiques, histologiques et fonctionnelles. Une étude de survie donc a été réalisée sur des hamsters CHF147 âgés de 8,5 mois traités avec rhIGF-1 pendant 19 jours :

- 5 hamsters CHF147 ont été implantés avec des pompes Alzet® modèle 2002, remplies de sérum physiologique (groupe Sham (C)) ;
- 7 hamsters CHF147 ont été implantés avec des pompes Alzet® modèle 2002, remplies avec 26 µg de rhIGF-1 en moyenne (groupe rhIGF-1 (C)).

Le dernier protocole (protocole D) a permis de tester les effets d'une approche par thérapie génique sur la CMD des hamsters CHF147. Des analyses macroscopiques, histologiques, immunohistochimiques et fonctionnelles ont été réalisées pour évaluer les effets du traitement. Dans ce protocole, des hamsters CHF147 âgés de 6 mois ont été traités par transfert de gène avec un plasmide codant pour le gène de l'IGF-1 puis sacrifiés après 35 jours :

- 4 hamsters CHF147 ont été injectés avec du sérum physiologique (groupe Sham (D)) ;
- 6 hamsters CHF147 ont été injectés avec 500 à 650 µg de plasmide pCMV-IGF1 (groupe pCMV-IGF1).

C-Histologie, immunohistochimie

1) Coupes de cœurs de hamsters

Des coupes de cœurs de 8 μm et 6 μm d'épaisseur, respectivement, ont été réalisées au cryostat à partir des moitiés de cœurs congelées dans l'isopropanol pour les analyses histologiques et immunohistochimiques.

2) Histologie

a. Coloration à l'hématoxyline-éosine

Les coupes de tissus sont fixées dans du para-formaldéhyde (PAF) 4% pendant 10 min, rincées 3 x 10 min à l'eau, incubées dans un bain d'hématoxyline 1% pendant 30 s, rincées à l'eau puis dans un bain d'éosine 1% pendant 15 s. Elles sont ensuite déshydratées quelques secondes dans des bains successifs d'alcool (75°, 90° et 100°), puis incubées dans deux bains de xylène et montées au baume du Canada. La coloration à l'hématoxyline-éosine (H&E) colore les noyaux en violet et le cytoplasme en rose.

b. Coloration au rouge Sirius

Les coupes de tissus sont fixées dans du PAF 4% pendant 10 min, rincées 3 x 10 min à l'eau et incubées pendant 1h dans une solution d'acide picrique contenant 1% de rouge Sirius F3B. Les coupes sont ensuite déshydratées quelques secondes dans des bains successifs d'alcool (75°, 90° et 100°), puis incubées dans deux bains de xylène et montées au baume du Canada. Le rouge Sirius (RS) permet de colorer les collagènes de types I et III en rouge.

c. Coloration de la succinyl déshydrogénase

Les coupes de tissus sont incubées dans un tampon phosphate 0,2 M contenant 10% de nitrobleu tétrazolium pendant 30 min à 37°C puis sont montées à la glycérine gélatinée. La coloration à la succinyl déshydrogénase (SDH) permet de marquer les mitochondries.

d. Coloration au nitrate d'argent (réaction de von Kossa)

Les coupes de tissus sont fixées dans du PAF 4% pendant 10 min, rincées 3 x 10 min à l'eau et incubées dans une solution de nitrate d'argent 1% pendant 30 min et à l'obscurité.

Elles sont ensuite exposées à la lumière pendant 1h dans de l'eau distillée puis contre-colorées à l'hématoxyline-éosine. Enfin, de la même façon que pour la coloration H&E, elles sont déshydratées, incubées dans les bains de xylène et montées au baume du Canada. La réaction de von Kossa permet de révéler les sels de calcium en leur substituant le nitrate d'argent qui est visualisé après réduction en argent métallique noir.

e. Observation des lames

Les coupes ont été observées en lumière blanche à l'aide d'un microscope droit Nikon Eclipse E800 équipé d'une caméra Nikon Digital Camera DXM1200 (Nikon, France).

Les épaisseurs des différentes parois cardiaques et les diamètres des cœurs ont été mesurés sur des coupes fixées et colorées, au moyen d'un pied à coulisse électronique.

3) Mesure de la fibrose

La détection de la fibrose a été réalisée avec le logiciel LuciaG© version 4.61 (Nikon, France) sur des coupes de cœurs colorées au RS au grossissement 1x. Ce logiciel d'analyse semi-automatique permet de définir des seuils de couleurs et de mesurer les aires colorées correspondantes. Ainsi, il est possible de mesurer sur coupes de tissu, l'aire totale de la coupe et l'aire envahie par la fibrose. La proportion de fibrose par coupe est ensuite calculée en faisant le rapport de l'aire contenant la fibrose sur l'aire totale de la coupe. La quantification de la fibrose a été réalisée sur 9 coupes pour le groupe Sains, 5 coupes pour le groupe Non traités, 4 coupes pour le groupe rhIGF-1 (A) et 10 coupes pour le groupe pCMV-IGF1.

4) Immunohistochimie

a. Marquages sur coupes de tissu cardiaque

Pour les marquages sur coupes de tissus, chaque coupe a été entourée par un trait de DakoCytomation Pen (DakoCytomation, France) et incubée dans 100 µL d'anticorps.

Les lames ont été montées avec du Mowiol (VWR, France) préparé selon la méthode décrite par Heimer & Taylor ⁸⁴, auquel a été ajouté du diamidino-4',6-phenylindol-2 dichlorhydrate (DAPI à 50 ng/mL, VWR, France), ou avec du milieu de montage Vectashield® avec DAPI (DAPI à 1,5 µg/mL, Vector Laboratories, France), afin de marquer les noyaux cellulaires.

i- Marquage en immunofluorescence

Marquage simple du δ -sarcoglycane :

L'anticorps primaire utilisé est l'anticorps polyclonal de lapin anti- δ -sarcoglycane (IgG purifiées, Covalab, France) dilué au 1/100. L'anticorps secondaire utilisé est l'anti-lapin IgG couplé à l'Alexa 568 (Molecular Probes, France) dilué au 1/200.

Les coupes de cœurs sont fixées par incubation dans de l'acétone à -20°C pendant 5 min puis ré-hydratées pendant 5 min dans du PBS 1X. Elles sont ensuite saturées par incubation dans du sérum de chèvre à 10% (Sigma, France) pendant 30 min à température ambiante. Les coupes sont incubées toute la nuit avec l'anticorps primaire à $+4^{\circ}\text{C}$ puis avec l'anticorps secondaire pendant 1h à température ambiante et à l'obscurité. Les lames sont montées et conservées à l'obscurité.

Marquage simple du collagène de type I :

L'anticorps primaire utilisé est l'anticorps polyclonal de lapin anti-collagène I de rat (Chemicon International, France) dilué au 1/30. L'anticorps secondaire utilisé est l'anti-lapin couplé au CY3 (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Angleterre) dilué au 1/200.

Les coupes de cœurs sont fixées par incubation dans du PAF 4% pendant 20 min à température ambiante. Elles sont ensuite perméabilisées par incubation dans du PBS 1X – Triton 0,5% pendant 15 min et saturées par incubation dans du sérum de chèvre 10% (Sigma, France) pendant 30 min à température ambiante. Elles sont incubées avec l'anticorps primaire pendant 1h à 2h à température ambiante puis avec l'anticorps secondaire pendant 1h à température ambiante et à l'obscurité. Les lames sont montées et conservées à l'obscurité.

Marquage simple de l'IGF-1 :

L'anticorps primaire utilisé est l'anticorps polyclonal de lapin anti-IGF-1 humain (Chemicon International, France) dilué au 1/500. L'anticorps secondaire utilisé est l'anti-lapin couplé au CY3 (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Angleterre) dilué au 1/400.

Les coupes de cœurs sont fixées par incubation dans du PAF 4% pendant 20 min à température ambiante. Elles sont ensuite perméabilisées par incubation dans du PBS 1X – Triton 0,5% pendant 15 min et saturées par incubation dans du sérum de chèvre 10% (Sigma, France) pendant 30 min à température ambiante. Elles sont incubées avec l'anticorps primaire pendant 1h à 37°C puis avec l'anticorps secondaire pendant 1h à température ambiante et à l'obscurité. Les lames sont montées et conservées à l'obscurité.

Marquage simple de la dystrophine :

L'anticorps primaire utilisé est l'anticorps monoclonal de souris anti-dystrophine humaine (clone NCL-DYS1, Novocastra, France) dilué au 1/40. L'anticorps secondaire utilisé est l'anti-souris IgG (H+L) couplé à l'Alexa 568 (Molecular Probes, France) dilué au 1/1 000.

Les coupes de cœurs sont réhydratées dans du PBS 1X pendant 5 min puis saturées par incubation dans du sérum de chèvre 10% (Sigma, France) pendant 30 min à température ambiante. Elles sont incubées avec l'anticorps primaire pendant 1h à 2h à 37°C puis avec l'anticorps secondaire pendant 1h à température ambiante et à l'obscurité. Les lames sont montées et conservées à l'obscurité.

Marquage double du collagène de type I et de la myosine :

Les anticorps primaires utilisés sont l'anticorps polyclonal de lapin anti-collagène I de rat (Chemicon International, France) dilué au 1/30 et l'anticorps monoclonal de souris anti-MHC (myosine chaîne lourde) de rat (clone NOQ7.5.4D, Sigma, France) dilué au 1/1500. Les anticorps secondaires utilisés sont l'anti-lapin couplé au FITC (DakoCytomation, France) dilué au 1/300 et l'anti-souris couplé au CY3 (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Angleterre) dilué au 1/400.

Les coupes de cœurs sont fixées par incubation dans de l'acétone à -20°C pendant 10 min à +4°C. Elles sont ensuite perméabilisées par incubation dans du PBS 1X – Triton 0,5% pendant 15 min à température ambiante et saturées par incubation dans du sérum de chèvre 10% (Sigma, France) pendant 30 min à température ambiante. Elles sont incubées avec l'anticorps primaire anti-myosine pendant la nuit à +4°C puis avec l'anticorps secondaire anti-souris pendant 30 min à 37°C et à l'obscurité. Les coupes de cœurs sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire anti-collagène pendant 1h à 37°C et à l'obscurité puis avec l'anticorps secondaire anti-lapin pendant 1h à température ambiante et à l'obscurité. Les lames sont montées et conservées à l'obscurité.

Marquage double du collagène de type I et de la troponine I cardiaque :

Les anticorps primaires utilisés sont l'anticorps polyclonal de lapin anti-collagène I de rat (Chemicon International, France) dilué au 1/30 et l'anticorps monoclonal de souris anti-troponine I de rat (Chemicon International, France) dilué au 1/2000. Les anticorps secondaires utilisés sont l'anti-lapin couplé au FITC (DakoCytomation, France) dilué au 1/300 et l'anti-souris couplé au CY3 (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Angleterre) dilué au 1/400.

Les coupes de cœurs sont fixées par incubation dans du PAF 4% pendant 20 min. Elles sont ensuite perméabilisées par incubation dans du PBS 1X – Triton 0,5% pendant 15 min et saturées par incubation dans du sérum de chèvre 10% (Sigma, France) pendant 30 min à température ambiante. Elles sont incubées avec l'anticorps primaire anti-troponine I cardiaque pendant la nuit à +4°C puis avec l'anticorps primaire anti-collagène pendant 1h à 2h à température ambiante. Enfin les coupes de cœurs sont incubées avec un mélange des anticorps secondaires anti-souris et anti-lapin pendant 1h à température ambiante et à l'obscurité. Les lames sont montées et conservées à l'obscurité.

ii- Marquages à la peroxydase

Les anticorps primaires utilisés sont l'anticorps monoclonal de souris anti-macrophage de rat (Biosource Europe, Belgique) dilué au 1/800 et l'anticorps monoclonal de souris anti-CD8 de rat (PharMingen International, France) dilué au 1/500. L'anticorps secondaire utilisé est l'anti-souris couplé à la biotine (Vector Laboratories, France) dilué au 1/100.

Les coupes de cœurs sont fixées par incubation dans de l'acétone à -20°C pendant 15 min. Elles sont ensuite saturées par incubation dans du sérum de chèvre 10% (Sigma, France) pendant 15 min à température ambiante. Elles sont incubées avec l'anticorps primaire pendant 30 min à température ambiante puis avec l'anticorps secondaire pendant 30 min à température ambiante. Enfin les coupes sont incubées avec le mélange HRP (Horseradish Peroxidase Streptavidin, Vector Laboratories, France) et révélées avec le kit Novared (Vector, France). Les lames sont enfin montées avec le milieu de montage aqueux Dako® Faramount (DakoCytomation, France).

b. Observation des lames

i- Observation des marquages en immunofluorescence

Les coupes de cœurs marquées en immunofluorescence sont observées en lumière fluorescente à l'aide d'un microscope droit Axioplan 2 (Zeiss, France) équipé d'une caméra CCD Photometrics® CoolSnap fx (Sony, France) et couplé au logiciel d'analyse d'image MetaVue, version 6.2 (Universal Imaging Corporation, Angleterre).

ii- Observation des marquages à la peroxydase

Les coupes de cœurs marquées à la peroxydase ont été observées en lumière blanche à l'aide d'un microscope droit Leica DMR (Leica Microsystems, France) équipé d'une caméra CCD Sony 3CCD Color Video Camera, modèle DXC-950P (Sony, France) et couplé au logiciel TRIBVN ICS (TRIBVN, France).

D-Biologie moléculaire

1) Clonage du plasmide pCMV-IGF1

L'insert IGF-1 utilisé pour créer le plasmide pCMV-IGF1 correspond à la séquence codante de la forme pré-pro-IGF-1a de rat (numéro d'accèsion AAA41215) obtenue à partir de la séquence génomique de l'IGF-1 de rat (numéro d'accèsion AH002176). La séquence de l'insert IGF-1 est composée d'une partie des séquences de l'exon 1 (bases 1 815 à 1 835 et 2 041 à 2 103), de l'exon 2 (bases 163 à 319), de l'exon 3 (bases 269 à 450) et de l'exon 5 (bases 565 à 624) du gène de l'IGF-1 de rat (Figure 29).

Séquence de l'insert IGF-1

```
gtctgtgttttagataaatacttgtacttcagaagcATGGGAAAATCAGCAGTCTTCCA  
CAATTATTTAAGATCTGCCTCTGTGACTTCTTGAAGATAAAGATACACATC  
ATGTCGTCTTCACATCTTCTACCTGGCACTCTGCTTGCTCACCTTTACCA  
GCTCGGCCACAGCCGGACCAGAGACCCTTTGCGGGGCTGAGCTGGTGGAC  
GCTCTTCAATTCGTGTGTGGACCAAGGGGCTTTTACTTCAACAAGCCCACA  
GGCTATGGCTCCAGCATTCCGAGGGCACACAGACGGGCATTGTGGATGA  
GTGTTGCTTCCGGAGCTGTGATCTGAGGAGGCTGGAGATGTA  
CGCTGAAGCCTACAAAGTCAGCTCGTTCCATCCGGGCCCAGCGCCACACT  
GACATGCCCAAGACTCAGAAGGAAGTACACTTGAAGAACACAAGTAGAG  
GAAGTGCAGGAAACAAGACCTACAGAATGTAGgaggagcctcccgaggaa  
cagaaaatgcccacgtcaccgcaagatccttgcctgctgagcaacctgcaaaacatc  
ggaacacctgccaatatcaataatgagttcaataccatttcagagatgggcatttc  
cctcaatgaaatacacaagtaaaccattccgac
```

Traduction en protéine (numéro d'accèsion AAA41215)

```
MGKISSLPTQLFKICLCDFLKIKIHIMSSSHLFYLALCLLFTSSATAGPETLCG  
AELVDALQFVCGPRGFYFNKPTGYGSSIRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRL  
EMYCAPLKPTKSARSIRAQRHTDMPKTQKEVHLKNTSRGSAGNKT YRM
```

Figure 29. Séquence nucléotidique de l'insert IGF-1 contenu dans le plasmide pCMV-IGF1. Le codon d'initiation de la traduction est en orange et le codon stop en bleu. La séquence codante est en majuscule. La séquence de la protéine de 153 acides aminés traduite à partir de l'insert IGF-1 est indiquée sous la séquence nucléotidique.

L'insert a été introduit dans le vecteur de clonage pGEM®-T Easy Vector (Promega, France) à partir duquel il a été sous-cloné dans le vecteur pCMV-LacZ (Clontech, France). Grâce aux sites de restrictions *NotI* présents dans les vecteurs pGEM®-T Easy Vector et pCMV-LacZ, le gène LacZ a été remplacé par l'insert IGF-1, ce qui a permis d'obtenir le plasmide pCMV-IGF1 (Figure 30). La taille totale du plasmide pCMV-IGF1 est de 4 356 pb.

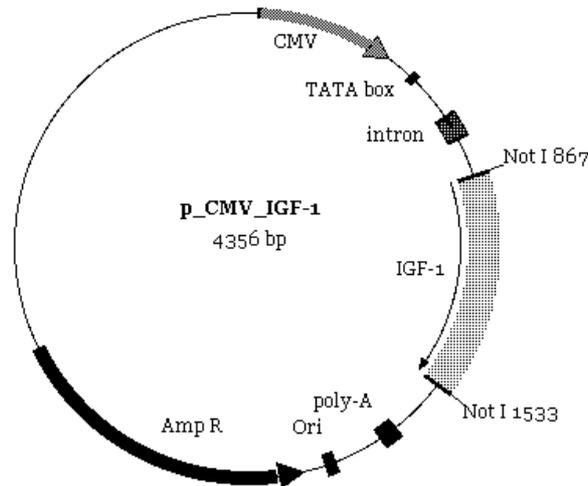


Figure 30. Plasmide pCMV-IGF1. Le plasmide est constitué du promoteur ubiquitaire CMV, d'une boîte TATA (TATA box), d'un intron puis de la séquence d'ADNc de l'IGF-1 de rat et d'une séquence polyA, qui lui permettent de transcrire la séquence IGF-1 dans les cardiomyocytes injectés. Il contient également une séquence l'autorisant à se répliquer dans une bactérie compétente (séquence Ori) et un gène de résistance à l'ampicilline (Amp R), pour sélectionner les bactéries qui le renferment.

2) Production du plasmide pCMV-IGF1

Des bactéries *Escherichia coli* compétentes (lignées JM109, Promega, France) sont transformées avec le plasmide pCMV-IGF1 puis mises en culture sur une gélose sélective à base de LB Broth Base, LB Agar (Invitrogen, France) et d'ampicilline (100 µg/mL, Sigma, France) pendant la nuit à 37°C. Plusieurs colonies sont isolées et mises en culture dans un milieu sélectif liquide à base de LB Broth Base et d'ampicilline (100 µg/mL) pendant la nuit à 37°C sous agitation. L'ADN plasmidique contenu dans chacun des clones est extrait et purifié par la technique de "minipreps", puis digéré par l'enzyme de restriction *NotI* (BioLabs, France) pour libérer l'insert IGF-1. La taille des deux fragments d'ADN plasmidique (vecteur + insert) est vérifiée par migration sur gel d'agarose. Des stocks de bactéries transformées avec le plasmide pCMV-IGF1 sont conservés en glycérol 10% à -80°C.

Le plasmide pCMV-IGF1 est produit à partir de 2,5 L de culture en milieu sélectif liquide grâce au kit d'extraction Giga sans endotoxine (Qiagen, France), selon le protocole donné par le fournisseur. Le culot d'ADN plasmidique est resuspendu dans 1 mL d'eau. La quantité et la qualité de plasmide pCMV-IGF1 sont respectivement mesurées par spectrophotométrie (Nanodrop, Labtech, France) et visualisées par migration sur gel

d'agarose. La concentration moyenne de plasmide pCMV-IGF1 obtenue après purification est d'environ 6 mg/mL. De plus, la séquence de l'insert IGF-1 a été vérifiée par séquençage.

3) Extraction d'ARN totaux de cœur

Les extractions d'ARN totaux sont réalisées à partir de cœurs prélevés sur les hamsters au moment du sacrifice, puis rincés dans du sérum physiologique, coupés en fragments et congelés dans l'azote liquide. Pour chaque cœur, deux ou trois extractions d'ARN sont effectuées.

Au moment de l'extraction des ARN totaux, les fragments de cœur sont broyés dans l'azote liquide. Les broyats sont ensuite lysés, dans des tubes Lysing Matrix D (Q-BIOgene, France) contenant le tampon de lyse RLT (kit RNeasy Fibrous Tissue, Qiagen, France) avec du β -mercaptoéthanol 1%, grâce à l'appareil Fastprep (Q-BIOgene, France). Le protocole d'extraction d'ARN est ensuite réalisé grâce au kit RNeasy Fibrous Tissue (Qiagen, France) selon les indications données par le fournisseur, en déposant 20 mg de tissu par colonne. Les ARN totaux sont élués dans 50 μ L d'eau sans RNase et sont conservés à -80°C .

La concentration en ARN totaux après extraction est mesurée par spectrophotométrie (NanoDrop, Labtech, France). Le rendement moyen des extractions avec le kit RNeasy Fibrous Tissue est d'environ 480 μg d'ARN totaux/mg de tissu cardiaque initial. La qualité des ARN totaux extraits est vérifiée avec le kit Agilent RNA 6000 Nano (Agilent Technologies, France) grâce au BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, France).

4) Transcription inverse des ARN totaux en ADNc

Pour chaque échantillon d'ARN totaux, deux ou trois transcriptions inverses sont réalisées. A partir de 25 ng/ μ L d'ARN totaux de cœurs de hamsters, les ARN messagers sont transcrits en ADNc avec le kit SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, France) en utilisant les amorces oligodT, selon le protocole décrit par le fournisseur. La qualité et la concentration en acides nucléiques contenus dans la solution en fin de transcription inverse sont mesurées par spectrophotométrie (NanoDrop, Labtech, France). La concentration moyenne en acides nucléiques obtenue est de 880 ng/ μ L.

5) PCR semi-quantitative en temps réel

La plupart des séquences codantes des gènes n'étant pas disponibles pour le hamster, les amorces utilisées pour la PCR semi-quantitative en temps réel ont été choisies après un travail de comparaison des séquences codantes disponibles pour d'autres espèces de mammifères (souris, rat, lapin, chien et Homme). Les séquences des gènes d'intérêt ont été obtenues dans la catégorie "Nucleotides" sur le site du National Center for Biotechnology

Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=nucleotide>). Puis, elles ont été alignées grâce à l'algorithme d'alignements multiples ClustalW disponible sur le site d'Infobiogene (site fermé en 2006 mais disponible à l'adresse suivante : <http://bioinfo.hku.hk/services/menuserv.html>) ou sur le site de l'Institut Pasteur (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/clustalw.html>). Les amorces ont été choisies à partir des séquences de souris, dans des régions très conservées entre les différentes espèces, grâce au logiciel Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Les paramètres de sélection des amorces ont été les suivants : taille des produits de PCR entre 280 et 330 bases ; températures d'hybridation des amorces optimales à 60°C ; taille des amorces optimales à 20 pb (Tableau 5).

Tableau 5. Liste des oligonucléotides utilisés pour les expériences de PCR semi-quantitative en temps réel.

| Nom du gène | Numéro accession | Oligonucléotide sens | Oligonucléotide anti-sens | Taille produit de PCR (en pb) |
|-------------------|------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------------|
| β-actine | MAU312092 | tgcccatctatgagggtac | aggaaggaaggctggaaaag | 313 |
| R-IGF1 | NM_010513 | ctacgtgaagatccgccatt | ctccgttctctctgtgttt | 293 |
| IRS-1 | NM_010570 | ggctgactccaagaacaagc | cggtagatgccaatcaggtt | 312 |
| PI3K p110α | NM_008839 | gaattgggagaaccagaca | gccctgttcttgccttga | 319 |
| Akt | BC066018 | aggacggtgccactatgaag | catgatctccttggcatcct | 308 |
| ERK | Z14249 | cagctgagcaatgaccacat | cacagaccagatgctgatgg | 285 |
| SERCA2a | NM_009722 | ggaactcgtaggatggcaaa | cagagcacagatggtggcta | 294 |
| PLN | NM_023129 | caagcacgtcagaatctcca | tgaggaaattggcagctaca | 314 |
| NCX | NM_011406 | gaaaccgaatggagagacca | ggctgctgtcacaagaaca | 280 |
| RyR2 | NM_023868 | tcttctgtggtgaaggaaagg | tgtcccactggcctttgata | 325 |
| MHC | NM_010856 | cacctggaggaccagatta | aggcgtagtctatgggttg | 293 |
| cTNNI | NM_009406 | ccacacgccaagaaaaagtc | ttgccacggaggtcatagat | 317 |

Les numéros d'accèsion ainsi que les séquences des amorces et les tailles des produits de PCR sont ceux de la souris. R-IGF1 = récepteur de l'IGF-1, IRS-1 = Insulin Receptor Substrate-1, PLN = phospholamban, NCX = échangeur sodium/calcium, RyR2 = récepteur de la ryanodine cardiaque, MHC = myosin heavy chain, cTNNI = troponine I cardiaque.

Chaque couple d'amorce a été testé par PCR classique sur des échantillons d'ADNc de hamster sain. Les produits de PCR ont migré sur un gel d'agarose et la présence d'une bande unique à la taille attendue a été vérifiée à l'aide d'un marqueur de taille.

De plus, les produits de PCR ont également été purifiés et séquencés. Deux vérifications des séquences ont été réalisées en parallèle. D'une part, les séquences des produits de PCR ont été soumises à un alignement, grâce à un algorithme de type Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), avec la séquence du génome de la souris (<http://mouseblast.informatics.jax.org/>). Pour toutes les séquences soumises, le premier résultat de l'algorithme, c'est-à-dire la séquence du génome de souris la plus homologue à la séquence soumise, correspondait au gène attendu. D'autre part, les séquences de hamsters ont été alignées avec les séquences attendues des produits de PCR murins. Dans tous les cas, le pourcentage d'homologie entre les séquences de hamster et de souris était d'au moins 80%.

Une fois les vérifications préliminaires sur les séquences des amplicons de hamster effectuées, les PCR ont été mises au point avec le kit LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche, France) en utilisant le thermocycleur Light Cycler® 2.0 Real-Time PCR System (Roche, France). Pour chaque gène à quantifier, différentes concentrations d'amorces et de MgCl₂ ont été testées afin d'obtenir une efficacité de PCR au moins égale à 95%.

L'approche utilisée a été une quantification relative des ADNc. Pour cela, un gène de référence, le gène de la β -actine, dont les niveaux de transcrits ne varient pas entre les hamsters sains et CHF147, a été utilisé pour normaliser les niveaux de transcrits des différents gènes étudiés. De même, l'ADNc d'un individu de référence, un hamster sain, a été utilisé pour normaliser les différents ADNc entre eux. Le niveau de transcrits du gène d'intérêt par rapport au gène β -actine chez le hamster sain a été fixé à 1. Les niveaux d'expression des différents gènes d'intérêts sont exprimés par rapport à ce ratio. Un ratio supérieur à 1 reflète une augmentation du niveau de transcrits et donc une surexpression du gène d'intérêt. À l'inverse, un ratio inférieur à 1 reflète une diminution du niveau de transcrits et donc une sous-expression du gène d'intérêt.

Les quantifications ont été réalisées à quantité d'ADNc constante (170 ng/PCR) dans les conditions suivantes : 1 cycle de dénaturation, 8 min à 95°C ; puis 40 à 50 cycles d'hybridation, 10 s à 95°C, 15 s à 64°C, 15 s à 72°C ; puis 1 cycle de fusion, 20 s à 65°C et incrémentation de 0,1°C/s jusqu'à 98°C, enfin 1 cycle de refroidissement, 30 s à 40°C.

Les résultats des PCR de quantification des ADNc pour les différents gènes d'intérêt ont été analysés avec le logiciel RelQuant (Roche, France).

E- Biologie cellulaire

1) Transfection du plasmide pCMV-IGF1 dans les cellules HEK293

Les cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney, ATCC, USA), qui sont des cellules du rein d'embryon humain, sont mises en culture à une densité de 15.10^4 cellules/mL en milieu DMEM-glutamax (Dulbecco Modified Eagle Medium-glutamax, Life Technologies, France). Après 24h de culture à 37°C et 5% de CO₂, les cellules HEK293 sont transfectées avec le plasmide pCMV-IGF1 en présence de Fugene6 (Roche, France) puis remises en culture pendant 48h. La concentration en protéine IGF-1 présente dans les surnageants de culture des cellules HEK293 a été dosée par ELISA.

F- Biochimie

1) Dosages par ELISA

Des dosages par ELISA de la concentration en IGF-1 contenue dans les lysats cellulaires de cultures de cardiocytes incubées avec la protéine rhIGF-1 ou dans les surnageants des cultures de cellules HEK293 transfectées avec le plasmide pCMV-IGF1 ainsi que dans les sera des hamsters inclus dans les différents protocoles d'études, ont été réalisés grâce au kit Quantikine® IGF-1 humain (R&D Systems, France), selon le protocole donné par le fournisseur. Les sera ont été pré-traités avec une solution de dissociation acide afin de séparer l'IGF-1 de ses IGFBP. La lecture des absorbances a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre Fluostar (BMG Labtechnologies, France). La lecture de la DO a été réalisée à une longueur d'onde de 450 nm et la correction de la DO a été faite à 562 nm.

2) Extraction des protéines totales de cœurs de hamsters

Les protéines totales de cœurs de hamsters sont extraites à partir de tissus congelés. Les tissus sont broyés dans l'azote liquide à l'aide d'un pilon et d'un mortier puis le broyat est incubé à température ambiante dans une solution d'extraction (80 mM de Tris pH 6,8, 10% de SDS, 0,12 M de saccharose et 10 mM d'EDTA) à laquelle sont rajoutés, extemporanément, des inhibiteurs de protéases, leupeptine 10 µg/mL (Euromedex, France), aprotinine 25 µg/mL (Euromedex, France), AEBSF 1 mM (Euromedex, France) et pepstatine A 10 µg/mL (Euromedex, France), ainsi que des inhibiteurs de phosphatases, Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 et Cocktail 2 (Sigma, France), dilués au 1/100. Le broyat tissulaire est homogénéisé à température ambiante dans un potter en verre. Puis, l'homogénat de tissu cardiaque est incubé 15 min à 55°C et centrifugé 15 à 30 min à 10 000 rpm. Les protéines totales contenues dans le surnageant sont dosées par colorimétrie.

3) Extraction des protéines totales de cardiocytes de hamsters en culture

Soixante-douze heures après la mise en culture, soit 48h après l'ajout de rhIGF-1 dans le milieu de culture, les cardiocytes sont incubés pendant 5 min dans une solution d'extraction de protéines (250 µL/puits de culture) contenant 10 mM de Tris, 2 mM d'EDTA pH 8,2, 150 mM de NaCl dont le pH est ajusté à 7,6. Les inhibiteurs de protéases suivants sont ajoutés extemporanément à la solution d'extraction : leupeptine 10 µg/mL (Euromedex, France), aprotinine 25 µg/mL (Euromedex, France), AEBSF 1 mM (Euromedex, France) et pepstatine A 10 µg/mL (Euromedex, France).

Puis les cellules sont décollées de la gélatine à l'aide d'un grattoir et les suspensions cellulaires sont homogénéisées dans un potter en verre refroidi dans la glace. Les homogénats cellulaires sont ensuite centrifugés pendant 2 min à 12 000 rpm et +4°C et les protéines totales contenues dans les surnageants sont dosées par colorimétrie.

4) Dosage des extraits protéiques

Les protéines totales contenues dans les surnageants récupérés après centrifugation sont dosées par colorimétrie à l'aide d'un spectrophotomètre (FLUOstar *OPTIMA*, BMG Labtechnologies, France), après avoir réalisé une réaction du Biuret (kit BCA™ Protein Assay Kit, Pierce, France). La protéine utilisée pour établir la gamme de référence est la Bovine Serum Albumin (BSA, sérum albumine bovine). La lecture de la DO a été réalisée à une longueur d'onde de 562 nm.

5) Western blots

La composition des solutions utilisées pour les Western blots est détaillée en annexe 1.

a. Western blot de la protéine RyR2

Des extraits de protéines totales de cœurs de hamsters (40 µg) ont été préparés dans une solution de charge Laemmli (BioRad, France) et conservés 30 min à température ambiante avant d'être séparés sur un gel SDS-PAGE en gradient 4-12%. L'électrophorèse a été réalisée dans une solution 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% SDS, pH 8,3 (BioRad, France), pendant 1h à 40 mA, avec le système Mini Trans-Blot® Cell (BioRad, France). Les protéines ont été transférées sur une membrane en PVDF Immobilon-P 0,45 µm (Millipore, France) dans une solution 25 mM Tris, 192 mM glycine, 10% éthanol, 0,025% SDS, pendant 3-4h à 0,8 A, avec réfrigération constante par circulation d'eau.

La détection de la protéine RyR2 (masse moléculaire 565 kDa) sur membrane a été réalisée de la manière suivante. Les membranes ont été saturées dans une solution PBS 1X – Tween20 0,1% – lait 4% (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk, BioRad, France) pendant 30 min à température ambiante. Puis elles ont été incubées avec l'anticorps anti-RyR (anticorps polyclonal, fait à façon et dirigé contre la protéine RyR purifiée à partir de muscle de porc) dilué au 1/10 000 en PBS 1X – Tween20 0,1% – lait 4%, pendant la nuit à +4°C. Les membranes ont été lavées dans une solution de PBS 1X – Tween20 0,1%, puis incubées avec l'anticorps secondaire anti-immunoglobulines (Ig) de lapin couplé à la HorseRadish Peroxidase (HRP) (Jackson ImmunoResearch Ltd, Angleterre) diluée au 1/10 000 en PBS 1X – Tween20 0,1% – lait 4% pendant 2-3h à température ambiante. L'activité

enzymatique de l'HRP est ensuite détectée par chimiluminescence (Western Lightning®, PerkinElmer, France) avec l'appareil Molecular Imager® Chemidoc™ (BioRad, France).

b. Western blot de la protéine SERCA2a

Le western blot de la protéine SERCA2a a été réalisé avec le système d'électrophorèse NuPAGE® (Invitrogen, France) en conditions dénaturantes, selon le protocole décrit par le fournisseur. Des extraits de protéines totales de cœurs de hamsters (50 µg) ont été préparés dans la solution NuPAGE® LDS Sample Buffer, à laquelle est ajouté le NuPAGE® Reducing Agent, et chauffés à 70°C pendant 10 min, avant d'être séparés sur un gel NuPAGE® Novex Tris-Acetate en gradient 3-8%. L'électrophorèse a été réalisée dans la solution NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer, à 100 V, avec le système X Cell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen, France). Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose 0,45 µm (Invitrogen, France) dans la solution NuPAGE® Transfer Buffer pendant 2h à 0,6 A à +4°C.

La détection de la protéine SERCA2a (masse moléculaire ~110 kDa) sur membrane a été réalisée de la manière suivante. Les membranes ont été saturées dans une solution PBS 1X – Triton 0,1% – lait 5% (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk, BioRad, France) pendant 1h à température ambiante. Puis elles ont été incubées avec l'anticorps monoclonal anti-SERCA2 ATPase (Affinity BioReagents, France) dilué au 1/500 en PBS 1X – Triton 0,1% – lait 5%, pendant 2h à RT. Les membranes ont été lavées avec une solution de PBS 1X – Tween20 0,1%, puis incubées avec l'anticorps secondaire anti-Ig de souris couplé à l'HRP (DakoCytomation, France) diluée au 1/1 000 en PBS 1X – Triton 0,1% – lait 5% pendant 1h à température ambiante. L'activité de l'HRP est ensuite détectée par chimiluminescence (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, France) et l'appareil ChemiImager™ 5500 (Alpha Innotech, France).

c. Western blots des autres protéines étudiées

Des extraits de protéines totales de cœurs de hamsters (25-100 µg) ont été préparés dans une solution de charge Laemmli (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% glycérol, 4% SDS, 0,1% bleu de bromophénol, 10% β-mercaptoéthanol) puis déposés sur des gels SDS-PAGE, dont les concentrations en acrylamide ont été choisies en fonction des tailles des protéines à détecter. Les électrophorèses ont été réalisées dans la solution de migration (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% SDS, pH 8,3). Les protéines ont migré à 60V dans le gel de concentration et à 80V dans le gel de séparation. Elles ont ensuite été transférées sur des membranes de nitrocellulose 0,45 µm (Invitrogen, France) dans la solution de transfert (25 mM Tris Base, 192 mM glycine, 20% isopropanol) à 600 mA et +4°C, pendant 1-2h selon leur masse moléculaire.

La détection des protéines sur les membranes est réalisée de manière spécifique à chaque anticorps primaire utilisé. Les protocoles d'hybridation sont détaillés dans le tableau suivant (Tableau 6). Les anticorps sont incubés sous agitation.

Tableau 6. Protocoles d'hybridation des différents anticorps primaires.

| Gel, % d'acrylamide | SDS-PAGE, 12% | SDS-PAGE, 12% | SDS-PAGE, 15% | SDS-PAGE, 15% |
|-----------------------------|---|--|--|---|
| Transfert | 1h15 | 1h15 | 1h15 | 1h |
| Saturation | 1h à RT en TBS 1X - Tween20 0,1% - lait 5% | 1h à RT en TBS 1X - Tween20 0,1% - lait 5% | 1h à RT en PBS-lait 3% | 1h à RT en PBS-lait 3% |
| Anticorps primaire | Akt total Dilué au 1/1 000 en TBS - Tween20 0,1% - BSA 5% ON à +4°C | pAkt(Ser473) Dilué au 1/200 en TBS - Tween20 0,1% - BSA 5% ON à +4°C | ERK total Dilué au 1/500 en PBS 1X - lait 3% ON à +4°C | PLN Dilué au 1/200 en PBS 1X - BSA 3% 2h à RT |
| Anticorps secondaire | Chèvre anti-lapin Dilué au 1/1 000 en TBS 1X - Tween20 0,1% - lait 5% | Chèvre anti-lapin Dilué au 1/1 000 en TBS 1X - Tween20 0,1% - lait 5% | Chèvre anti-lapin Dilué au 1/1 000 en PBS 1X - lait 3% | Chèvre anti-souris Dilué au 1/1 000 en PBS 1X - lait 3% |
| Révélation | Kit Millipore | Kit Millipore | Kit Millipore | Kit Millipore |

| Gel, % d'acrylamide | SDS-PAGE, 15% | SDS-PAGE, 5% | SDS-PAGE, 5% | SDS-PAGE, 15% |
|-----------------------------|--|--|--|--|
| Transfert | 1h | 2h | 2h | 1h |
| Saturation | 1h à RT en PBS-lait 3% | 1h à RT en PBS-lait 3% | 1h à RT en PBS-lait 3% | 1h à RT en PBS-lait 3% |
| Anticorps primaire | FKBP12 Dilué au 1/1 000 en PBS 1X - BSA 3% ON à +4°C | Ca_v 1.3(α_{1D}) Dilué au 1/500 en PBS 1X - BSA 3% ON à +4°C | MHC Dilué au 1/4 000 en PBS 1X - lait 3% 2h à RT | cTNNI Dilué au 1/5 000 en PBS 1X - lait 3% 2h à RT |
| Anticorps secondaire | Chèvre anti-lapin Dilué au 1/1 000 en PBS 1X - lait 3% | Chèvre anti-lapin Dilué au 1/1 000 en PBS 1X - lait 3% | Chèvre anti-souris Dilué au 1/1 000 en PBS 1X - lait 3% | Chèvre anti-souris Dilué au 1/1 000 en PBS 1X - lait 3% |
| Révélation | Kit Millipore | Kit Millipore | Kit Pierce | Kit Pierce |

Les anticorps primaires sont les suivants :

- Anticorps polyclonal anti-Akt (Cell Signaling, France), reconnaît les isoformes Akt1, Akt2 et Akt3, de masse moléculaire 60 kDa ;
- Anticorps polyclonal anti-pAkt(Ser473) (Cell Signaling, France), reconnaît les isoformes Akt1, Akt2 et Akt3 phosphorylées sur la sérine 473, de masse moléculaire 60 kDa ;
- Anticorps polyclonal anti-ERK1 (Santa Cruz, France), reconnaît ERK1, de masse moléculaire 44 kDa mais aussi ERK2, de masse moléculaire 42 kDa ;
- Anticorps monoclonal anti-PLN (Affinity BioReagents, France), reconnaît la forme monomérique, de masse moléculaire 5 kDa, et la forme pentamérique, de masse moléculaire 25 kDa ;
- Anticorps polyclonal anti-FKBP12 (Affinity BioReagents, France), reconnaît l'isoforme FKBP12, de masse moléculaire 12 kDa ;

- Anticorps polyclonal anti-Ca_v1.3(α_{1D}) (Alomone Labs, France), reconnaît l'isoforme α_{1D} du canal calcique voltage-dépendant de type L, de masse moléculaire 250 kDa ;
- Anticorps monoclonal anti-myosine (clone NOQ7.5.4D, Sigma Aldrich, France), reconnaît les chaînes lourdes de la myosine lente de muscle squelettique, de masse moléculaire 200 kDa ;
- Anticorps monoclonal anti-troponine I (Millipore, France), reconnaît la troponine I cardiaque et squelettique, de masse moléculaire 25 kDa.

Les anticorps secondaires polyclonaux chèvre anti-Ig de souris ou anti-Ig de lapin, couplés à l'HRP (DakoCytomation, France), sont dilués au 1/1 000 et hybridés sur les membranes pendant 1h à température ambiante et sous agitation. L'activité de l'HRP est ensuite détectée par chimiluminescence, soit avec la solution SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, France), soit avec la solution Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, France), et l'appareil ChemiImager™ 5500 (Alpha Innotech, France).

d. Immunoblot α -tubuline

La détection de la protéine α -tubuline (masse moléculaire 50 kDa) a été réalisée sur toutes les membranes afin d'obtenir un témoin de charge. Les membranes ont été saturées dans une solution PBS 1X – Tween20 0,1% – lait 5% (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk, BioRad, France) pendant 1h à température ambiante. Puis elles ont été incubées avec l'anticorps monoclonal anti- α -tubuline (clone B-5-1-2, Sigma Aldrich, France) dilué au 1/2 000 en PBS 1X – Tween20 0,1% – lait 5%, pendant 2h à RT. Les membranes ont été lavées avec une solution de PBS 1X – Tween20 0,1%, puis incubées avec l'anticorps secondaire anti-Ig de souris couplé à l'HRP (DakoCytomation, France) diluée au 1/1 000 en PBS 1X – Tween20 0,1% – lait 5% pendant 1h à température ambiante. L'activité de l'HRP est ensuite détectée par chimiluminescence (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, France) et l'appareil ChemiImager™ 5500 (Alpha Innotech, France).

e. Quantification de l'intensité des bandes de protéines sur membranes

Pour la protéine RyR2, la quantification de l'intensité des bandes de protéines sur membranes a été réalisée avec le logiciel Quantity One (BioRad, France). Pour toutes les autres protéines, elle a été réalisée avec le logiciel ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Le ratio protéine/ α -tubuline a été calculé pour chaque échantillon puis les moyennes et écarts-types ont été calculés pour chaque groupe de hamsters. Les quantités de protéines ont été exprimées en pourcentage du groupe Sains.

G-Physiologie

1) Cathétérisme cardiaque

Les mesures des pressions et des volumes ont été réalisées par cathétérisme ventriculaire gauche sur des hamsters anesthésiés avec le mélange KXM, 35 jours après la mise en place des pompes osmotiques ou les injections de plasmide. Le cathéter de conductance (MPCU-200, Millar) a été introduit dans le ventricule gauche par la carotide droite, *via* l'aorte descendante. Les mesures de la fonction cardiaque ont été faites à l'état de base sans stimulation et après s'être assuré d'un équilibre hémodynamique. La conductance parallèle est mesurée après injection d'un bolus de sérum physiologique.

Les courbes pression – volume ont été établies en faisant varier la pré-charge, par compression de la veine cave inférieure au niveau du foie. La représentation d'une courbe pression – volume théorique est indiquée sur la figure suivante (Figure 31).

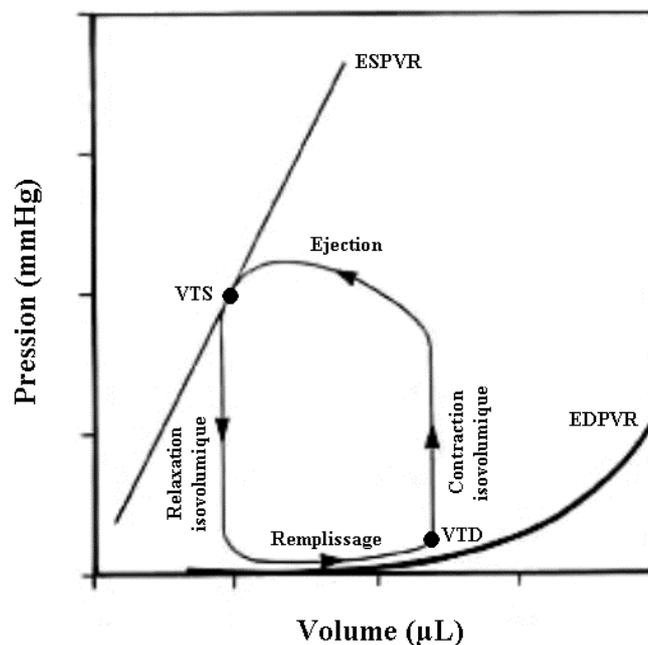


Figure 31. Courbe pression - volume(PV). La courbe PV représente le cycle ventriculaire gauche avec une phase contraction isovolumique suivie d'une phase d'éjection (systole) puis une phase de relaxation isovolumique et de remplissage (diastole). La courbe EDPVR représente la relation entre la pression et le volume en fin de diastole et la droite ESPVR, celle en fin de systole. VTD = Volume Télé-Diastolique, VTS = Volume Télé-Systolique, EDPVR = End Diastolic Pressure Volume Relationship et ESPVR = End Systolic Pressure Volume Relationship.

La droite de relation entre la pression et le volume en fin de systole (ESPVR, pour End Systolic Pressure Volume Relationship) est obtenue en reliant tous les points correspondants

aux volumes de fin de systole (VTS). Sa pente reflète l'inotropisme ventriculaire. De même, la courbe de relation entre la pression et le volume en fin de diastole (EDPVR, pour End Diastolic Pressure Volume Relationship) est obtenue en reliant tous les points correspondants aux volumes de fin de diastole (VTD) et sa pente reflète la compliance de la paroi du ventricule gauche au remplissage.

2) Echocardiographie

Les échocardiographies transthoraciques ont été réalisées chez les hamsters avec un appareil à ultrason Acuson 128XP/10 et une sonde linéaire Acuson 10 MHz (Mountain View, CA, USA). Les hamsters ont été légèrement anesthésiés par injection intrapéritonéale de mélange KXM. Les paramètres ventriculaires gauches ont été obtenus à partir d'enregistrements en M-mode. Les épaisseurs du septum inter-ventriculaire et de la paroi postérieure en diastole ainsi que les diamètres ventriculaires gauches de fin de diastole (DVG_{fd}) et de fin de systole (DVG_{fs}) ont été calculés en faisant une moyenne sur au moins trois cycles cardiaques séparés. En se basant sur les résultats obtenus pour les paramètres DVG_{fd} et DVG_{fs} , la fraction de raccourcissement (FR) a été calculée de la manière suivante : $(DVG_{fd} - DVG_{fs})/DVG_{fd} \times 100$.

3) Electrocardiogramme

Des enregistrements à long terme d'électrocardiogrammes (ECG) par télémétrie ambulatoire ont été réalisés chez les hamsters au moyen de transmetteurs implantables (TA10-ETA-F20, Data Sciences International, USA). L'instrumentation des animaux a été réalisée sous anesthésie par injection intrapéritonéale du mélange KXM. Un traitement antibioprophyllactique par injection sous-cutanée d'ampicilline (100 mg/kg) a été pratiqué. Les électrodes ECG ont été implantées en dérivation DII. Les électrodes ECG implantables ont été suturées sur les muscles intercostaux et les transmetteurs ont été insérés en sous-cutané dans la région dorsale. Les animaux ont ensuite été placés dans des cages posées sur un récepteur (RPC-1, Data Sciences International, USA), permettant de transmettre les signaux ECG à un ordinateur. L'analyse des signaux ECG a été réalisée avec le logiciel Dataquest™ A.R.T™ (Data Sciences International, USA). Les tracés ECG télémétriques ont été obtenus chez des animaux conscients et non contraints pendant les périodes de repos au cours de la journée. Des enregistrements ont été effectués pendant 1 min et répétés toutes les 10 min et ont permis l'analyse des intervalles RR. L'analyse spécifique des données a été faite avec un logiciel dédié (ECGAuto™, EMKA Technologies, France). Les intervalles RR ont été analysés statistiquement, au moyen de leurs moyennes et écarts types, et graphiquement à l'aide d'un diagramme de Poincaré standard, qui permet de représenter la variation de l'intervalle RR en fonction de l'intervalle suivant RR+1.

L'ECG est la représentation graphique du potentiel électrique qui commande l'activité musculaire du cœur. Il est composé d'un enchaînement continu d'ondes, appelées onde P, onde ou complexe QRS et onde T. L'onde P correspond à la dépolarisation des oreillettes (contraction des oreillettes), le complexe QRS représente la dépolarisation des ventricules et l'onde T, la repolarisation des ventricules (relaxation des ventricules). L'ensemble PQRST constitue le complexe d'excitation et de repolarisation. Ci-après est représenté une partie de l'électrocardiogramme d'un hamster sain (Figure 32).

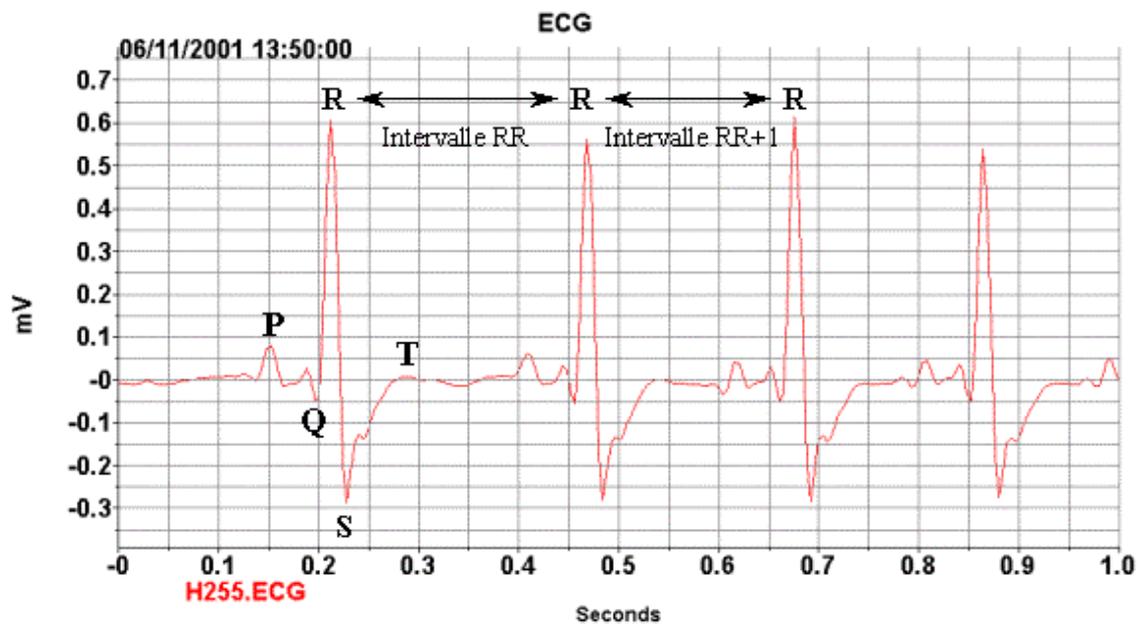


Figure 32. Electrocardiogramme chez le hamster. Représentation graphique de la variation de la durée des cycles cardiaques (intervalle RR) en fonction de celle du cycle suivant (intervalle RR+1) chez un hamster sain. P = dépolarisation auriculaire, PQ = conduction auriculo-ventriculaire, QRS = dépolarisation ventriculaire, T = repolarisation ventriculaire.

H-Statistiques

Les résultats morphométriques et fonctionnels sont indiqués par leurs moyennes assorties de leurs écart-types. Les résultats de mesure de la fibrose sont exprimés en pourcentage de fibrose par rapport à la surface totale de la coupe. Les résultats de quantification des niveaux de cDNA sont indiqués par leurs médianes associées à leurs écart-types et ceux de quantification des niveaux de protéines sont indiqués par leurs moyennes associées à leurs écart-types.

Les données expérimentales ont été analysées par paires entre les groupes contrôles (Sains et Sham) et traités avec la protéine ou le plasmide.

Pour les protocoles A et D, la signification statistique entre deux mesures a été déterminée grâce à un test d'ANOVA, à l'aide du logiciel Stat View (SAS Institute, USA). Les valeurs de p inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives.

Pour le protocole B, la signification statistique des quantifications d'ADNc et de protéines entre les différents groupes a été mesurée par un test d'ANOVA, à l'aide du logiciel Sigma Stat (Systat Software Inc., USA). Les valeurs de p inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives.

Pour le protocole C, l'analyse de Kaplan-Meier sur la survie a été réalisée en utilisant un test de log-rank. La signification statistique entre deux mesures macroscopiques ou fonctionnelles a été déterminée grâce à un test de Mann-Whitney, à l'aide du logiciel Stat View (SAS Institute, USA). Les valeurs de p inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives.

RESULTATS

A- Caractérisation de la lignée de hamsters CHF147

Le déficit génétique des hamsters de la lignée CHF147 consiste en une absence de δ -sarcoglycane qui peut être visualisée par immunomarquages sur coupes de cœurs (Figure 33). La détection du δ -sarcoglycane sur une coupe de cœur de hamster Syrien sauvage permet d'observer un marquage régulier de la protéine au niveau du sarcolemme (a). A l'inverse, sur une coupe de cœur de hamster Syrien CHF147, le δ -sarcoglycane est totalement absent (b).

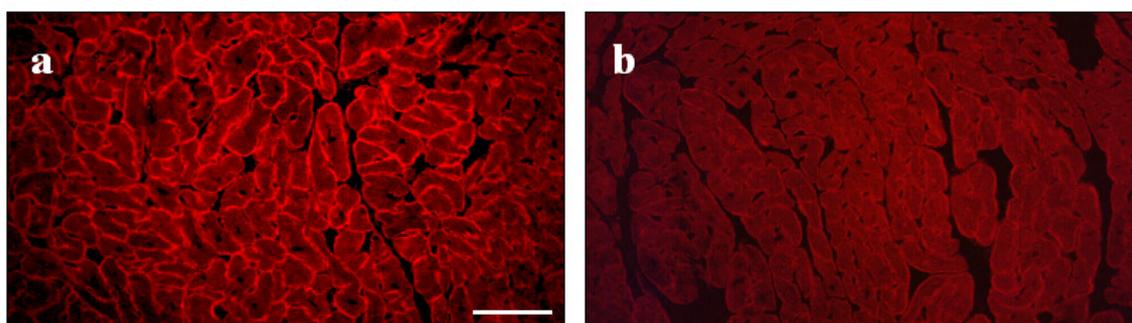


Figure 33. Immunomarquages du δ -sarcoglycane sur des coupes de cœurs de hamsters Syriens sauvages (a) et CHF147 (b). Grossissement 40x, échelle = 50 μ m.

Le déficit en δ -sarcoglycane dans le cœur entraîne une modification de la structure du sarcolemme qui est à l'origine de l'atteinte cardiaque associée à la dystrophie musculaire observée chez les hamsters CHF147.

Cette atteinte cardiaque évolue progressivement vers un stade d'insuffisance cardiaque, entraînant une mort précoce des animaux de cette lignée, comme le montre l'étude de survie réalisée sur les populations de hamsters Syriens sauvages et CHF147, élevées au laboratoire (Figure 34). Les hamsters Syriens sauvages survivent entre 640 et 830 jours, avec en moyenne 50% de survie à 720 jours environ. Dans le cas des animaux de la lignée CHF147, la survie se situe entre 50 et 480 jours, avec en moyenne 50% de survie à 320 jours environ. Les hamsters de la lignée CHF147 vivent donc environ deux fois moins longtemps que ceux de la lignée sauvage.

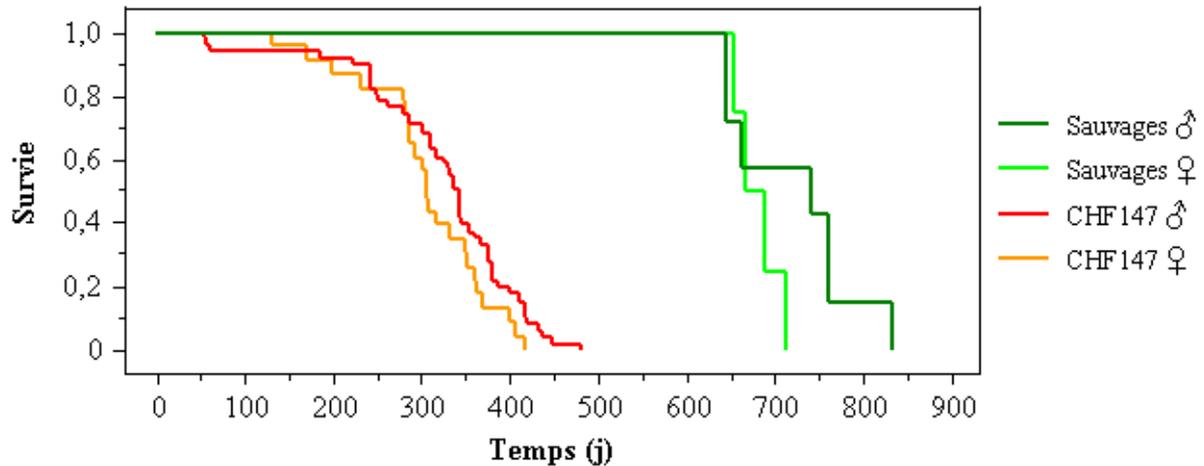


Figure 34. Courbes de Kaplan-Meier des populations de hamsters élevées à l'Institut de Myologie. La courbe de survie de la population de hamsters sauvages mâles (♂) est en vert foncé et celle des femelles (♀), en vert clair. La courbe de survie de la population de hamsters CHF147 mâles est en rouge et celle des femelles, en orange.

A l'autopsie, les hamsters CHF147 présentent un cœur dilaté contenant des lésions tissulaires visibles à l'œil nu, comme le montre la coupe de cœur entier ci-dessous, sur laquelle la fibrose myocardique est visible sous forme d'un anneau blanchâtre entourant le ventricule gauche (Figure 35).

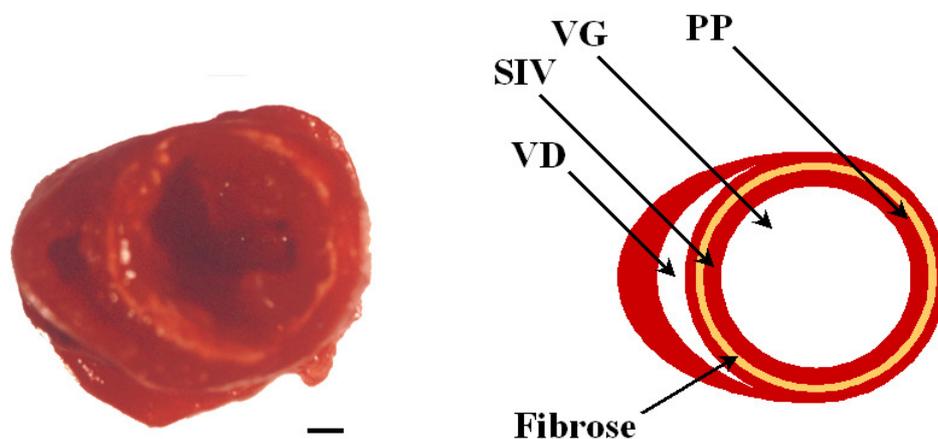


Figure 35. Lésion cardiaque chez les hamsters CHF147. A gauche, photo d'une coupe transversale de cœur entier d'un hamster CHF147, la fibrose, visible sous la forme d'un anneau blanchâtre, est localisée autour du ventricule gauche; grossissement 1x, échelle = 1 mm. A droite schéma du cœur, la fibrose est représentée par un cercle orangé à l'intérieur du muscle cardiaque. VD = ventricule droit, VG = ventricule gauche, SIV = septum inter-ventriculaire, PP = paroi postérieure.

La constitution de ces lésions tissulaires peut être étudiée de manière plus précise au moyen de colorations histologiques sur coupes de cœur sériées (Figure 36). La coloration hématoxyline-éosine (H&E) permet de visualiser la structure générale du tissu et montre des

zones de lésions entourées par du tissu cardiaque sain (a). La coloration de la succinyl déshydrogénase (SDH), qui met en évidence les mitochondries, est utilisée comme un indicateur de la viabilité tissulaire. Sur les coupes de cœurs de hamsters CHF147, l'absence de coloration de la SDH révèle que les lésions tissulaires sont nécrosées (b). De plus, les colorations au rouge Sirius (RS) (c) et au nitrate d'argent (d) montrent respectivement que ces régions nécrosées sont remplacées par de la fibrose, constituée de collagène, et des calcifications.

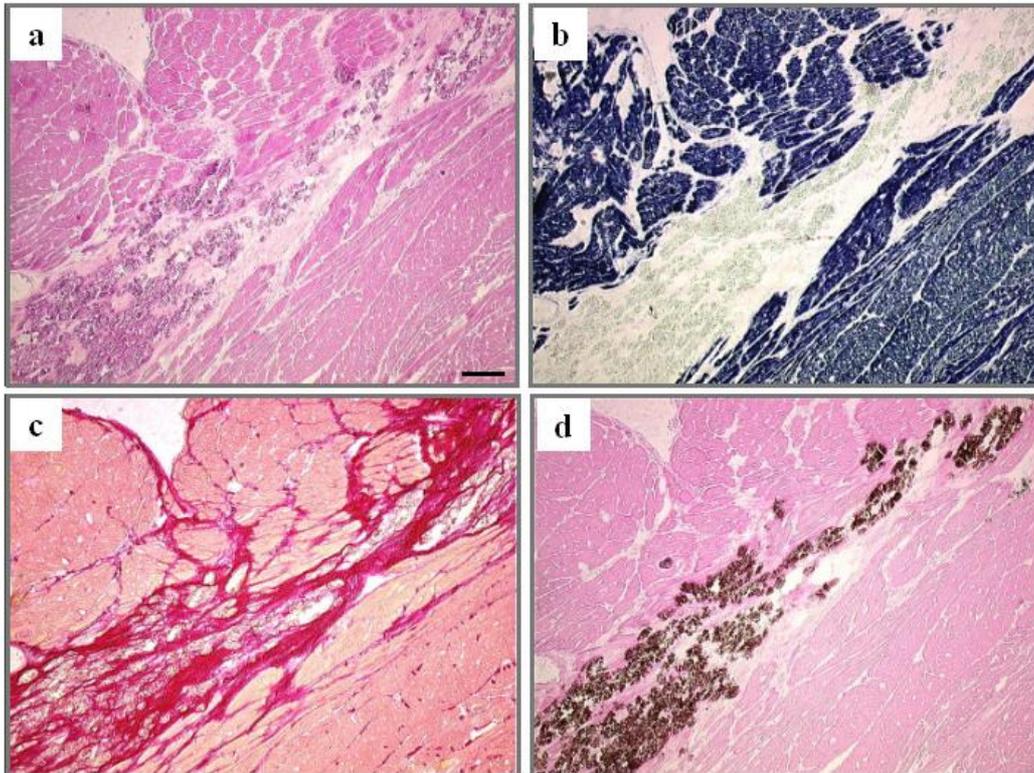


Figure 36. Lésions histologiques cardiaques chez le hamster CHF147. (a) La coloration hématoxyline-éosine (H&E) permet de visualiser la structure générale du tissu. (b) La coloration à la succinyl déshydrogénase (SDH) permet de mettre en évidence la nécrose. (c) La coloration au rouge Sirius (RS) permet de révéler la fibrose. (d) La coloration au nitrate d'argent permet de marquer les calcifications. Grossissement 10x, échelle = 100 μ m.

Chez les hamsters CHF147, tout comme chez l'Homme, les mécanismes moléculaires reliant le déficit génétique primaire à l'existence d'une cardiomyopathie dilatée, qui conduit à l'insuffisance cardiaque, ne sont pas encore élucidés. Cependant, sans corriger le déficit en δ -sarcoglycane, nous avons tenté, grâce à l'administration d'IGF-1, de ralentir l'évolution de l'atteinte cardiaque afin d'améliorer le pronostic vital des animaux.

B- Etude des effets à court terme d'un traitement court avec la protéine rhIGF-1 sur la CMD des hamsters CHF147

1) Choix de la dose de protéine délivrée

La protéine recombinante IGF-1 de hamster n'étant pas disponible, nous avons utilisé la protéine recombinante humaine, rhIGF-1, celle-ci ayant prouvé son efficacité thérapeutique dans de nombreux modèles animaux, y compris les rongeurs.

D'autre part, l'utilisation de doses importantes de rhIGF-1 en thérapeutique chez l'Homme est connue pour induire une acromégalie et des effets métaboliques "insulin-like". Nous avons donc choisi de délivrer une dose totale de rhIGF-1 comprise entre 20 et 30 µg afin d'éviter ces effets secondaires délétères.

2) Effets de la durée de délivrance de la protéine rhIGF-1

Deux durées de traitement, respectivement de 19 jours et 35 jours, par délivrance systémique de protéine recombinante rhIGF-1 ont été testées chez les hamsters CHF147. Les études macroscopiques, histologiques, immunohistochimiques et fonctionnelles réalisées chez les hamsters traités avec la protéine rhIGF-1 pendant 19 jours (animaux implantés avec des pompes Alzet® modèle 2002) ont montré des résultats similaires à ceux obtenus chez les hamsters traités avec la protéine rhIGF-1 pendant 35 jours (animaux implantés avec les pompes Alzet® modèle 2004). Ainsi, pour plus de clarté dans la présentation des résultats, seuls ceux obtenus chez les hamsters CHF147 après un traitement pendant 35 jours avec la protéine rhIGF-1 seront présentés dans cette partie.

3) Le traitement permet de préserver la morphologie cardiaque

a. Ralentissement de la dilatation cardiaque et épaissement des parois

Afin de mesurer les effets morphologiques du traitement par rhIGF-1 sur les hamsters CHF147, les poids corporels et cardiaques des animaux inclus dans les différents groupes, Sains, Non traités, Sham (A) et rhIGF-1 (A) ont été mesurés au moment du sacrifice. De même, les diamètres cardiaques, ainsi que les épaisseurs des parois, ont été mesurés sur coupes au cryostat. Les résultats sont reportés dans le tableau suivant (Tableau 7).

Tableau 7. Analyse macroscopique au moment du sacrifice chez des hamsters Sains, Non traités, Sham (A) et rhIGF-1 (A).

| n = | Sains 19 | CHF147 | | |
|--------------|--------------|------------------|---------------|------------------|
| | | Non traités 3 | Sham (A) 3 | rhIGF-1 (A) 7 |
| PV (mg) | 529,0 ± 93,1 | 505,9 ± 64,9 | 599,9 ± 26,7 | 597,0 ± 64,1 |
| PC (g) | 155,5 ± 17,5 | 101,7 ± 27,4 * | 141,6 ± 11,6 | 136,1 ± 16,3 *§ |
| PV/PC (mg/g) | 3,41 ± 0,56 | 5,09 ± 0,64 * | 4,25 ± 0,28 | 4,39 ± 0,23 *§ |
| D (mm) | 8,38 ± 0,36 | 10,36 ± 0,63 * | 10,49 ± 0,47 | 8,91 ± 0,48 *§† |
| PP (mm) | 1,92 ± 0,15 | 2,17 ± 0,34 | 2,21 ± 0,40 | 2,93 ± 0,25 *§† |
| SIV (mm) | 1,38 ± 0,32 | 1,62 ± 0,27 | 1,62 ± 0,28 | 2,12 ± 0,20 *§† |
| PP/SIV | 1,44 ± 0,27 | 1,34 ± 0,07 | 1,36 ± 0,06 | 1,39 ± 0,14 |

PV = poids ventriculaire, en mg; PC = poids corporel, en g; D = diamètre cardiaque, en mm; PP = paroi postérieure, en mm; SIV = septum inter-ventriculaire, en mm. Les mesures des diamètres et des parois ont été réalisées sur coupes de cœur. * p < 0,05 vs. groupe Sains, § p < 0,05 vs. groupe Non traités, † p < 0,05 vs. groupe Sham (A).

Par rapport aux données publiées en 2005, une analyse statistique plus approfondie, entre les groupes Sains, Non traités et Sham (A), a été réalisée à l'aide d'un test non paramétrique (test de Wilcoxon-Mann-Whitney) et d'un test paramétrique d'analyse de la variance (ANOVA). Cette étude a montré que les deux tests permettent d'obtenir les mêmes résultats statistiques et indique donc que les groupes Non traités et Sham (A) sont comparables. En effet, tout comme dans le groupe Non traités, le ratio PV/PC et le diamètre cardiaque sont significativement augmentés par rapport au groupe Sains, et les paramètres PP, SIV et le ratio PP/SIV ne sont pas différents du groupe de hamsters sauvages. Cependant, une différence est à noter. Alors que dans le groupe Non traités le poids corporel est significativement diminué et le poids des ventricules ne varie pas par rapport au groupe Sains, le groupe Sham (A) présente un profil inverse. Toutefois, ces différences conduisent à une augmentation significative du ratio PV/PC par rapport au groupe Sains dans les deux groupes de hamsters n'ayant pas reçu la protéine recombinante.

Tous les hamsters CHF147 ont un rapport PV/PC augmenté par rapport à celui du groupe de hamsters Sains. La différence est significative dans le cas des groupes Non traités et rhIGF-1 (A), ce qui est dû à une diminution significative des poids corporels par rapport au groupe Sains. Cependant, les hamsters du groupe rhIGF-1 (A) ont subi une perte de poids moins importante que ceux du groupe Non traités, les poids corporels moyens des animaux de ces deux groupes étant significativement différents.

De manière attendue, tous les groupes de hamsters CHF147 ont un diamètre cardiaque moyen augmenté par rapport à celui du groupe Sains. Mais, il faut souligner que le diamètre

cardiaque des hamsters du groupe traité avec la protéine rhIGF-1 est significativement diminué par rapport à celui des groupes Non traités et Sham (A), et qu'il est du même ordre de grandeur que celui du groupe Sains.

Les épaisseurs des parois cardiaques, c'est-à-dire la paroi postérieure (PP) et le septum inter-ventriculaire (SIV), ont également été mesurées sur coupes de cœurs et le rapport PP/SIV a été calculé. Les animaux traités avec la protéine rhIGF-1 ont un épaissement significatif de leurs parois cardiaques par rapport aux groupes contrôles, Sains, Non traités et Sham (A). De plus, cet épaissement est harmonieux étant donné que le rapport PP/SIV n'est pas différent de celui du groupe Sains. La délivrance systémique de protéine recombinante IGF-1 permet donc de maintenir une morphologie cardiaque équilibrée.

b. Préservation de la structure myocardique

L'absence de δ -sarcoglycane étant due à un défaut génétique chez les hamsters CHF147, il est attendu qu'un traitement par rhIGF-1 n'induit pas la ré-expression de la protéine manquante. En revanche, il est envisageable que le traitement par IGF-1 permette de ralentir la détérioration du complexe des protéines associées aux sarcoglycane et plus largement des protéines du cytosquelette. Nous avons donc étudié le cytosquelette non contractile, par immunomarquages de la dystrophine, et le cytosquelette contractile, par immunomarquages de la myosine sarcomérique et de la troponine I cardiaque.

L'immunomarquage de la dystrophine sur des coupes de cœurs de hamsters sains permet d'observer une localisation normale de la protéine au niveau de l'espace sous-sarcolemmal (a), tandis qu'elle est en partie perdue dans le groupe Non traités (b). Par contre, les coupes de cœurs des hamsters traités avec la protéine rhIGF-1 montrent une restauration partielle de la dystrophine, avec des zones positives et des zones négatives (c) (Figure 37).

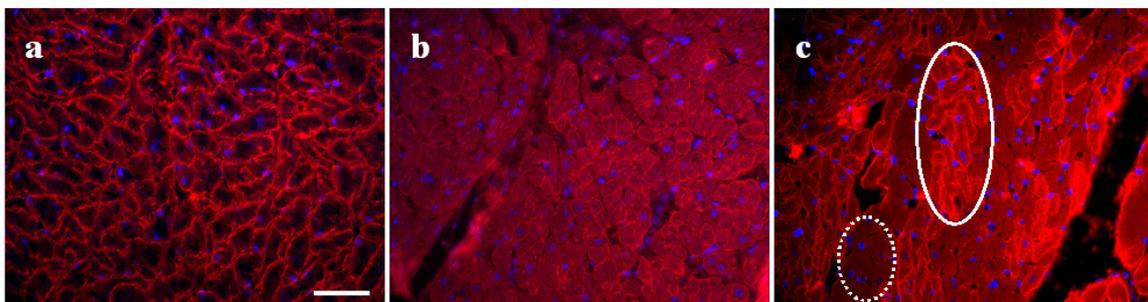


Figure 37. Altération du cytosquelette. Immunomarquage de la dystrophine (en rouge) sur des coupes de cœurs de hamsters Sains (a), Non traités (b) et traités avec la protéine rhIGF-1 (c). L'ellipse en trait plein délimite une zone positive et l'ellipse en pointillés, une zone négative. Les noyaux sont visualisés grâce à un marquage au DAPI (en bleu). Grossissement 40x, échelle = 50 μ m.

Tous les hamsters CHF147 présentent d'importantes lésions myocardiques localisées, telles que la nécrose, les calcifications ou encore la fibrose interstitielle. Des immunomarquages doubles, du collagène de type I avec la chaîne lourde de la myosine ou avec la troponine I cardiaque, ont permis de visualiser la structure du cytosquelette contractile et la fibrose myocardique (Figure 38). De manière intéressante, les résultats montrent qu'en dehors des lésions fibrotiques, le tissu cardiaque n'est pas désorganisé chez les hamsters du groupe traité (rhIGF-1 (A)) mais également chez les animaux du groupe Non traités. En effet, les profils de la myosine sarcomérique et de la troponine I cardiaque sur les coupes de cœurs des hamsters Non traités et rhIGF-1 (A) sont comparables à ceux observés sur les coupes de cœurs des hamsters Sains. Cependant, les cœurs des hamsters Non traités semblent posséder un contenu en collagène plus important que celui des hamsters du groupe rhIGF-1 (A), comme le montre la figure suivante.

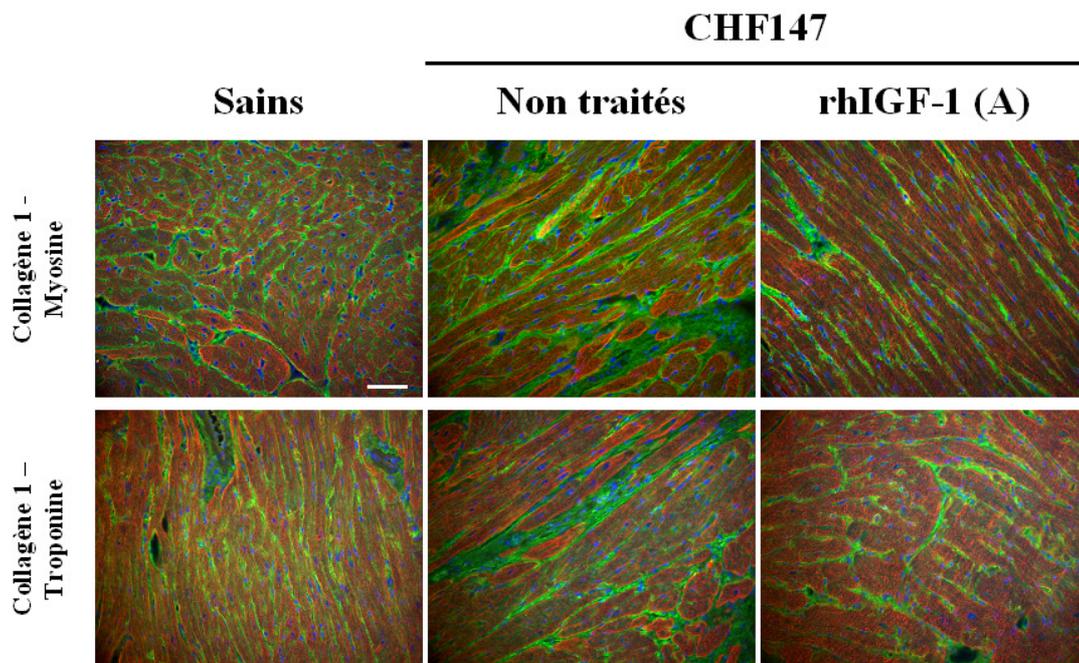


Figure 38. Structure myocardique. Doubles immunomarquages, sur coupes de cœurs de hamsters Sains, Non traités et rhIGF-1 (A), du collagène de type I (en vert) et de la myosine (en rouge), sur les photos du haut et du collagène de type I (en vert) et de la troponine (en rouge), sur les photos du bas. Les noyaux sont visualisés par un marquage au DAPI (en bleu). Grossissement 25x, échelle = 100 µm.

c. Ralentissement de l'extension de la fibrose

Afin de valider les observations précédentes concernant une diminution du contenu en collagène après traitement par rhIGF-1, une analyse plus précise de la fibrose a été réalisée, tout d'abord, par immunomarquage du collagène de type I (Figure 39). La coloration immunohistochimique de coupes de cœurs de hamsters révèle de larges dépôts de collagène

de type I dans les cœurs des hamsters CHF147 non traités (b) alors que ceux des hamsters sains ne contiennent pas de fibrose pathologique (a). Le marquage observé chez les hamsters sains correspond uniquement à la charge en collagène interstitiel physiologique. Dans le cas des hamsters du groupe rhIGF-1 (A), la cicatrice fibrotique semble moins importante que chez les hamsters Non traités (c).

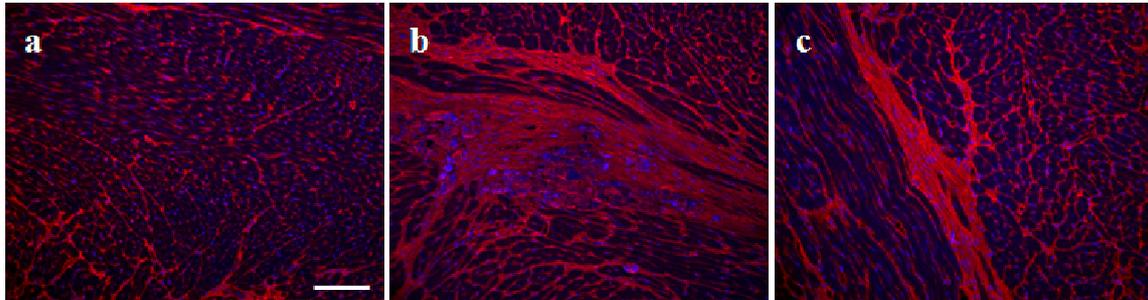


Figure 39. Analyse immunohistochimique de la fibrose, par immunomarquage du collagène de type I (en rouge) sur coupes de cœurs de hamsters Sains (a), Non traités (b) et rhIGF-1 (A) (c). Les noyaux sont visualisés par un marquage au DAPI (en bleu). Grossissement 16x, échelle = 100 μ m.

L'étendue de la fibrose a ensuite été analysée par coloration histologique au rouge Sirius (Figure 40). En accord avec les immunomarquages du collagène de type I, la coloration histologique au rouge Sirius sur les coupes de cœurs de hamsters Sains ne révèle pas de cicatrice de fibrose (a). A l'inverse, elle montre une fibrose pathologique étendue et essentiellement localisée dans la zone médiane du cœur située entre l'endocarde et l'épicarde sur les coupes de cœurs des hamsters Non traités (b). Après traitement des hamsters avec la protéine recombinante rhIGF-1, la cicatrice fibrotique semble plus limitée que celle retrouvée sur les coupes de cœurs de hamsters non traités (c).

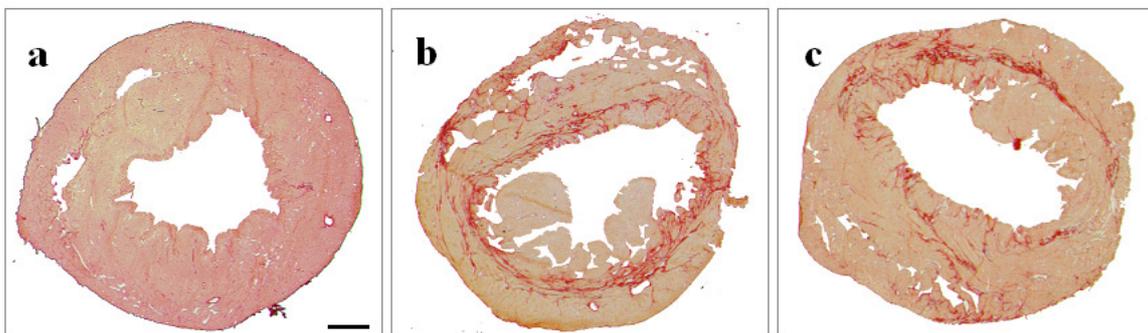


Figure 40. Analyse histologique de la fibrose myocardique, par coloration au rouge Sirius sur coupes de cœurs de hamsters Sains (a), Non traités (b) et traités avec rhIGF-1 (c); grossissement 1x, échelle = 1mm.

Enfin, l'étendue de la fibrose à été quantifiée par mesure de la surface des zones colorées par le rouge Sirius. Les résultats obtenus valident les observations réalisées

précédemment à partir des immunomarquages du collagène de type I et des colorations histologiques au rouge Sirius (Figure 41). Les cœurs des hamsters du groupe Sains contiennent une fibrose normale qui est faible ($0,98 \pm 1,41\%$). A l'inverse, les cœurs des hamsters du groupe Non traités contiennent une surface étendue recouverte par de la fibrose cicatricielle, celle-ci étant significativement plus importante que celle des hamsters du groupe Sains ($6,36 \pm 4,01\%$ et $0,98 \pm 1,41\%$, respectivement, avec $p < 0,05$). Dans le cas des hamsters du groupe rhIGF-1 (A), leurs coupes de cœurs montrent une étendue de la surface fibrotique significativement plus importante que celle des animaux du groupe Sains ($3,90 \pm 1,07\%$ et $0,98 \pm 1,41\%$, respectivement, avec $p < 0,05$). Par contre, bien que la différence ne soit pas significative, l'étendue de la fibrose sur les coupes de cœurs des hamsters du groupe rhIGF-1 (A) tend à diminuer par rapport à celle des hamsters du groupe Non traités ($3,90 \pm 1,07\%$ et $6,36 \pm 4,01\%$, respectivement).

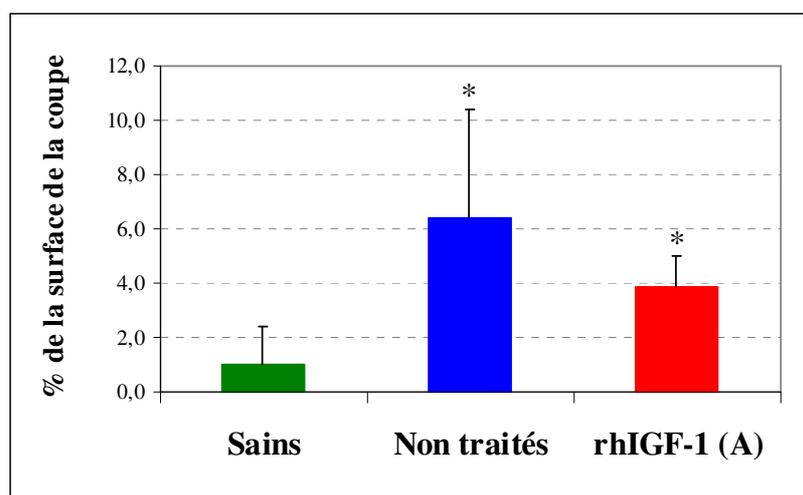


Figure 41. Quantification de la fibrose myocardique, en pourcentage de la surface totale des coupes de cœurs; * $p < 0,05$ vs. groupe Sains.

4) Analyse fonctionnelle des effets du traitement par rhIGF-1

Afin de mesurer les effets du traitement par délivrance systémique de protéine recombinante rhIGF-1 sur la fonction cardiaque, des mesures de pressions et de volumes cardiaques ont été réalisées par cathétérisme cardiaque au repos chez des animaux des groupes Sains, Non traités, Sham (A) et rhIGF-1 (A). Les résultats sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 8).

Tableau 8. Fonction cardiaque après traitement par la protéine rhIGF-1.

| | Sains | CHF147 | | |
|-------------------------------------|--------------|---------------|-------------|-----------------|
| | | Non traités | Sham (A) | rhIGF-1 (A) |
| n = | 7 | 3 | 3 | 7 |
| P_{fs} (mmHg) | 90 ± 11 | 60 ± 7 * | 71 ± 8 | 73 ± 11 * |
| P_{fd} (mmHg) | 3 ± 4 | 17 ± 4 * | 21 ± 5 | 14 ± 5 * |
| V_{fd} (μL) | 20,4 ± 4,8 | 24,9 ± 9,8 | 32,9 ± 1,7 | 28,4 ± 5,9 * |
| VE (μL) | 4,9 ± 1,6 | 1,8 ± 0,4 * | 3,3 ± 0,3 § | 2,9 ± 0,6 *§ |
| DC (μL/min) | 1044 ± 482 | 431 ± 100 | 606 ± 137 | 617 ± 156 * |
| FC (bpm) | 215 ± 35 | 253 ± 63 | 169 ± 32 | 213 ± 39 |
| dp/dt_{max} (mmHg/s) | 5400 ± 1725 | 2492 ± 308 * | 2479 ± 602 | 3333 ± 410 *§† |
| dp/dt_{min} (mmHg/s) | -5528 ± 1722 | -2092 ± 247 * | -1966 ± 344 | -2796 ± 406 *§† |

P_{fs} = pression de fin de systole, en mmHg; P_{fd} = pression de fin de diastole, en mmHg; V_{fd} = volume de fin de diastole, en μL; VE = volume d'éjection, en μL; DC = débit cardiaque, en μL/min, FC = fréquence cardiaque, en bpm, dp/dt_{max} en mmHg/s, dp/dt_{min} en mmHg/s. * p < 0,05 vs. groupe Sains, § p < 0,05 vs. groupe Non traités, † p < 0,05 vs. groupe Sham (A).

a. Les hamsters CHF147 présentent des signes d'insuffisance cardiaque

A l'âge de 6 mois, les hamsters CHF147 ont une dilatation cardiaque évidente, ce qui est confirmé par une tendance du volume de fin de diastole (V_{fd}) à augmenter par rapport à celui de hamsters Sains. L'insuffisance cardiaque chez les hamsters CHF147 se manifeste par une diminution significative du volume d'éjection (VE) par rapport à celui des hamsters du groupe Sains. De plus, la fréquence cardiaque (FC) tend à augmenter et le débit cardiaque (DC) diminue chez les hamsters CHF147, bien que les différences ne soient pas significatives avec le groupe Sains. Enfin, la contractilité cardiaque, mesurée par dp/dt_{max}, est significativement diminuée chez les hamsters CHF147 Non traités.

b. Le traitement par rhIGF-1 préserve la fonction cardiaque

Dans le groupe rhIGF-1 (A), le volume de fin de diastole des animaux est moins augmenté par rapport au groupe Sains que celui du groupe Sham (A). Le volume d'éjection et le débit cardiaque des hamsters du groupe rhIGF-1 (A) sont moins détériorés, ce qui est confirmé par une moindre augmentation de la pression de fin de diastole par rapport au groupe Sham (A). De plus, le traitement par la protéine recombinante rhIGF-1 permet de préserver la contractilité et la relaxation cardiaque, ce qui se traduit par une augmentation significative de ces paramètres dans le groupe rhIGF-1 (A) par rapport aux groupes Non traités et Sham (A).

En conclusion, la délivrance systémique de la protéine rhIGF-1 pendant un temps court a des effets bénéfiques à court terme sur la cardiomyopathie dilatée du hamster CHF147. Les principaux effets observés sont un ralentissement de la dilatation cardiaque, une préservation de la structure myocardique, un ralentissement de l'extension de la fibrose cicatricielle ainsi qu'une préservation de la fonction cardiaque.

C-Etude des voies de signalisations moléculaires impliquées dans l'induction des effets bénéfiques observés après traitement par rhIGF-1

1) Effets du traitement sur les voies de signalisation d'IGF-1

a. Etude de l'expression des ARNm des voies MAPK et PI3K

Afin de savoir si le phénomène compensatoire induit par l'administration de protéine recombinante rhIGF-1 est de type hypertrophique, les effets de celui-ci sur la transcription de gènes impliqués dans les voies de signalisation de l'IGF-1, c'est-à-dire la voie des MAPK et celle de la PI3K, ont été mesurés par quantification de leurs ADNc. Les gènes du récepteur de l'IGF-1 (R-IGF1) ainsi que de celui du substrat du récepteur de l'insuline (IRS-1), qui sont communs aux deux voies de signalisation ont été quantifiés. En ce qui concerne la voie des MAPK, le gène quantifié est celui de l'Extracellular-Regulated Kinase (ERK) et dans le cas de la voie de la PI3K, les gènes quantifiés sont d'une part, celui de la sous-unité catalytique p110 α de la PI3K (PI3Kp110 α), et d'autre part, celui d'Akt. L'expression des gènes pour les groupes Sham (B) et rhIGF-1 (B) a été normalisée par rapport à celle d'un hamster du groupe Sains. Les résultats sont représentés sur le graphique ci-après (Figure 42).

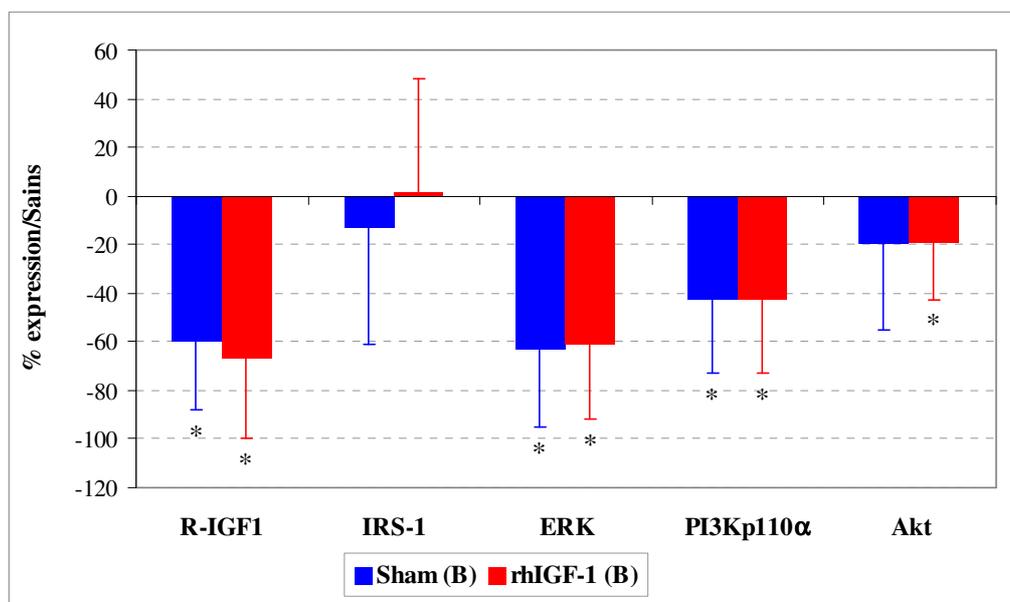


Figure 42. Expression des ARNm des gènes des voies de signalisation de l'IGF-1. Les niveaux d'expression des ARNm sont donnés en pourcentages de ceux du hamster du groupe Sains, qui sont fixés à 0. Les niveaux d'expression (en médianes \pm écart-types) du groupe Sham (B) sont représentés en bleu et ceux du groupe rhIGF-1 (B), en rouge. * = $p < 0,05$ vs. groupe Sains.

Le gène R-IGF1 est significativement sous-exprimé chez les hamsters CHF147, traités ou non avec rhIGF-1, par rapport à un hamster sain ($-60 \pm 28\%$ pour le groupe Sham (B) et $-67 \pm 33\%$ pour le groupe rhIGF-1 (B), avec $p < 0,05$ vs. Sains). Il en est de même pour les gènes ERK ($-63 \pm 32\%$ et $-61 \pm 31\%$, pour les groupes Sham (B) et rhIGF-1 (B), respectivement, avec $p < 0,05$ vs. Sains) et PI3Kp110 α ($-43 \pm 30\%$ pour les deux groupes Sham (B) et rhIGF-1 (B), avec $p < 0,05$ vs. Sains). Dans le cas du gène Akt, seule l'expression dans le groupe rhIGF-1 (B) est significativement diminuée par rapport à celle du hamster sain, ce qui est probablement dû à un écart-type plus important dans le groupe Sham (B) ($-20 \pm 35\%$ et $-19 \pm 24\%$, pour les groupes Sham (B) et rhIGF-1 (B), respectivement). Le gène IRS-1 est le seul pour lequel les hamsters CHF147 présentent un niveau d'expression normal par rapport à un hamster sain ($-13 \pm 48\%$ et $2 \pm 46\%$, pour les groupes Sham (B) et rhIGF-1 (B), respectivement, avec p non significatif).

Il faut de plus noter que les niveaux d'expression des gènes des voies de signalisation de l'IGF-1 ne sont pas modifiés après traitement par rhIGF-1, étant donné que le groupe rhIGF-1 (B) ne présente pas de différence significative par rapport au groupe Sham (B).

b. Etude de l'expression des protéines des voies MAPK et PI3K

Afin de mesurer les effets du traitement par délivrance systémique de rhIGF-1 au niveau traductionnel, les niveaux d'expression des protéines impliquées dans les voies de signalisation de l'IGF-1 ont été quantifiés par Western blots. Un exemple représentatif pour chaque protéine étudiée ainsi que les résultats des quantifications sont indiqués sur la figure suivante (Figure 43).

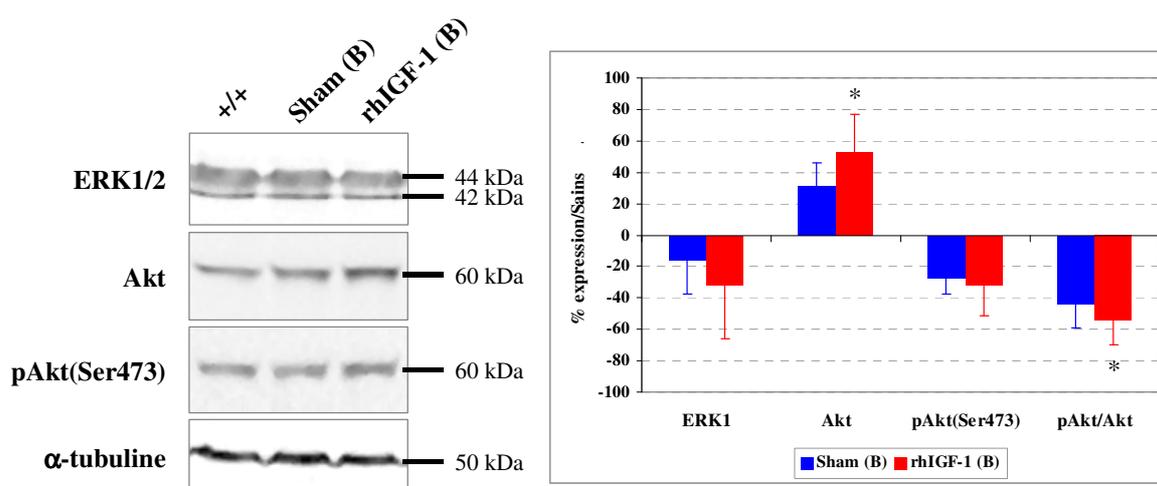


Figure 43. Expression des protéines impliquées dans les voies de signalisation de l'IGF-1. A gauche, exemple représentatif de Western blot pour chacune des protéines étudiées. A droite, quantification des niveaux d'expression protéiques, donnés en pourcentages de ceux du hamster du groupe Sains, qui sont fixés à 0. Les niveaux d'expression (en moyennes \pm écart-types) du groupe Sham (B) sont représentés en bleu et ceux du groupe rhIGF-1 (B), en rouge. * = $p < 0,05$ vs. groupe Sains.

En ce qui concerne la voie de signalisation des MAPK, les niveaux d'expression de la protéine ERK1 chez les hamsters CHF147, qu'ils soient traités ou non avec la protéine rhIGF-1, sont comparables à celui du hamster du groupe Sains ($-16 \pm 21\%$ pour le groupe Sham (B) et $-32 \pm 34\%$ pour le groupe rhIGF-1 (B)). Bien que le niveau d'expression de la forme phosphorylée d'ERK1 sur la tyrosine 204, correspondant à une des formes activées de la protéine, n'ait pas pu être quantifié, du fait de problèmes techniques d'immunoblot, il n'a pas semblé varier d'un groupe de hamsters à l'autre.

Dans le cas de la voie PI3K, le niveau d'expression d'Akt dans le groupe Sham (B) ($31 \pm 15\%$) n'est pas différent de celui du groupe Sains. Il en est de même pour une des formes activées d'Akt, phosphorylée au niveau de la sérine 473 ($-27 \pm 10\%$), ainsi que pour le ratio pAkt(Ser473)/Akt ($-44 \pm 15\%$). A l'inverse, dans le groupe rhIGF-1 (B), le niveau d'expression d'Akt est significativement augmenté par rapport à celui du groupe Sains ($53 \pm 24\%$, $p < 0,05$) alors que celui de pAkt(Ser473) ne varie pas ($-32 \pm 20\%$), ce qui conduit à une différence significative du ratio pAkt(Ser473)/Akt par rapport au groupe Sains ($-55 \pm 15\%$, $p < 0,05$).

Il est intéressant de remarquer que les niveaux d'expression des protéines étudiées dans les voies de signalisation d'IGF-1 ne sont pas modifiés par l'administration systémique d'une faible dose de protéine recombinante rhIGF-1.

Par ailleurs, certaines protéines des voies de signalisation des MAPK et de la PI3K, comme IRS-1 et sa forme phosphorylée activée, ou encore la sous-unité catalytique p110 α de la PI3K, n'ont pas pu être étudiées du fait de la limitation des outils actuellement disponibles. En effet, la plupart des anticorps disponibles ne permettent pas de reconnaître les protéines de hamster.

2) Effets du traitement par rhIGF-1 sur des constituants structurels des cardiomyocytes

a. Etude de l'expression des ARNm de la cTNNI et de la MHC

Etant donné que les hamsters traités avec la protéine recombinante ont une structure myocardique mieux préservée que les hamsters non traités, les niveaux d'expression des gènes de la troponine I cardiaque (cTNNI) et de la myosine (MHC), qui sont impliqués dans le maintien de la structure du myocarde, ont été quantifiés pour les deux groupes d'animaux. Les résultats sont représentés sur le diagramme suivant (Figure 44).

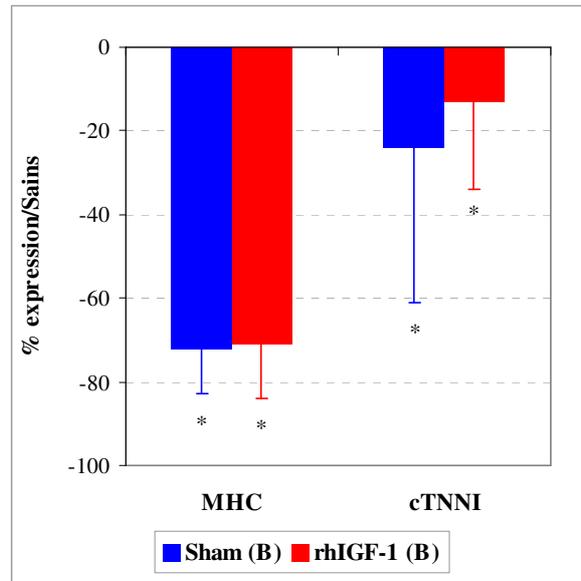


Figure 44. Expression des ARNm de gènes de structure. Les niveaux d'expression des ARNm sont donnés en pourcentages de ceux du hamster du groupe Sains, qui sont fixés à 0. Les niveaux d'expression (en médiane \pm écart-type) du groupe Sham (B) sont représentés en bleu et ceux du groupe rhIGF-1 (B), en rouge. * = $p < 0,05$ vs. groupe Sains.

Le gène MHC est fortement sous-exprimé chez les hamsters CHF147, qu'ils soient traités ou non avec la protéine recombinante, par rapport à un hamster sain ($-72 \pm 11\%$ et $-71 \pm 13\%$, pour les groupes Sham (B) et rhIGF-1 (B), respectivement, avec $p < 0,05$ vs. Sains). De même, le gène cTNNI est significativement sous-exprimé chez les hamsters CHF147 ($-24 \pm 37\%$ et $-13 \pm 21\%$, pour les groupes Sham (B) et rhIGF-1 (B), respectivement, avec $p < 0,05$ vs. Sains).

D'autre part, le traitement par rhIGF-1 ne modifie pas les niveaux d'expression de ces gènes, car les résultats du groupe rhIGF-1 (B) ne sont pas différents de ceux du groupe Sham (B).

b. Etude de l'expression protéique de la cTNNI et de la MHC

De même que pour l'étude des effets du traitement sur les voies de signalisation d'IGF-1, les niveaux d'expression de la troponine I cardiaque et de la myosine ont été quantifiés par Western blots. Un exemple représentatif pour chaque protéine étudiée ainsi que les résultats des quantifications sont indiqués sur la figure suivante (Figure 45).

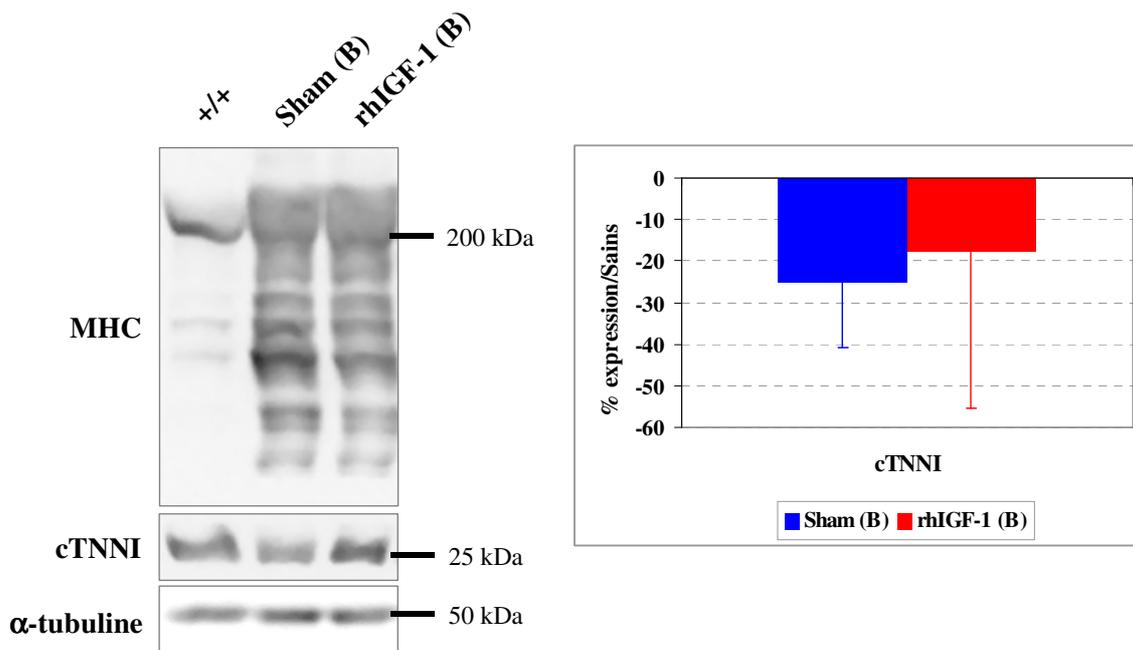


Figure 45. Expression des protéines impliquées dans la structure myocardique. A gauche, exemple représentatif de Western blot pour chacune des protéines étudiées. A droite, quantification des niveaux d'expression protéiques, donnés en pourcentages de ceux du hamster du groupe Sains, qui sont fixés à 0. Le niveau d'expression (en moyennes \pm écart-types) du groupe Sham (B) est représenté en bleu et celui du groupe rhIGF-1 (B), en rouge.

Comme le montre le profil de Western blot, les chaînes lourdes de la myosine cardiaque semble dégradées dans le modèle animal du hamster CHF147. Pour cette raison, les niveaux d'expression protéiques n'ont pas pu être quantifiés. Dans le cas de la troponine I cardiaque, les niveaux d'expression ne sont pas modifiés chez les hamsters CHF147 par rapport à celui du hamster sain ($-25 \pm 15\%$ et $-18 \pm 38\%$, pour les groupes Sham (B) et rhIGF-1 (B), respectivement).

De plus, le traitement des hamsters CHF147 par la protéine rhIGF-1 ne modifie pas les profils d'expression des protéines constitutrices de la structure myocardique étudiées.

3) Effets du traitement sur le cycle du calcium

a. Etude de l'expression des ARNm des gènes du cycle du calcium

L'étude des effets de l'administration de la protéine recombinante rhIGF-1 avait montré une augmentation significative de la contractilité et de la relaxation cardiaque chez les animaux traités par rapport aux animaux des groupes contrôles, semblant indiquer une modification de la régulation du calcium. Ainsi, les effets du traitement par rhIGF-1 sur l'expression des gènes impliqués dans la régulation du cycle du calcium ont été mesurés par

quantification des ADNc. Les résultats obtenus sont représentés sur le diagramme ci-dessous (Figure 46).

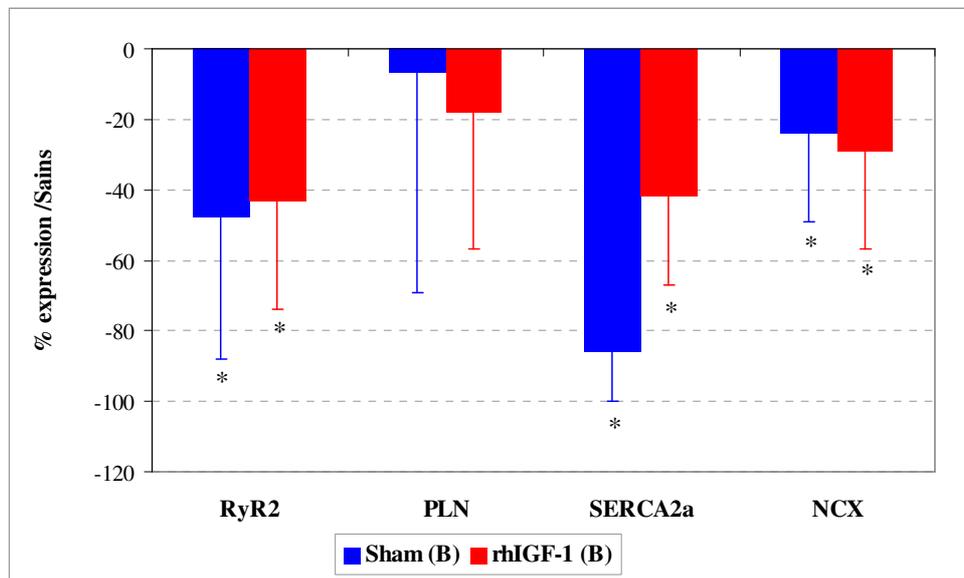


Figure 46. Expression des ARNm des gènes du cycle du calcium. Les niveaux d'expression des ARNm sont donnés en pourcentages de ceux du hamster du groupe Sains, qui sont fixés à 0. Les niveaux d'expression (en médianes \pm écart-types) du groupe Sham (B) sont en bleu et ceux du groupe rhIGF-1 (B), en rouge. * = $p < 0,05$ vs. groupe Sains.

Le gène du récepteur-2 de la ryanodine, RyR2, est significativement moins exprimé chez les hamsters CHF147 que chez le hamster sain ($-48 \pm 40\%$ et $-43 \pm 31\%$, pour les groupes Sham (B) et rhIGF-1 (B), respectivement, avec $p < 0,05$ vs. Sains). Cette diminution significative du niveau d'expression chez les hamsters CHF147 est également retrouvée pour le gène de l'ATPase du réticulum sarcoplasmique, SERCA2a ($-86 \pm 14\%$ et $-42 \pm 25\%$, pour les groupes Sham (B) et rhIGF-1 (B), respectivement, avec $p < 0,05$ vs. Sains) et de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, NCX ($-24 \pm 25\%$ et $-29 \pm 28\%$, pour les groupes Sham (B) et rhIGF-1 (B), respectivement, avec $p < 0,05$ vs. Sains). A l'inverse, le niveau d'expression du gène du phospholamban, PLN, ne semble pas varier chez les hamsters CHF147 par rapport au hamster sain ($-7 \pm 62\%$ pour le groupe Sham (B) et $-18 \pm 39\%$ pour le groupe rhIGF-1 (B)). Cependant, l'importance de l'écart-type pourrait masquer une diminution significative de l'expression de ce gène.

Il faut également remarquer que les hamsters CHF147 du groupe rhIGF-1 (B) ne voient pas leurs niveaux d'expression des gènes impliqués dans la régulation du calcium varier par rapport à ceux des hamsters du groupe Sham (B).

En outre, deux gènes importants dans la régulation du cycle du calcium n'ont pas pu être quantifiés, le gène du canal calcique voltage-dépendant de type L, car aucun des couples d'oligonucléotides testés n'a permis d'obtenir de produit d'amplification, et le gène de la

protéine régulatrice de RyR2, FKBP, car aucun des couples d'oligonucléotides testés n'a permis d'obtenir un produit d'amplification unique.

b. Etude de l'expression des protéines du cycle du calcium

Les niveaux d'expression des protéines régulatrices du calcium ont été quantifiés par Western blots. Un exemple représentatif pour chaque protéine étudiée ainsi que les résultats des quantifications sont indiqués sur la figure page suivante (Figure 47).

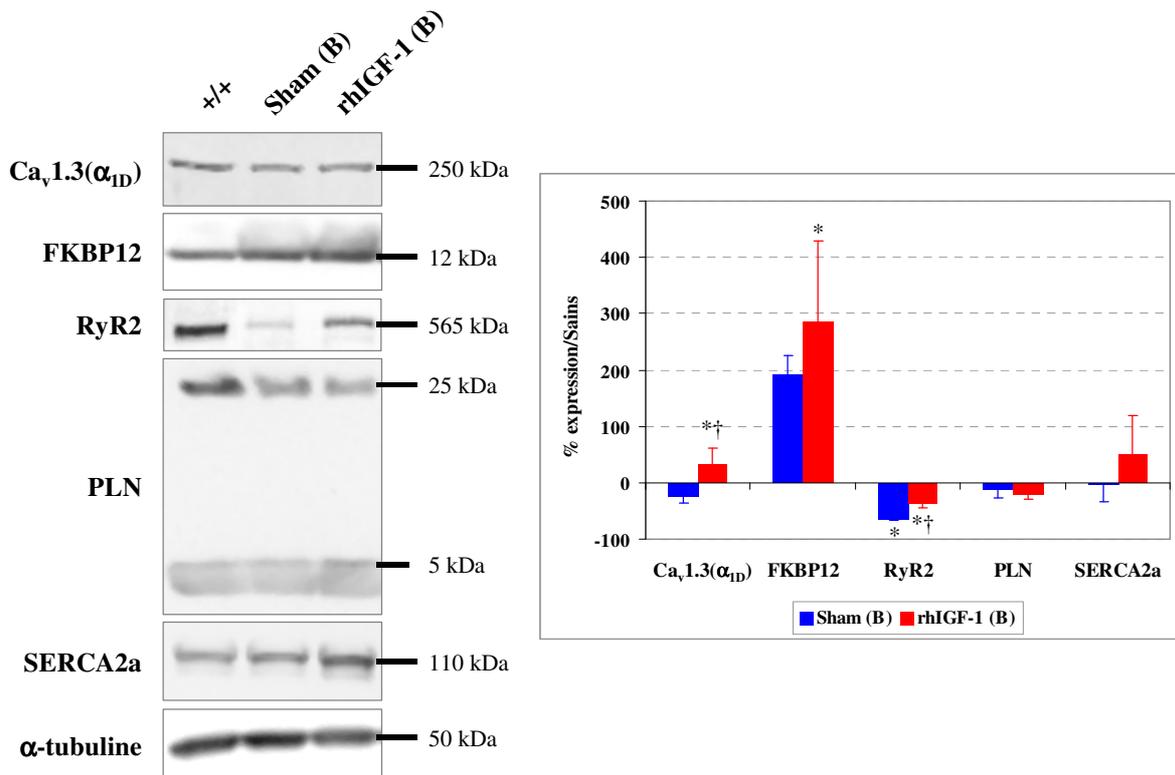


Figure 47. Expression des protéines impliquées dans le cycle du calcium. A gauche, exemple représentatif de Western blot pour chacune des protéines étudiées. A droite, quantification des niveaux d'expression protéiques, donnés en pourcentages de ceux du hamster du groupe Sains, qui sont fixés à 0. Les niveaux d'expression (en moyennes ± écart-types) du groupe Sham (B) sont représentés en bleu et ceux du groupe rhIGF-1 (B), en rouge. * = $p < 0,05$ vs. Sains, † = $p < 0,05$ vs. Sham (B).

Chez les hamsters CHF147 du groupe Sham (B), le niveau d'expression de la protéine du canal calcique voltage-dépendant de type L, Ca_v1.3(α_{1D}), n'est pas modifié par rapport à celui du hamster sain (-24 ± 11%), de même que celui de FKBP12 (193 ± 33%), de PLN (-11 ± 17%) et de SERCA2a (-4 ± 30%). A l'inverse, l'expression de la protéine RyR2 est significativement diminuée (-65 ± 3%).

Dans le cas des hamsters du groupe rhIGF-1 (B), ils présentent une augmentation significative du niveau d'expression de la protéine Ca_v1.3(α_{1D}) par rapport au hamster sain

($32 \pm 29\%$), ainsi que de celui de la protéine FKBP12 ($285 \pm 145\%$). L'expression de la protéine RyR2 est, quant à elle, significativement diminuée par rapport à celle du hamster sain ($-36 \pm 9\%$). Les protéines PLN et SERCA2a ne voient pas leurs niveaux d'expression modifiés ($-20 \pm 9\%$ et $51 \pm 67\%$, respectivement).

La comparaison des niveaux d'expression protéiques entre les groupes Sham (B) et rhIGF-1 (B) indique des différences significatives ($p < 0,05$) dans le cas des protéines $Ca_v1.3(\alpha_{1D})$ et RyR2. D'autre part, bien que la différence ne soit pas significative, il semble qu'il y ait une tendance à l'augmentation de la protéine SERCA2a dans le groupe traité par rhIGF-1 par rapport au groupe non traité.

Les niveaux d'expression de la protéine NCX et de la forme phosphorylée du phospholamban, pPLN(Ser16), n'ont pas pu être étudiés du fait du manque d'anticorps primaires permettant de détecter ces protéines chez le hamster.

En conclusion, le traitement par administration de protéine rhIGF-1 à faible dose chez les hamsters CHF147 n'a pas d'effet sur les niveaux d'expression des gènes et des protéines impliquées dans les voies de signalisation de l'IGF-1, ni ceux des constituants de la structure myocardique étudiés. Cependant, il modifie la régulation traductionnelle, mais pas la régulation transcriptionnelle, des gènes impliqués dans le cycle du calcium.

D-Etude des effets à long terme d'un traitement court avec la protéine rhIGF-1 sur la CMD des hamsters CHF147

1) La survie est améliorée après traitement par rhIGF-1

Une étude de survie a été réalisée dans le but d'évaluer les effets d'un traitement court par rhIGF-1 sur la survie des hamsters CHF147. Après l'implantation des pompes osmotiques, les hamsters du groupe Sham (C) et ceux du groupe rhIGF-1 (C) ont été suivis quotidiennement par observation générale de leur état et mesure hebdomadaire de leur poids corporel. La figure suivante montre les courbes de Kaplan-Meier obtenues en fin d'étude pour les animaux des deux groupes (Figure 48). Les hamsters du groupe rhIGF-1 (C) présentent une survie plus importante que celle des hamsters du groupe Sham (C). En effet, ces derniers ont survécu $405,00 \pm 24,18$ jours (min. 370 jours – max. 423 jours) alors que les hamsters du groupe rhIGF-1 (C) ont survécu $486,33 \pm 108,15$ jours (min. 307 jours – max. 608 jours). De plus, la différence de survie entre les deux groupes est très significative, car $p = 0,0075$, avec un test statistique de log-rank.

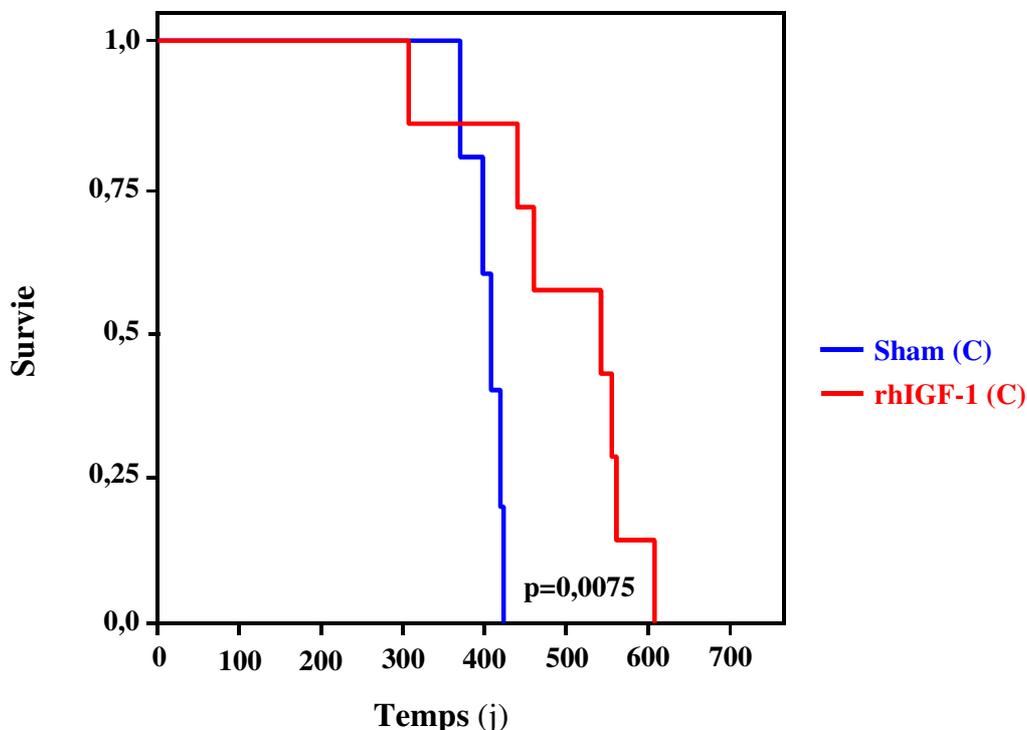


Figure 48. Effet d'un traitement court par rhIGF-1 sur la survie des hamsters CHF147. Courbes de Kaplan-Meier pour les groupes contrôle (Sham (C)) et traité avec la protéine rhIGF-1 (rhIGF-1 (C)). En bleu, la courbe de survie du groupe Sham (C) et en rouge, la courbe de survie du groupe rhIGF-1 (C). $p = 0,0075$ avec un test log-rank.

2) Le traitement par rhIGF-1 permet de préserver la fonction cardiaque

Afin de mesurer les effets du traitement court par rhIGF-1 sur la fonction cardiaque des hamsters CHF147 au cours de l'étude de survie, des échographies ont été pratiquées 1,5 mois et 3 mois après l'implantation des pompes osmotiques chez un hamster de chaque groupe. L'évolution des diamètres ventriculaires gauches en fin de diastole (DVG_{fd}) et en fin de systole (DVG_{fs}), ainsi que celle de la fraction de raccourcissement (FR) entre ces deux temps sont représentées sur la figure ci-dessous (Figure 49). La FR est calculée grâce à la formule suivante : $(DVG_{fd} - DVG_{fs})/DVG_{fd}$.

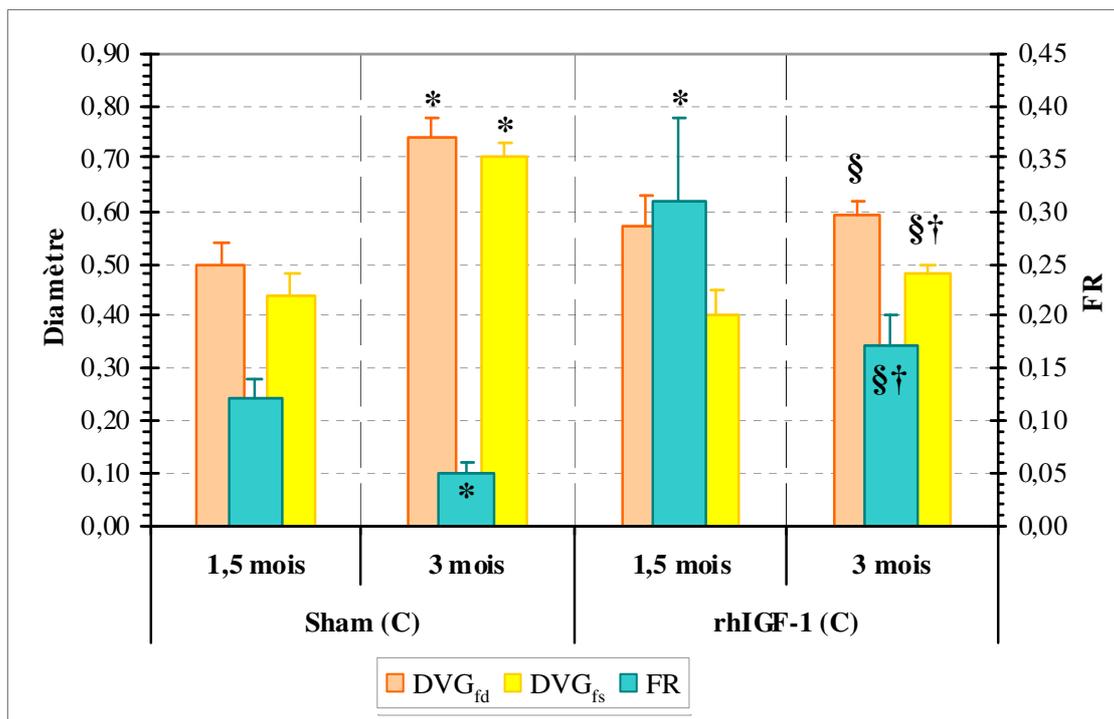


Figure 49. Préservation de la fonction cardiaque des hamsters CHF147 après traitement par rhIGF-1. Les diamètres sont indiqués en cm; les barres en orange représentent le diamètre du ventricule gauche en fin de diastole (DVG_{fd}), les barres en jaune celui en fin de systole (DVG_{fs}) et les barres en vert représentent la fraction de raccourcissement (FR). * $p < 0,05$ vs. groupe Sham (C) à 1,5 mois, § $p < 0,05$ vs. groupe Sham (C) à 3 mois et † $p < 0,05$ vs. groupe rhIGF-1 (C) à 1,5 mois.

Entre 1,5 mois et 3 mois après l'implantation des pompes, le cœur du hamster du groupe Sham (C) s'est significativement dilaté. En effet, son DVG_{fd} a augmenté entre ces deux temps ($0,50 \pm 0,04$ à 1,5 mois et $0,74 \pm 0,04$ à 3 mois, $p < 0,001$), de même que son DVG_{fs} ($0,44 \pm 0,04$ à 1,5 mois et $0,70 \pm 0,03$ à 3 mois, $p < 0,001$). Ces augmentations de diamètres sont corrélées à une diminution significative de la FR entre ces deux temps ($0,12 \pm 0,02$ et $0,05 \pm 0,01$ à 1,5 et 3 mois, respectivement, $p < 0,001$).

Les diamètres cardiaques du hamster traité avec la protéine rhIGF-1 sont également augmentés mais dans une moindre mesure par rapport à ceux du hamster Sham (C).

L'augmentation du DVG_{fd} n'est pas significative ($0,57 \pm 0,06$ à 1,5 mois et $0,59 \pm 0,03$ à 3 mois) et le DVG_{fs} est augmenté, mais de manière moins significative que celui du hamster Sham (C) ($0,40 \pm 0,05$ et $0,48 \pm 0,02$ à 1,5 et 3 mois, respectivement, $p = 0,007$). Ceci montre que l'évolution de la dilatation cardiaque est ralentie chez le hamster traité avec la protéine rhIGF-1.

De plus, 1,5 mois après l'implantation des pompes osmotiques, la FR du hamster rhIGF-1 (C) est 2,5 fois supérieure à celle du hamster Sham (C) ($0,31 \pm 0,08$ et $0,12 \pm 0,02$, respectivement, $p < 0,001$). Bien qu'elle soit significativement diminuée entre 1,5 et 3 mois ($0,31 \pm 0,08$ et $0,17 \pm 0,03$, respectivement, $p = 0,005$), la FR du hamster rhIGF-1 (C) à 3 mois est plus importante que celle du hamster Sham (C) à 1,5 mois ($0,17 \pm 0,03$ et $0,12 \pm 0,02$, respectivement, $p < 0,001$) et également à 3 mois ($0,17 \pm 0,03$ et $0,05 \pm 0,01$, respectivement, $p = 0,002$). Ainsi, le ralentissement de la dilatation cardiaque chez le hamster traité avec la protéine rhIGF-1 induit une préservation de la fonction cardiaque.

La variabilité du rythme cardiaque (VRC) a également été mesurée par électrocardiographie. Des enregistrements courts, par segments d'une minute toutes les 10 minutes, 24 heures par jour, ont été réalisés chez des hamsters CHF147, permettant ainsi une analyse des intervalles RR en fonction de l'intervalle suivant RR+1 pour chaque segment. Les hamsters Syriens sains ont une VRC importante, alors que celle des hamsters CHF147 est faible. La figure ci-dessous représente les diagrammes de Poincaré pour un hamster du groupe Sham (C) et un hamster du groupe rhIGF-1 (Figure 50).

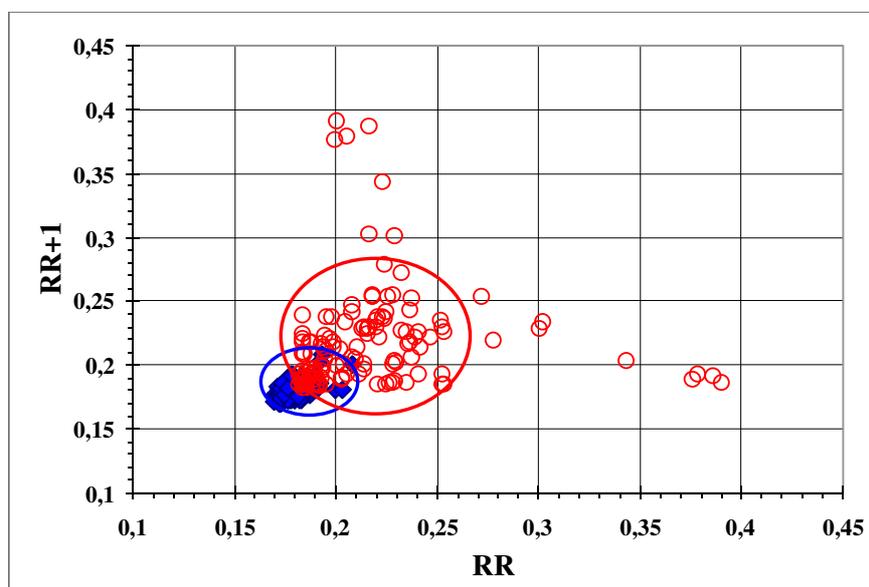


Figure 50. Variabilité du rythme cardiaque chez un hamster Sham (C) et un hamster rhIGF-1 (C). Le diagramme de Poincaré indique la variabilité entre les intervalles RR (en ms) par rapport aux intervalles suivants, RR+1 (en ms). Les losanges bleus représentent la distribution chez le hamster Sham (C) et les cercles rouges celle chez le hamster rhIGF-1 (C). Le cercle en bleu délimite l'enveloppe de variabilité du rythme cardiaque du hamster Sham (C) et le cercle en rouge, celle du hamster rhIGF-1 (C).

La variabilité des intervalles RR du hamster rhIGF-1 (C) est beaucoup plus importante que celle du hamster Sham (C). En effet, l'enveloppe de distribution des intervalles RR par rapport aux intervalles RR+1 est plus grande pour le hamster rhIGF-1 (C) (cercle rouge) que pour le hamster Sham (C) (cercle bleu).

3) Effets du traitement sur la morphologie et la structure cardiaques

- a. La morphologie et la structure cardiaques sont progressivement altérées au cours de la vie des hamsters CHF147

Les autopsies des hamsters inclus dans l'étude de survie, qu'ils soient du groupe Sham (C) ou rhIGF-1 (C), ont permis d'établir que la cause de mortalité des animaux était une insuffisance cardiaque sévère due à une dilatation importante du cœur. Ceci a été confirmé par des mesures de poids corporels (PC) et ventriculaires (PV), de diamètres cardiaques et d'épaisseurs de parois au moment de la mort. Les résultats sont reportés dans le tableau suivant (Tableau 9). Le rapport PV/PC des hamsters des groupes Sham (C) et rhIGF-1 (C) est significativement augmenté, ce qui est dû à une diminution importante de leurs PC. De même, les diamètres cardiaques sont également significativement augmentés par rapport au groupe Sains. A l'inverse, les épaisseurs des parois cardiaques restent inchangées.

Tableau 9. Analyse macroscopique au moment de la mort chez des hamsters Sains, Sham (C) et rhIGF-1 (C).

| | Sains | CHF147 | |
|---------------------|--------------|----------------|---------------|
| | | Sham (C) | rhIGF-1 (C) |
| n = | 19 | 5 | 7 |
| PV (mg) | 529,0 ± 93,1 | 565,1 ± 10,9 | 576,3 ± 142,7 |
| PC (g) | 155,5 ± 17,5 | 104,0 ± 15,1 * | 90,6 ± 21,5 * |
| PV/PC (mg/g) | 3,41 ± 0,56 | 5,77 ± 0,78 * | 6,58 ± 1,15 * |
| D (mm) | 8,38 ± 0,36 | 9,64 ± 0,66 * | 9,30 ± 0,79 * |
| PP (mm) | 1,92 ± 0,15 | 2,03 ± 0,74 | 2,03 ± 0,48 |
| SIV (mm) | 1,38 ± 0,32 | 1,72 ± 0,32 | 1,40 ± 0,21 |
| PP/SIV | 1,44 ± 0,27 | 1,16 ± 0,32 | 1,46 ± 0,34 |

PV = poids ventriculaire, en mg; PC = poids corporel, en g; D = diamètre cardiaque, en mm; PP = paroi postérieure, en mm; SIV = septum inter-ventriculaire, en mm. Les mesures des diamètres et des parois ont été réalisées sur coupes de cœur. * p < 0,05 vs. groupe Sains.

Des colorations histologiques de coupes de cœurs de hamsters CHF147 Non traités ont été réalisées à différents âges pour suivre l'évolution des cicatrices cardiaques (Figure 51).

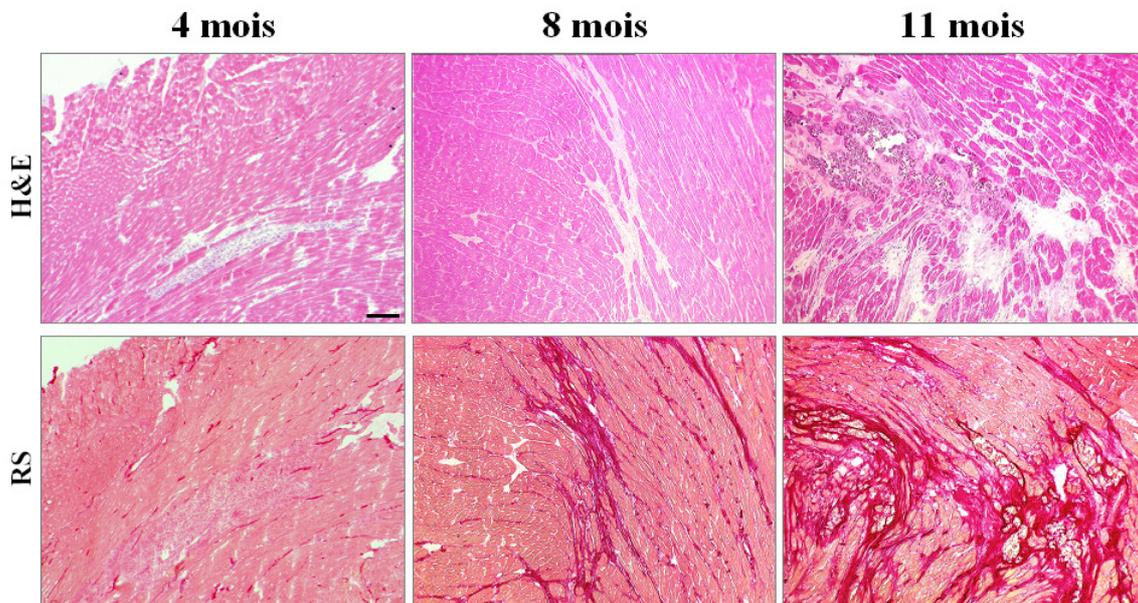


Figure 51. Evolution des cicatrices cardiaques au cours de la vie des hamsters CHF147. Les photos du haut correspondent à une coloration à l'hématoxyline-éosine (H&E) de coupes de cœur de hamsters CHF147 non traités. Les coupes du bas sont le pendant des coupes du haut mais colorées au rouge Sirius (RS). Grossissement 10x, échelle = 100 μ m.

Chez des hamsters CHF147 jeunes (âgés de 4 mois), les colorations H&E et RS sur coupes de cœurs montrent la présence de petites lésions cardiaques contenant du collagène. Le tissu cardiaque qui entoure ces lésions présente une structure normale. Chez des hamsters adultes (âgés de 8 mois), les lésions histologiques sont plus étendues et le tissu cardiaque lésé est remplacé par de la fibrose interstitielle. A cet âge, le tissu cardiaque entourant les lésions est toujours préservé. Chez des hamsters âgés (11 mois), la fibrose est très étendue et le tissu qui entoure les lésions est désorganisé. Ainsi, l'évolution des cicatrices cardiaques au cours de la vie des hamsters CHF147 est progressive et est parallèle à la progression de leur CMD.

- b. Les structures cardiaques des hamsters, traités ou non, sont comparables au moment de la mort

Des colorations histologiques de coupes de cœurs de hamsters Sham (C) et rhIGF-1 (C) ont été réalisées au moment de la mort des animaux (Figure 52). Les colorations H&E révèlent des lésions cardiaques étendues, entourées par des zones de tissu mieux préservées, à la fois chez le hamster Sham (C) et chez le hamster rhIGF-1 (C). La coloration RS montre que les lésions cardiaques ont été remplacées par une fibrose interstitielle

importante. Ces colorations de coupes de cœurs n'ont pas permis de différencier les hamsters des groupes Sham (C) et rhIGF-1 (C).

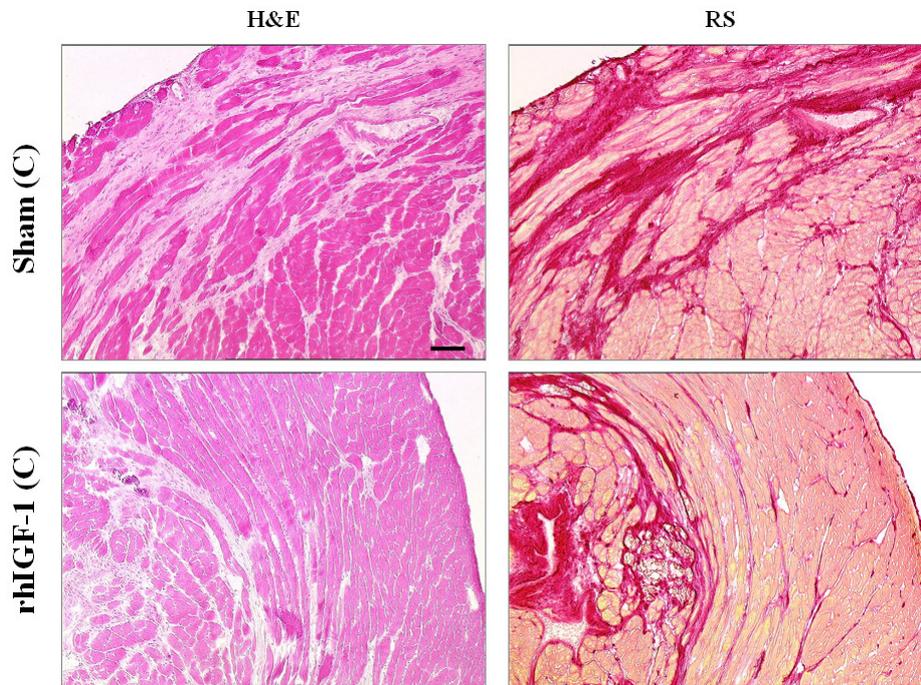


Figure 52. Colorations histologiques de coupes de coeur de hamsters Sham (C) et rhIGF-1 (C) au moment de la mort. Les photos du haut correspondent aux coupes de coeur de hamster Sham (C) et celles du bas aux coupes de coeur de hamster rhIGF-1 (C). Les coupes de gauche ont été colorées à l'hématoxyline-éosine (H&E) et celles de droite, au rouge Sirius (RS). Grossissement 10x, échelle = 100 μ m.

c. Evolution des poids corporels au cours de l'étude de survie

Les poids corporels des hamsters de chacun des groupes de hamsters, Sham (C) et rhIGF-1 (C) ont été mesurés toutes les semaines au cours de l'étude de survie. La figure suivante représente leurs courbes d'évolution (Figure 53). Les deux groupes de hamsters CHF147, du fait de leur pathologie cardiaque, subissent une perte de poids importante au cours de leur vie (22,49% dans le groupe Sham (C) et 31,45% dans le groupe rhIGF-1 (C), p non significatif) et l'évolution de leur poids corporel (PC) moyen est similaire entre l'âge d'implantation des pompes (235 jours) et l'âge de leur mort. Les deux groupes de hamsters, Sham (C) et rhIGF-1 (C), ont des poids corporels moyens identiques au début de l'étude, après l'implantation des pompes osmotiques ($134,22 \pm 9,75$ g et $132,10 \pm 15,17$ g, respectivement, p non significatif), de même qu'en fin d'étude ($104,04 \pm 15,09$ g et $90,55 \pm 21,53$ g, respectivement, p non significatif).

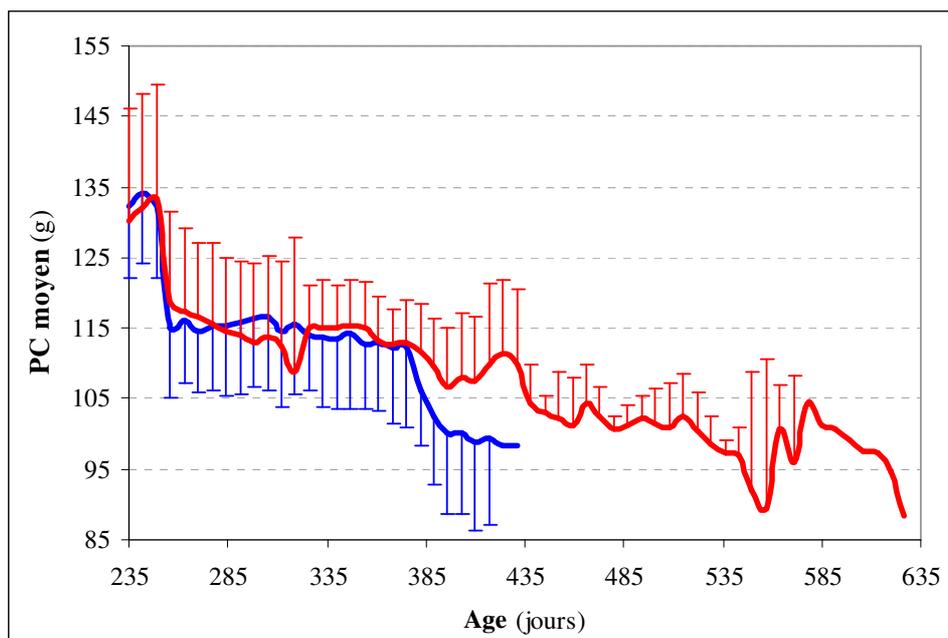


Figure 53. Evolution des poids corporels moyens des hamsters des groupes Sham (C) et rhIGF-1 (C). La courbe bleue représente l'évolution des poids corporels (PC) moyens, associés à leurs écart-types, pour le groupe Sham (C) et la courbe rouge, l'évolution de ceux du groupe rhIGF-1 (C).

Ainsi, bien que les hamsters des deux groupes étudiés meurent de la même pathologie, leur évolution est différente, les hamsters du groupe traité avec la protéine rhIGF-1 mourant plus tardivement que ceux du groupe Sham (C).

En conclusion, cette étude a montré qu'un traitement court par administration systémique de la protéine rhIGF-1 permet d'améliorer significativement la survie des hamsters CHF147 mais également de ralentir la dilatation cardiaque et ainsi de préserver la fonction à long terme.

E-Etude des effets du transfert du gène IGF-1 sur la CMD des hamsters CHF147

1) Vérification de la cassette d'expression du plasmide *in vitro* et *in vivo*

La fonctionnalité *in vitro* de la cassette d'expression IGF-1 a été vérifiée par dosage de l'IGF-1 par ELISA dans les surnageants de cultures de cellules HEK293 après transfection de 2 µg de plasmide pCMV-IGF1. La concentration d'IGF-1 secrétée par les cellules HEK293 est de 4,88 ng/mL, ce qui correspond à une concentration physiologique. Ainsi, la transfection du plasmide pCMV-IGF1 permet la sécrétion d'IGF-1 *in vitro*.

Afin de vérifier la fonctionnalité de la cassette d'expression IGF-1 du plasmide *in vivo*, le plasmide pCMV-IGF1 a été injecté directement dans le myocarde des hamsters CHF147 et la sécrétion d'IGF-1 par les cardiocytes a été visualisée par immunomarquages sur coupes (Figure 54).

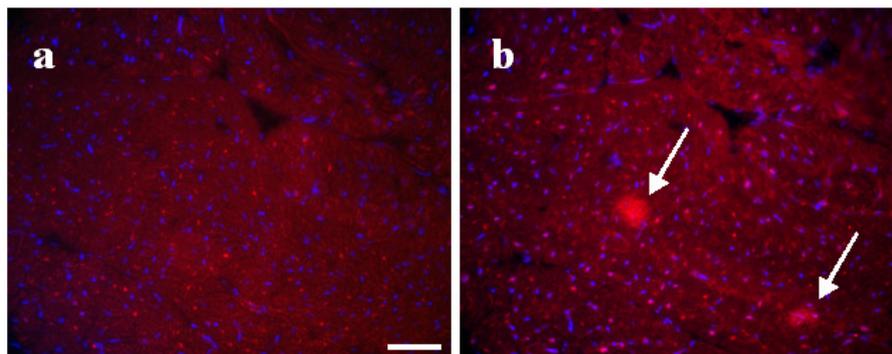


Figure 54. Immunomarquage de l'IGF-1 sur une coupe de cœur de hamster injecté avec le plasmide pCMV-IGF1. A gauche, témoin sans anticorps anti-IGF-1, à droite marquage avec l'anticorps anti-IGF-1. Les flèches blanches indiquent les zones d'expression de l'IGF-1 au niveau des sites d'injection (en rouge). Les noyaux ont été marqués au DAPI (en bleu). Grossissement 25x, échelle = 100 µm.

Les immunomarquages montrent la présence de zones positives, dans lesquelles les cardiocytes transfectés expriment IGF-1, qui sont très probablement localisées au niveau des sites d'injection du plasmide pCMV-IGF1. Le transfert du gène de l'IGF-1 *in vivo* permet donc l'expression de la protéine dans le cœur des hamsters CHF147.

2) L'injection de plasmide pCMV-IGF1 n'entraîne pas de réponse inflammatoire ou immunitaire de la part du myocarde

Un des inconvénients majeurs d'une approche par thérapie génique est l'induction éventuelle d'une réponse inflammatoire ou d'une réaction immunitaire de la part de l'organisme hôte. L'apparition de telles réponses dans les cœurs des hamsters après injection intra-myocardique du plasmide pCMV-IGF1 a été vérifiée par immunomarquages des macrophages et des lymphocytes CD8 (Figure 55). La présence de macrophages tissulaires reflète l'existence d'une réponse inflammatoire et celle de lymphocytes CD8, l'existence d'une réaction lymphocytaire cytotoxique.

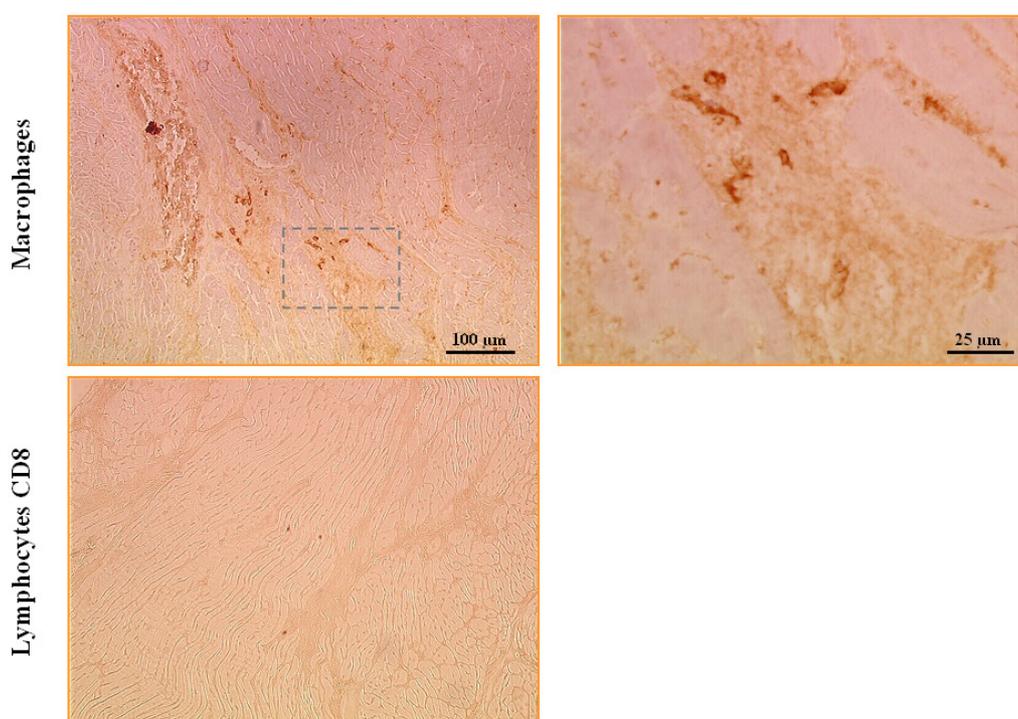


Figure 55. Réponse immunitaire après traitement avec le plasmide pCMV-IGF1. Immunomarquage des macrophages (en haut) et des lymphocytes CD8 (en bas) sur coupes de cœurs de hamsters traités avec le plasmide pCMV-IGF1. Photos de gauche, grossissement 10x, échelle = 100 μm; la photo de droite correspond au cadre en pointillés gris, grossissement 40x, échelle = 25 μm.

Les immunomarquages avec l'anticorps anti-macrophages indiquent la présence normale de quelques macrophages tissulaires dans les cœurs des hamsters traités avec le plasmide pCMV-IGF1. Ces macrophages sont présents dans des zones colocalisées avec les zones de fibrose cardiaque. Les immunomarquages des lymphocytes CD8 révèlent une absence de réaction lymphocytaire cytotoxique.

3) L'injection de pCMV-IGF1 maintient la morphologie cardiaque

L'étude des effets du transfert de gène par injection directe du plasmide pCMV-IGF1 dans le cœur a été réalisée de la même manière que celle des effets de l'administration systémique de la protéine recombinante rhIGF-1 à court terme (protocole 1, groupe rhIGF-1 (A)). Dans cette partie, les résultats obtenus chez les hamsters du groupe pCMV-IGF1 seront comparés à ceux obtenus chez les hamsters rhIGF-1 (A).

a. L'injection de pCMV-IGF1 permet de ralentir la dilatation cardiaque

De même que pour l'étude des effets à court terme de l'administration systémique de protéine recombinante rhIGF-1, les effets de l'injection intra-myocardique du plasmide ont été évalués d'un point de vue macroscopique. Les poids corporels et cardiaques ainsi que les diamètres cardiaques et les épaisseurs des parois ont été mesurés au moment du sacrifice des hamsters inclus dans les différents groupes, Non traités, Sham (D) et pCMV-IGF1. Les résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous (Tableau 10). Les résultats obtenus avec la protéine recombinante rhIGF-1 dans le protocole 1 ont également été rappelés dans le tableau.

Tableau 10. Analyse macroscopique au moment du sacrifice chez des hamsters Non traités, Sham (D) et pCMV-IGF1.

| | CHF147 | | | |
|---------------------|--------------------|-----------------|--------------------|------------------|
| | Non traités | Sham (D) | rhIGF-1 (A) | pCMV-IGF1 |
| n = | 3 | 3 | 7 | 6 |
| PV (mg) | 505,9 ± 64,9 | 544,4 ± 50,7 | 597,0 ± 64,1 | 498,8 ± 91,0 § |
| PC (g) | 101,7 ± 27,4 | 134,4 ± 14,5 | 136,1 ± 16,3 § | 120,8 ± 16,3 |
| PV/PC (mg/g) | 5,09 ± 0,64 | 4,12 ± 0,09 | 4,39 ± 0,23 § | 4,13 ± 0,49 § |
| D (mm) | 10,36 ± 0,63 | 10,46 ± 0,81 | 8,91 ± 0,48 § | 8,29 ± 0,26 §†\$ |
| PP (mm) | 2,17 ± 0,34 | 2,17 ± 0,30 | 2,93 ± 0,25 § | 2,31 ± 0,24 § |
| SIV (mm) | 1,62 ± 0,27 | 1,54 ± 0,14 | 2,12 ± 0,20 § | 2,04 ± 0,32 §† |
| PP/SIV | 1,34 ± 0,07 | 1,41 ± 0,11 | 1,39 ± 0,14 | 1,15 ± 0,14 §†\$ |

PV = poids ventriculaire, en mg; PC = poids corporel, en g; D = diamètre cardiaque, en mm; PP = paroi postérieure, en mm; SIV = septum inter-ventriculaire, en mm. Les mesures des diamètres et des parois ont été réalisées sur coupes de cœur. § p < 0,05 vs. groupe Non traités, † p < 0,05 vs. groupe Sham (D), \$ p < 0,05 vs. groupe rhIGF-1 (A).

Les deux groupes contrôles, Non traités et Sham (D), ne présentent pas de différences significatives pour aucun des paramètres mesurés et sont donc comparables.

Le rapport PV/PC des hamsters du groupe pCMV-IGF1 est significativement plus petit que celui du groupe Non traités, démontrant un ralentissement de la dilatation cardiaque après injection du plasmide codant pour l'IGF-1. De plus, les poids ventriculaires des hamsters du groupe pCMV-IGF1 sont moins augmentés que ceux du groupe rhIGF-1 (A), ce qui semble indiquer une moindre dilatation du cœur dans le groupe pCMV-IGF1 par rapport au groupe rhIGF-1 (A). Ceci est confirmé par la mesure du diamètre cardiaque qui est significativement moins augmenté dans le groupe pCMV-IGF1 par rapport aux deux groupes contrôles, Non traités et Sham (D), mais aussi par rapport au groupe rhIGF-1 (A). Il faut également noter que le diamètre cardiaque du groupe pCMV-IGF1 est comparable à celui des hamsters Sains ($8,29 \pm 0,26$ mm et $8,38 \pm 0,36$ mm, respectivement, p non significatif) alors que dans le protocole 1, le cœur des hamsters du groupe rhIGF-1 (A) était plus dilaté que celui du groupe Sains ($8,91 \pm 0,48$ mm et $8,38 \pm 0,36$ mm, respectivement, $p < 0,05$). Tout comme dans le groupe rhIGF-1 (A), l'épaisseur de la paroi postérieure du cœur des hamsters du groupe pCMV-IGF1 est significativement augmentée par rapport à celle du groupe Sains ($2,31 \pm 0,24$ mm et $1,92 \pm 0,15$ mm, respectivement, $p < 0,05$), de même que l'épaisseur du septum inter-ventriculaire ($2,04 \pm 0,32$ mm et $1,38 \pm 0,32$ mm, respectivement, $p < 0,05$). Cependant, l'épaississement de la paroi postérieure est significativement moins important dans le groupe pCMV-IGF1 que dans le groupe rhIGF-1 (A).

Le rapport PP/SIV a été calculé à partir de la mesure des épaisseurs des parois cardiaques. Alors que le rapport PP/SIV du groupe rhIGF-1 (A) était comparable à celui des hamsters du groupe Sains, dans le cas des hamsters traités avec le plasmide, il est significativement diminué par rapport aux animaux sains ($1,15 \pm 0,14$ mm et $1,44 \pm 0,27$ mm, respectivement, $p < 0,05$) et également par rapport aux groupes contrôles, Non traités et Sham (D), et au groupe rhIGF-1 (A). L'injection intra-myocardique du plasmide pCMV-IGF1 ne permet donc pas de maintenir une morphologie cardiaque harmonieuse.

b. La structure est préservée après injection du plasmide pCMV-IGF1

De même que dans le cas de l'administration systémique de la protéine recombinante rhIGF-1, l'immunomarquage de coupes de cœurs de hamsters traités par injection de plasmide pCMV-IGF1 avec un anticorps anti-dystrophine présente des zones positives concomitantes avec des zones négatives (Figure 56). Ceci renforce les observations faites dans le groupe rhIGF-1 (A) indiquant que le traitement par administration d'IGF-1 préserver partiellement l'intégrité du cytosquelette des cardiomyocytes.

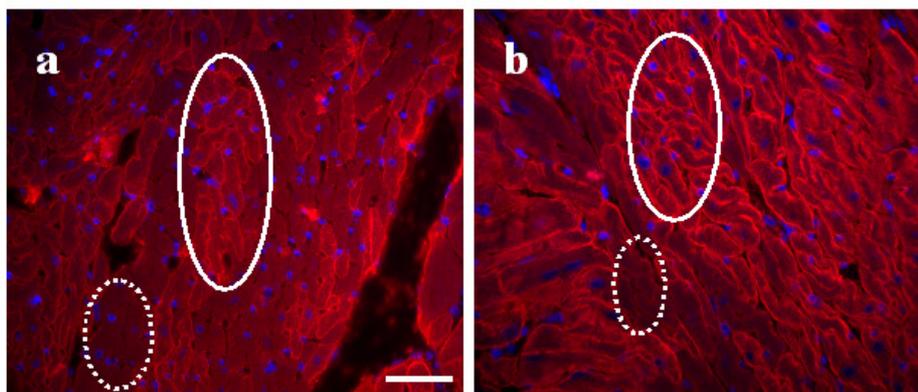


Figure 56. Immunomarquages de la dystrophine (en rouge) sur des coupes de cœurs de hamsters traités avec la protéine rhIGF-1 (a) et traités avec le plasmide pCMV-IGF1 (b). Sur chaque coupe, l'ellipse en trait plein délimite une zone positive et l'ellipse en pointillés, une zone négative. Les noyaux sont visualisés grâce à un marquage au DAPI (en bleu). Grossissement 40x, échelle = 50 μ m.

D'autre part, des immunomarquages doubles du collagène de type I et de la myosine ou de la troponine I cardiaque sur coupes de cœurs de hamsters traités avec le plasmide pCMV-IGF1 ne montrent pas de désorganisation du tissu cardiaque en dehors des lésions fibrotiques, tout comme dans le groupe rhIGF-1 (A).

- c. L'injection de pCMV-IGF1 permet d'empêcher l'extension de la fibrose

L'analyse plus précise de la fibrose par immunomarquage du collagène de type I sur coupes de cœurs semble montrer une étendue fibrotique moins importante dans le cas des hamsters du groupe pCMV-IGF1 (b) par rapport aux hamsters traités avec la protéine recombinante rhIGF-1 (a) (Figure 57).

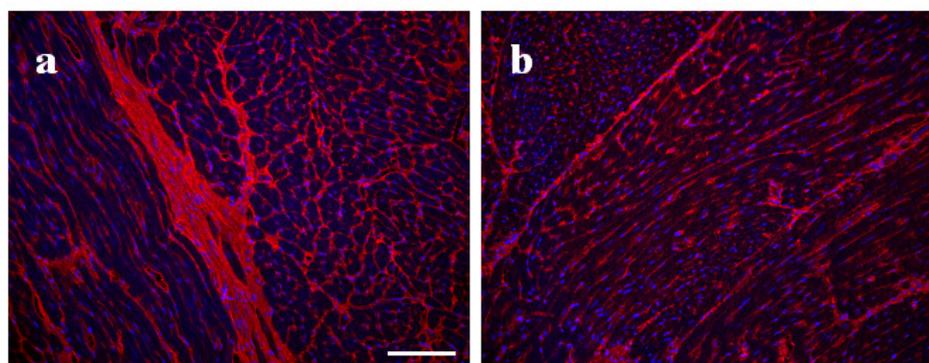


Figure 57. Analyse immunohistochimique de la fibrose, par immunomarquages du collagène de type I (en rouge) sur coupes de cœurs de hamsters traités avec la protéine recombinante rhIGF-1 (a) et traités avec le plasmide pCMV-IGF1 (b). Les noyaux sont visualisés par un marquage au DAPI (en bleu). Grossissement 16x, échelle = 100 μ m.

Les colorations histologiques de coupes de cœurs au rouge Sirius appuient les observations réalisées à partir des immunomarquages du collagène de type I (Figure 58).

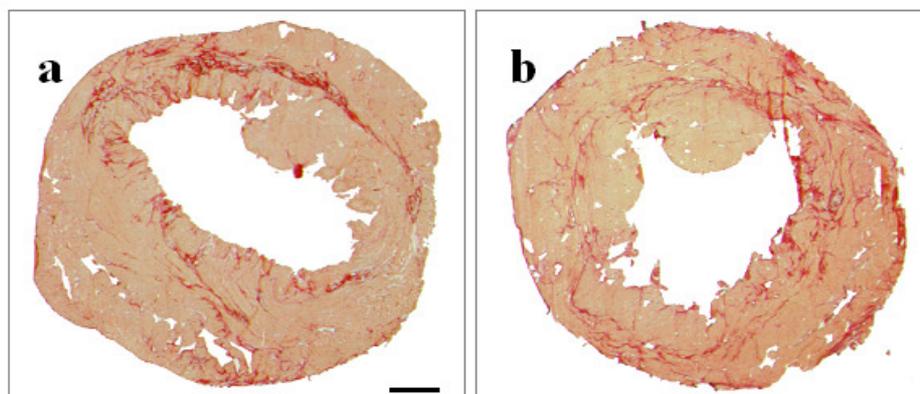


Figure 58. Analyse histologique de la fibrose myocardique, par coloration au rouge Sirius sur coupes de cœurs de hamsters traités avec la protéine recombinante rhIGF-1 (a) et traités avec le plasmide pCMV-IGF1 (b). Grossissement 1x, échelle = 1mm.

De plus, alors que dans le groupe rhIGF-1 (A), la cicatrice fibrotique était essentiellement localisée au niveau de la zone médiane du cœur entre l'endocarde et l'épicarde (a), dans le groupe pCMV-IGF1, la fibrose est plus largement distribuée sur la surface de la coupe et n'est plus concentrée dans la zone médiane (b).

Enfin, la quantification de l'étendue de la fibrose par mesure de la surface des zones colorées par le rouge Sirius confirme les observations précédentes qui indiquaient une diminution de la cicatrice de fibrose plus importante chez les hamsters traités avec le plasmide pCMV-IGF1 que chez ceux ayant reçu la protéine recombinante. En effet, bien que le pourcentage de la surface des coupes de cœurs recouverte par de la fibrose dans le groupe pCMV-IGF1 soit significativement augmenté par rapport à celui du groupe Sains ($3,06 \pm 1,59\%$ et $0,98 \pm 1,41\%$, respectivement, $p < 0,05$), il est également significativement diminué par rapport à celui du groupe Non traités ($3,06 \pm 1,59\%$ et $6,36 \pm 4,01\%$, respectivement, $p < 0,05$), alors que l'administration de protéine recombinante ne permettait pas d'obtenir une diminution significative de l'étendue de la fibrose par rapport au groupe Non traités ($3,90 \pm 1,07\%$ et $6,36 \pm 4,01\%$, respectivement pour les groupes rhIGF-1 (A) et Non traités).

4) Effets fonctionnels du transfert du gène IGF-1 dans le myocarde

Des mesures de pressions et de volumes cardiaques ont été réalisées par cathétérisme cardiaque au repos chez des animaux des groupes Non traités, Sham (D) et pCMV-IGF1 sont présentées dans le tableau suivant (Tableau 11). Les résultats obtenus avec la protéine recombinante rhIGF-1 dans le protocole 1 ont également été rappelés dans le tableau.

Tableau 11. Fonction cardiaque après traitement avec le plasmide pCMV-IGF1.

| | CHF147 | | | |
|-------------------------------------|-------------|-------------|---------------|---------------|
| | Non traités | Sham (D) | rhIGF-1 (A) | pCMV-IGF1 |
| n = | 3 | 3 | 7 | 6 |
| P_{fs} (mmHg) | 60 ± 7 | 68 ± 16 | 73 ± 11 | 73 ± 17 |
| P_{fd} (mmHg) | 17 ± 4 | 12 ± 1 | 14 ± 5 | 2 ± 2 †\$ |
| V_{fd} (µL) | 24,9 ± 9,8 | 23,1 ± 5,5 | 28,4 ± 5,9 | 20,4 ± 7,3 \$ |
| VE (µL) | 1,8 ± 0,4 | 3,5 ± 0,7 § | 2,9 ± 0,6 § | 3,4 ± 1,0 § |
| DC (µL/min) | 431 ± 100 | 621 ± 110 | 617 ± 156 | 641 ± 153 |
| FC (bpm) | 253 ± 63 | 255 ± 71 | 213 ± 39 | 190 ± 37 |
| dp/dt_{max} (mmHg/s) | 2492 ± 308 | 2789 ± 576 | 3333 ± 410 § | 3054 ± 662 |
| dp/dt_{min} (mmHg/s) | -2092 ± 247 | -2304 ± 554 | -2796 ± 406 § | -2890 ± 881 |

P_{fs} = pression de fin de systole, en mmHg; P_{fd} = pression de fin de diastole, en mmHg; V_{fd} = volume de fin de diastole, en µL; VE = volume d'éjection, en µL; DC = débit cardiaque, en µL/min, FC = fréquence cardiaque, en bpm, dp/dt_{max} en mmHg/s, dp/dt_{min} en mmHg/s. § p < 0,05 vs. groupe Non traités, † p < 0,05 vs. groupe Sham (D), \$ p < 0,05 vs. groupe rhIGF-1 (A).

Les résultats indiquent une amélioration de la fonction diastolique dans le groupe traité avec le plasmide pCMV-IGF1 par rapport au groupe traité avec la protéine recombinante rhIGF-1. En effet, la pression et le volume de fin de diastole sont significativement diminués pour les hamsters du groupe pCMV-IGF1 par rapport à ceux du groupe rhIGF-1 (A). D'autre part, il faut souligner que ces deux paramètres sont comparables à ceux des hamsters du groupe Sains et ne présentent pas de différences significatives avec ces derniers (P_{fd} = 2 ± 2 mmHg et 3 ± 4 mmHg dans les groupes pCMV-IGF1 et Sains, respectivement, et V_{fd} = 20,4 ± 7,3 µL et 20,4 ± 4,8 µL dans les groupes pCMV-IGF1 et Sains, respectivement). De plus, le volume d'éjection est significativement amélioré par rapport à celui du groupe Non traités. De même que dans le groupe rhIGF-1 (A), le débit cardiaque tend à être amélioré après traitement avec le plasmide pCMV-IGF1. Enfin, bien que les différences ne soient pas significatives, la contractilité et la relaxation cardiaques tendent à l'amélioration par rapport aux groupes Non traités et Sham (D) et sont du même ordre de grandeur que celles du groupe rhIGF-1 (A).

Une courbe PV représentative pour chacun des groupes de hamsters a été représentée sur la figure suivante (Figure 59). Ces courbes illustrent les cycles cardiaques d'un hamster sain ainsi que ceux avant et après traitement des hamsters CHF147 avec le plasmide pCMV-IGF1. Les valeurs de pressions et de volumes en fin de systole désignent un point de la courbe PV. En reliant ces points sur toutes les courbes PV obtenues en faisant varier la pré-charge, il est possible de tracer une droite qui modélise la relation entre la pression et le volume en fin de systole (ESPVR) et dont la pente est représentative de la contractilité cardiaque.

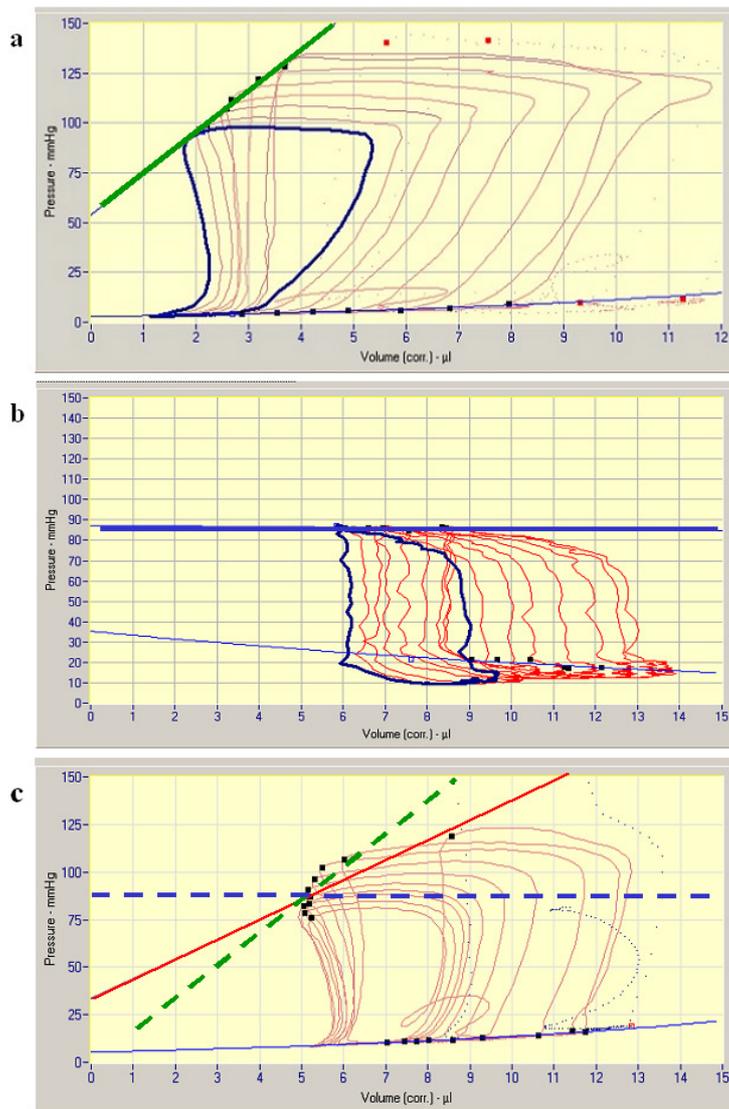


Figure 59. Exemples représentatifs de courbes PV. Les courbes PV sont obtenues en faisant varier la pré-charge cardiaque. a, hamster du groupe Sains; b, hamster du groupe Non traités; c, hamster du groupe pCMV-IGF1. Les courbes en gras correspondent aux courbes PV au repos. La droite en vert correspond à la relation entre la pression et le volume en fin de systole (ESPVR) pour le hamster sain. La droite en bleu correspond à la droite ESPVR pour le hamster non traité et celle en rouge, à la droite ESPVR pour le hamster traité avec le plasmide pCMV-IGF1.

La pente de la droite ESPVR est égale à 20,73 pour le hamster sain alors qu'elle est de 0,19 pour le hamster du groupe Non traité et de 10,41 pour celui du groupe pCMV-IGF1.

En conclusion, cette étude a montré que l'injection directe du plasmide pCMV-IGF1 dans le cœur de hamsters CHF147 permet d'obtenir une expression locale de la protéine IGF-1 au niveau des sites d'injection et n'entraîne pas de réaction inflammatoire ou de réponse immunitaire. D'autre part, l'injection du plasmide pCMV-IGF1 induit un ralentissement de la dilatation cardiaque plus important que celui obtenu après la délivrance systémique de protéine recombinante rhIGF-1. Cependant, la morphologie cardiaque est préservée de manière moins harmonieuse chez les hamsters du groupe pCMV-IGF1 que ceux

du groupe rhIGF-1 (A). D'un point de vue structurel, la structure myocardique est préservée et la cicatrice fibrotique est moins étendue après le transfert du gène IGF-1 qu'après l'administration de la protéine recombinante. Enfin, la fonction cardiaque est préservée et les paramètres diastoliques sont mêmes comparables à ceux des hamsters du groupe Sains.

DISCUSSION

La cardiomyopathie dilatée (CMD) est une atteinte primitive du muscle cardiaque qui évolue inexorablement vers l'insuffisance cardiaque. Les traitements actuels des CMD sont ceux utilisés pour traiter l'insuffisance cardiaque, cependant ils n'agissent pas directement sur l'atteinte myocardique. Dans ce contexte, il semble donc nécessaire de développer de nouvelles thérapeutiques de cette pathologie, ce qui a constitué l'objectif de ce travail de thèse.

Afin de développer une nouvelle approche thérapeutique de la CMD, nous avons eu recours à un modèle animal, le hamster myopathe de la lignée CHF147. Le hamster CHF147 est un modèle de myopathie héréditaire généralisée dont la manifestation principale est une CMD. Le déficit primaire porté par le hamster CHF147, qui consiste en une délétion du gène du δ -sarcoglycane, entraîne de nombreuses altérations cardiaques secondaires, tant structurelles que fonctionnelles. Ce modèle possède deux avantages majeurs par rapport à d'autres modèles animaux d'insuffisance cardiaque, et notamment les modèles d'insuffisance cardiaque induite. Tout d'abord, l'évolution de la CMD du hamster CHF147 vers l'insuffisance cardiaque se fait de manière progressive, ce qui autorise les études au stade pré-symptomatique. Ensuite, le hamster cardiomyopathe étant utilisé depuis plusieurs décennies, il existe de nombreuses données disponibles dans la littérature concernant tous les aspects de sa cardiomyopathie (histologie, biochimie, électrophysiologie, etc.) et ce, à chacun des stades de la pathologie.³⁶

Deux stratégies thérapeutiques sont envisageables pour traiter la CMD du hamster cardiomyopathe. La première consiste à corriger le déficit génétique primaire par transfert du gène du δ -sarcoglycane dans le cœur. Des travaux utilisant cette approche ont déjà été réalisés au début des années 2000, notamment par le groupe de Toyo-Oka.^{106,107,196} Ceux-ci ont mis en évidence que l'approche par thérapie génique, chez des hamsters de la lignée TO-2 âgés de 5 semaines, permet bien la réexpression du δ -sarcoglycane et la restauration du complexe des sarcoglycanes au niveau du sarcolemme, dans les cœurs des hamsters traités. De plus, les animaux traités présentent des améliorations au niveau de leur morphologie cardiaque et de leur fonction diastolique, et ont une survie augmentée par rapport à des animaux non traités. Cependant, les études du groupe de Toyo-Oka ont également montré que cette approche ne permet pas complètement d'empêcher l'apparition et l'évolution de la CMD. En effet, les altérations cardiaques secondaires observées chez les hamsters cardiomyopathes se développent indépendamment du défaut génétique primaire. Il semble donc évident que la réintroduction du gène du δ -sarcoglycane, même chez des animaux jeunes, n'entraîne pas la réversion des symptômes cardiaques. Par ailleurs, d'un point de vue clinique, les patients atteints de CMD ne sont bien souvent pris en charge qu'après l'apparition des premiers symptômes d'insuffisance cardiaque, c'est-à-dire à un stade déjà avancé de la pathologie.

L'approche par thérapie génique consistant à réintroduire le gène, dont le déficit est responsable de la CMD, paraît alors difficilement applicable chez l'Homme.

Pour ces raisons, nous nous sommes intéressés à une deuxième approche thérapeutique qui consiste à traiter les symptômes de la CMD plutôt que sa cause primaire. En effet, à l'heure actuelle, les objectifs clés de la thérapie pour les patients insuffisants cardiaques sont de soulager et stabiliser les symptômes, et de prolonger la survie en stoppant ou en inversant la progression de la dysfonction myocardique.¹⁰⁸ La stratégie que nous avons retenue a été d'induire un phénomène compensateur de la dilatation cardiaque, celle-ci étant la caractéristique principale de la CMD, en utilisant les propriétés de l'Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1).

L'IGF-1, en tant que facteur de croissance, possède un rôle important dans le cœur et pourrait, d'autre part, être considéré comme un marqueur de la sévérité de l'atteinte cardiaque. En effet, de nombreuses observations ont montré que l'altération de l'axe GH/IGF-1 a des effets délétères sur le système cardiovasculaire. Par exemple, chez les patients atteints de maladies endocriniennes, telles que le syndrome de Laron (déficit dans l'axe GH/IGF-1), ou l'acromégalie (excès en GH), le risque de maladie cardiovasculaire est augmenté.^{40,148,158} Les patients atteints d'insuffisance hypophysaire ont une espérance de vie réduite, et leur risque de mortalité liée à une pathologie cardiovasculaire est deux fois plus important que celui de sujets sains.⁴⁰ En outre, des patients insuffisants cardiaques n'ayant pas d'atteinte de l'axe GH/IGF-1, peuvent également avoir des niveaux d'IGF-1 altérés. Broglio *et coll.* ont montré que le niveau basal d'IGF-1 sérique est réduit chez des patients atteints de CMD présentant une dysfonction ventriculaire gauche sévère.²⁵ De même, Osterziel *et coll.* ont pu mettre en évidence une corrélation entre la diminution du niveau d'IGF-1 dans le sang et l'augmentation de la sévérité de l'atteinte myocardique.¹⁴⁹ Cette observation a également été réalisée par plusieurs autres groupes.^{12,112,176} Des données indiquent, d'autre part, qu'un faible niveau d'IGF-1 sérique est associé à une augmentation du risque d'insuffisance cardiaque congestive dans une population de personnes âgées n'ayant pas d'histoire d'insuffisance cardiaque congestive ou d'infarctus du myocarde avant l'entrée dans l'étude.²⁰² Enfin, Roubenoff *et coll.* ont montré qu'un taux sanguin d'IGF-1 bas est également un facteur de risque de mortalité chez les personnes âgées.¹⁶⁹

L'intérêt thérapeutique de l'IGF-1 a été démontré dans de nombreux modèles animaux de pathologie cardiaque aboutissant à une insuffisance cardiaque congestive, mais également chez l'Homme. La première utilisation d'IGF-1 *in vivo* a été réalisée en 1995 par le groupe de Ross chez le petit animal. Quarante huit heures après leur avoir fait subir un infarctus du myocarde, la protéine recombinante rhIGF-1 a été administrée à des rats de manière systémique pendant 2 semaines et à une dose de 3 mg/kg/jour. Les résultats obtenus indiquent que la délivrance de rhIGF-1 pendant un temps court est capable d'activer une réponse physiologique compensatrice de type hypertrophique associée à une amélioration de la fonction cardiaque. Au cours de cette étude, il a également été montré que cette réponse hypertrophique peut être induite dans le cœur de rats normaux.⁶⁰ Dans une autre étude,

l'administration de rhIGF-1, par injection intra-péritonéale à une dose de 1 µg ou 10 µg par animal, 1h avant le déclenchement d'un infarctus du myocarde chez des rats, a permis d'atténuer la nécrose myocardique et l'apoptose des cardiomyocytes habituellement observées après reperfusion du myocarde ischémié.²⁶ Les effets bénéfiques d'IGF-1 ont aussi été démontrés dans des modèles d'insuffisance cardiaque chez le gros animal. Dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le porc, un traitement par rhIGF-1 à une dose de 150 µg/animal a entraîné, de manière précoce après l'infarctus, une amélioration de la fonction myocardique régionale au niveau des régions infarctées et la préservation de protéines myocardiques structurelles et contractiles.¹¹³ Une équipe néo-zélandaise a également utilisé un traitement par rhIGF-1 chez des brebis dont l'insuffisance cardiaque a été induite par des infarctus du myocarde répétés. Le traitement, basé sur des injections intra-péricardiques à une dose journalière de 150 µg/kg pendant 14 jours, a permis d'augmenter significativement la fraction d'éjection dès le troisième jour, et ce jusqu'à la fin de l'étude au 28^{ème} jour, soit 14 jours après l'arrêt du traitement.¹²⁹ L'amélioration de la fonction cardiaque, probablement grâce aux effets anti-apoptotiques d'IGF-1 a également été observée dans un modèle canin de CMD induite par pacing, traité pendant une semaine avec 100 µg/kg/jour de protéine rhIGF-1.¹¹⁶ L'intérêt thérapeutique de l'IGF-1 a, d'autre part, été mis en évidence dans un modèle héréditaire d'atteinte cardiaque, la souris transgénique surexprimant la tropomoduline (lignée TOT).²¹¹ Cette lignée, qui mime les caractéristiques structurelles et fonctionnelles de la CMD humaine, a été croisée avec une lignée de souris transgéniques surexprimant l'IGF-1 (lignée IGF-1), pour donner la lignée murine TIGFO, surexprimant la tropomoduline et l'IGF-1. La surexpression d'IGF-1 dans les cœurs des souris TOT entraîne des effets cardiaques bénéfiques significatifs, tant sur le plan structurel que fonctionnel. Enfin, chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque chronique, un traitement basé sur l'injection intraveineuse de rhIGF-1, à une dose de 60 µg/kg pendant 4h, entraîne une augmentation du débit cardiaque et du volume d'éjection, ainsi qu'une réduction des résistances vasculaires périphériques, due à l'effet vasodilatateur de l'IGF-1.⁵³

Ainsi, IGF-1 possède des effets cardioprotecteurs importants et apparaît comme une option thérapeutique intéressante dans le contexte des atteintes cardiaques, et notamment de la CMD, aboutissant à l'insuffisance cardiaque.⁵⁵ Cependant, étant donné qu'à la fois un déficit et une surproduction peuvent conduire à une détérioration de la fonction cardiaque, IGF-1 est "une épée à double tranchant" pour le cœur.^{148,207} Le choix de la dose administrée mais également celui du temps de délivrance sont donc particulièrement importants pour obtenir les effets bénéfiques d'IGF-1 sans induire d'effets délétères. Ces choix peuvent notamment être basés sur l'expérience acquise par l'utilisation thérapeutique de la protéine rhIGF-1 dans d'autres pathologies.

Du fait de ses effets majeurs sur la croissance, la protéine recombinante IGF-1 est utilisée pour comme traitement substitutif, principalement pour traiter les maladies endocriniennes liées à un déficit de l'axe GH/IGF-1. Dans ce contexte, le but du traitement est de restaurer un niveau normal d'IGF-1 et les doses de protéine rhIGF-1 utilisées sont de

l'ordre de 40 – 200 µg/kg, administrées une à deux fois par jour pendant 3 mois à 5 ans maximum (voir la revue de Ranke ¹⁵⁷). L'autre application thérapeutique principale de la protéine rhIGF-1 utilise les propriétés métaboliques "insulin-like" de l'IGF-1 pour le traitement du diabète et des syndromes de résistance à l'insuline, afin de diminuer la glycémie. Les doses utilisées sont comprises entre 50 et 160 µg/kg, administrées une à deux fois par jour pendant un an maximum (voir la revue de Ranke ¹⁵⁷).

Dans le contexte de l'insuffisance cardiaque, les études qui se sont attachées à montrer les effets bénéfiques d'IGF-1, et qui ont été précédemment citées, ont été réalisées avec des doses importantes de protéine recombinante. Par exemple, dans l'étude de Donath *et coll.*, la dose de rhIGF-1 délivrée de 60 µg/kg est comparable aux doses utilisées dans le traitement du syndrome de Laron.⁵³ Or l'utilisation d'IGF-1 dans le traitement de l'insuffisance cardiaque ne devrait pas avoir pour but de restaurer le niveau d'IGF-1, mais seulement de délivrer une dose suffisante pour induire des effets bénéfiques compensateurs de la pathologie. De plus, depuis la fin des années 1990, de nombreuses études ont montré un lien entre l'élévation du niveau sérique d'IGF-1 et l'augmentation du risque de plusieurs types de cancers communs (voir la revue de LeRoith & Roberts ¹²⁰). En effet, un niveau élevé d'IGF-1 circulant constitue un facteur de risque pour le développement du cancer du sein, de la prostate, du colon et des poumons. D'autre part, le niveau d'IGFBP-3 est inversement associé au risque de développement de ces cancers. IGFBP-3, qui est la protéine majoritaire de fixation de l'IGF-1 dans le sang, est connue pour réguler son activité mitogénique et inhiber ses effets anti-apoptotiques (voir la revue de Yu & Rohan ²²⁹).

En ce qui concerne la durée de traitement, les effets de l'administration chronique ou de la surexpression d'IGF-1 ont été analysés. En particulier, Delaughter *et coll.* ont étudié des souris transgéniques surexprimant IGF-1 spécifiquement au niveau des muscles squelettiques et cardiaques et qui ne montrent pas d'augmentation significative de leurs niveaux sériques en IGF-1 par rapport aux animaux contrôles. Ils ont pu montrer que les souris jeunes, âgées de 10 semaines, présentent une hypertrophie cardiaque physiologique, qui évolue de manière progressive vers une hypertrophie pathologique.⁴⁹ En conclusion de leur étude, les auteurs proposent de limiter le temps d'exposition à l'IGF-1 afin de bénéficier de ses effets bénéfiques, tout en évitant ses effets secondaires délétères.

A partir de ces données, nous nous sommes attachés, dans la première partie de cette étude, à évaluer les effets à court terme de la délivrance d'une faible dose d'IGF-1 pendant un temps limité dans le contexte de l'insuffisance cardiaque due à une cardiomyopathie dilatée héréditaire chez le hamster de la lignée CHF147. Nous avons choisi d'administrer de manière systémique une dose totale de protéine recombinante comprise entre 20 et 30 µg, n'agissant pas sur le taux sérique d'IGF-1 ni sur la glycémie. Les effets du traitement ont été évalués dès la fin de la délivrance d'IGF-1, soit 35 jours après l'implantation des pompes osmotiques.

Les résultats obtenus dans la première partie de notre étude montrent que l'administration systémique de protéine recombinante humaine IGF-1 à des hamsters CHF147

âgés de 6 mois a conduit, à court terme, à un ralentissement de la dilatation cardiaque et à une préservation hémodynamique significative par rapport à des animaux non traités.

Au niveau macroscopique, une réduction des poids corporels a été observée dans les groupes Non traités, Sham et traité avec rhIGF-1 par rapport au groupe Sains, cette réduction étant significative pour les groupes Non traités et rhIGF-1. Cette différence pourrait refléter à la fois la cachexie cardiaque et les lésions dues à la myopathie, qui sont responsables d'une réduction de la masse musculaire chez les hamsters CHF147. Les hamsters du groupe rhIGF-1 ont, cependant, un rapport poids ventriculaire/poids corporel (PV/PC) mieux préservé que celui des animaux du groupe Non traités. De plus, le traitement par rhIGF-1 permet de ralentir la dilatation cardiaque observée chez les hamsters CHF147. En effet, les animaux du groupe rhIGF-1 ont un diamètre cardiaque significativement diminué par rapport à ceux des groupes Non traités et Sham, et du même ordre de grandeur que celui du groupe Sains. Les ventricules gauches des animaux des différents groupes présentent des différences morphologiques, qui sont reflétées par le ratio paroi postérieure/septum inter-ventriculaire (PP/SIV). Le traitement avec rhIGF-1 a permis de restaurer un ratio proche de la normale démontrant sa capacité à maintenir une morphologie cardiaque harmonieuse.

Cependant, ces effets bénéfiques sur la morphologie cardiaque ne semblent pas passer par l'induction d'une réponse de type hypertrophique, comme le montrent les résultats des quantifications des ARNm et des protéines impliquées dans les voies de signalisation moléculaires de l'IGF-1. De nombreux travaux ont montré que les voies de signalisation des MAPK et de la PI3K sont les voies, principales activées par IGF-1 *in vivo* et *in vitro*.^{68,70,85,148} Dans notre étude, la quantification de deux gènes communs à ces voies de signalisation, qui sont les gènes du récepteur de l'IGF-1 (R-IGF1) et du récepteur du substrat de l'insuline (IRS-1), montre une diminution significative du niveau d'expression des ARNm de R-IGF1 chez les hamsters CHF147 par rapport au hamster sain, alors que le niveau d'expression d'IRS-1 n'est pas modifié. L'analyse de l'expression de plusieurs gènes clés impliqués dans les voies de signalisation des MAPK et de la PI3K indique une diminution des niveaux en ARNm chez les hamsters CHF147 par rapport à un hamster sain. Mais le traitement par rhIGF-1 n'entraîne pas de variation des niveaux d'expression des gènes étudiés par rapport aux niveaux mesurés chez les hamsters non traités. En ce qui concerne les niveaux protéiques, ceux des hamsters CHF147 sont comparables aux niveaux des hamsters Sains et le traitement par rhIGF-1 ne modifie pas non plus les quantités des protéines étudiées. Seule la protéine Akt est présente en quantité plus importante chez les hamsters traités, ce qui reflète probablement la variabilité inter-individuelle plus qu'une réelle augmentation de la synthèse de la protéine. Ceci est confirmé par le fait que cette augmentation du niveau d'Akt n'est pas corrélée à une augmentation de son activation, étant donné que son niveau d'expression de sa forme phosphorylée n'est pas modifié par rapport au hamster non traité.

Ainsi, bien que les niveaux transcriptionnels des gènes impliqués dans les voies de signalisation moléculaires d'IGF-1 soient diminués chez les hamsters CHF147 par rapport à un hamster sain, les niveaux traductionnels ne sont pas modifiés. D'autre part, le traitement

par rhIGF-1 n'entraîne pas de variation de niveaux d'expression, ni au niveau transcriptionnel, ni au niveau traductionnel. Il est envisageable que l'activation des voies de signalisation d'IGF-1 nécessite une dose seuil qui n'a pas été atteinte au cours de notre traitement, celui-ci n'ayant pas augmenté le taux sérique d'IGF-1 chez les hamsters CHF147 traités. Un travail de Foncea *et coll.* a effectivement démontré que l'activation des différentes voies de signalisation d'IGF-1, dans des cardiomyocytes de rats nouveau-nés en culture, est dépendante de la dose d'IGF-1.⁷⁰ Il est également possible d'imaginer que l'induction des effets d'IGF-1 passe par l'activation de nouvelles cascades de signalisation moléculaires, dont les mécanismes restent à élucider. En effet, certains travaux semblent indiquer que l'expression d'un transgène IGF-1 dans le cœur ne permet pas d'activer Akt, mais active une voie alternative passant par la PDK1 et la protéine ribosomale S6.¹⁷⁴

En revanche, il faut ici noter que les moyens techniques dont nous disposons pour cette étude n'ont pas permis l'analyse de certaines des protéines impliquées dans ces voies de signalisation, et notamment IRS-1 et sa forme phosphorylée, les formes phosphorylées des protéines ERK ou encore la sous-unité catalytique de la PI3K. Il semble donc difficile de conclure de manière catégorique sur l'état d'activation des voies de signalisation moléculaires d'IGF-1 après traitement avec la protéine recombinante.

Au niveau fonctionnel, nous avons observé une préservation de la fonction myocardique après traitement par IGF-1, grâce à une augmentation de la contractilité (dP/dt_{max}) et de la relaxation (dP/dt_{min}) dans le groupe traité avec la protéine rhIGF-1, par rapport aux groupes Non traités et Sham.

La préservation de la fonction contractile du cœur chez les animaux traités pourrait, tout d'abord, être expliquée par un meilleur maintien de la structure myocardique, notamment par un ralentissement de l'extension de la fibrose myocardique et/ou par une préservation des protéines du cytosquelette non contractile. L'analyse immunohistochimique du collagène indique effectivement que les animaux traités avec la protéine rhIGF-1 ont une cicatrice fibrotique moins importante que les hamsters non traités, ce qui est confirmé par la quantification de la fibrose sur coupes de cœurs colorées au rouge Sirius. Le traitement par rhIGF-1 permet donc de ralentir l'extension de la fibrose dans les cœurs de hamsters CHF147. D'autre part, chez les animaux traités avec la protéine rhIGF-1, la dystrophine semble mieux préservée. En revanche, chez les hamsters CHF147, la dystrophine est partiellement perdue au niveau du sarcolemme. Ainsi, nous suggérons qu'à côté du défaut initial en δ -sarcoglycane, la perte secondaire des protéines associées au complexe des sarcoglycane, telles que la dystrophine, pourrait expliquer la dégradation secondaire de la fonction cardiaque chez les hamsters CHF147.

Une autre explication de la préservation de la contractilité et de la relaxation chez les hamsters traités avec la protéine rhIGF-1 pourrait être une meilleure préservation du cytosquelette contractile des cardiomyocytes. En effet, il est connu qu'IGF-1 permet la synthèse de protéines contractiles des myofibrilles cardiaques, et notamment la chaîne lourde de la myosine.^{158,228} Cependant, bien que les études immunohistochimiques de la myosine

sarcomérique et de la troponine I cardiaque semblent conforter cette hypothèse, les résultats des quantifications de leurs ARNm et de leurs protéines ne mettent pas en évidence d'effet du traitement par rhIGF-1. En effet, dans le cas de la myosine sarcomérique, la quantification des ARNm indique une diminution drastique de l'expression du gène chez les hamsters CHF147 qui n'est pas modifiée par le traitement par rhIGF-1. L'analyse par Western blot montre un profil de dégradation protéolytique de la protéine chez les hamsters CHF147, qu'ils soient traités ou non avec la protéine rhIGF-1, profil qui n'est pas observé chez le hamster sain. Ainsi, il semblerait que la préservation de la contractilité myocardique observée après le traitement par rhIGF-1 ne passe pas par une diminution de la dégradation de la myosine. Ces résultats indiquent d'autre part qu'il est indispensable d'associer plusieurs techniques d'analyse, étant donné que l'analyse immunohistochimique seule n'aurait pas permis de détecter d'anomalies au niveau de la myosine. En ce qui concerne la troponine I cardiaque, le pourcentage d'expression du gène chez les hamsters CHF147 est significativement diminué par rapport à celui du hamster sain et il n'est pas modifié par le traitement par rhIGF-1. A l'inverse, le niveau d'expression de la protéine chez les hamsters CHF147 est comparable à celui d'un hamster sain. Ce résultat est en accord avec les données de Malhotra qui avait montré une réduction des sous-unités de troponine I et C dans les complexes troponine – tropomyosine de muscles squelettiques de hamsters cardiomyopathes (lignées BIO 53.58 et TO), mais seulement de très faibles variations des troponines I et C dans les complexes isolés à partir de leurs muscles cardiaques.¹²⁶ Pour finir, tout comme dans le cas de la myosine sarcomérique, le traitement par la protéine rhIGF-1 n'a pas d'effet sur le niveau d'expression de la troponine I cardiaque.

Il est connu depuis de nombreuses années que les cardiomyocytes des hamsters cardiomyopathes présentent des altérations au niveau du cycle du calcium. En 1988, une étude de Whitmer *et coll.* a notamment montré une diminution de la quantité de calcium absorbée par le réticulum sarcoplasmique (RS), ainsi que de sa vitesse d'absorption, chez des hamsters cardiomyopathes (lignée dilatée BIO 53.58), qui correspondrait à une diminution, soit du volume du RS, soit du nombre de sites de transport du calcium au niveau du RS, sans modification de l'activité spécifique des enzymes de transport. Leur hypothèse est qu'une diminution du nombre de sites du RS transportant le calcium serait en accord avec le ralentissement de la vitesse de relaxation observé chez ces hamsters.²¹⁷ La dernière hypothèse permettant d'expliquer la préservation de la fonction cardiaque contractile après traitement par rhIGF-1 pourrait être l'induction d'effets bénéfiques au niveau de la régulation du cycle du calcium. En conclusion de leur étude des effets d'un traitement par IGF-1 dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le porc, Kotlyar *et coll.* proposent que l'amélioration de la fonction myocardique causée par l'administration d'IGF-1 puisse être au moins partiellement expliquée par une augmentation de la disponibilité du calcium dans les cardiomyocytes.¹¹³ Il semblerait, effectivement, qu'IGF-1 est capable de moduler l'expression de différents canaux ioniques impliqués dans l'homéostasie calcique.¹⁵⁸

Notre étude portant sur certains éléments régulateurs du cycle du calcium n'a pas montré d'effet du traitement par rhIGF-1 sur la régulation de leurs niveaux d'expression en ARNm, mais des effets sur les niveaux protéiques. Dès les années 1970, des études ont mis en évidence que les cardiomyocytes des hamsters cardiomyopathes présentent des anomalies au niveau des acteurs impliqués dans l'homéostasie du calcium. En effet, ces cardiomyocytes présentent, entre autres, une diminution de la fonction du RS et une accumulation de calcium dans le cytoplasme.^{20,217} Nos résultats obtenus chez les hamsters CHF147, montrant une diminution d'expression des gènes et des protéines impliquées dans le cycle du calcium, sont en accord avec les données de la littérature. Nous avons également montré que le traitement par rhIGF-1 permet d'atténuer les anomalies observées chez les animaux non traités, en préservant l'expression de certains acteurs du cycle du calcium, notamment RyR et SERCA2a, qui régulent la circulation du calcium entre le RS et le cytoplasme. Bien que notre étude ne nous donne pas d'indication directe sur ce point, il est possible d'imaginer que la mesure du contenu en calcium intracellulaire montrerait une diminution de celui-ci après traitement par rhIGF-1. D'autre part, notre étude reste incomplète, du fait du manque d'outils disponibles. Il aurait, par exemple, pu être intéressant d'étudier le niveau de phosphorylation du phospholamban.

Cependant, nos résultats sont en accord avec les résultats publiés par von Lewinski *et coll.* qui ont montré que l'effet inotrope positif d'IGF-1 est associé à une augmentation du courant calcique intracellulaire dans les myocytes humains.²⁰⁵ Sun *et coll.* ont également mis en évidence qu'IGF-1 peut augmenter le courant calcique de type L grâce à une augmentation d'Akt dépendante de la PI3K.¹⁸⁹ De plus, Kinugawa *et coll.* ont démontré que le traitement par IGF-1 a un effet inotrope direct sur les cardiomyocytes qui est dépendant d'une augmentation de la quantité de calcium disponible au niveau de l'appareil contractile et n'est pas due à une augmentation de la sensibilité des myofilaments au calcium.¹⁰⁹

Nous avons donc montré que le traitement pendant un temps court avec une faible dose de protéine recombinante humaine rhIGF-1 permet, à court terme, de ralentir le processus de dilatation cardiaque et de préserver la fonction myocardique dans notre modèle animal de CMD. Mais qu'en est-il des effets à long terme ? En effet, bien que de nombreuses études se soient intéressées aux effets d'un traitement par l'IGF-1 à court terme dans l'insuffisance cardiaque, aucune n'a étudié la persistance des effets bénéfiques d'un tel traitement à long terme.

En 1984, lors de la caractérisation de la lignée de hamsters CHF147, Hunter *et coll.* avaient observé une survie moyenne de 350 jours.⁹⁴ La population de hamsters CHF147 élevés à l'Institut de Myologie présente en moyenne une survie de 50% à 320 jours (min. ~50 jours, max. ~480 jours) ce qui n'est pas différent des données publiées par Hunter. Dans notre étude, les hamsters du groupe Sham survivent en moyenne 405 jours, valeur qui est comprise dans l'intervalle habituel. Mais la survie moyenne des animaux inclus dans l'étude est augmentée par rapport à celle de notre population. Ceci peut s'expliquer par de meilleures conditions d'hébergement, notamment le fait que chacun des animaux de l'étude

de survie ait été hébergé de manière individuelle, alors que les autres hamsters de notre élevage sont hébergés en groupes. Le résultat majeur de cette partie de l'étude est que l'administration systémique de protéine rhIGF-1 induit un effet bénéfique significatif sur la survie de hamsters CHF147. En effet, les animaux traités présentent une amélioration significative de la survie moyenne de 20% par rapport aux hamsters du groupe Sham. De plus, il est intéressant de noter que la moitié des hamsters traités étaient encore en vie à un âge auquel tous les hamsters du groupe Sham étaient morts. Ainsi, un traitement court par la protéine recombinante rhIGF-1 permet de rallonger la durée de vie moyenne des hamsters CHF147.

L'augmentation de la survie moyenne dans le groupe rhIGF-1 peut s'expliquer par un retardement de la dilatation cardiaque associé à une préservation de la fonction du myocarde. La détérioration de la dilatation cardiaque chez les hamsters Sham est confirmée par l'augmentation des diamètres ventriculaires gauches en fin de diastole et en fin de systole. Chez les hamsters du groupe rhIGF-1, la dilatation cardiaque est ralentie. En effet, l'augmentation des diamètres ventriculaires gauches en fin de diastole et en fin de systole est moindre que celle du groupe Sham. De plus, la fonction du ventricule gauche a été évaluée par la mesure de la fraction de raccourcissement. Les animaux du groupe Sham présentent une diminution de leur fraction de raccourcissement, qui est une caractéristique des hamsters CHF147 et traduit une altération de la fonction ventriculaire gauche. A l'inverse, celle des hamsters du groupe rhIGF-1 est mieux préservée que celle du groupe Sham, démontrant ainsi une meilleure préservation de la fonction du ventricule gauche. Le traitement court des hamsters CHF147 avec la protéine rhIGF-1 permet donc de maintenir la fonction cardiaque, induisant ainsi un allongement de la durée de vie des hamsters CHF147.

La préservation de la fonction cardiaque après traitement par rhIGF-1 est également confirmée par la mesure de la variabilité du rythme cardiaque par électrocardiographie. La variabilité du rythme cardiaque donne des informations sur l'état fonctionnel du système nerveux autonome. Au cours de la pathologie chez le hamster cardiomyopathe, la variabilité du rythme cardiaque est altérée.⁷⁶ Le système nerveux autonome joue un rôle majeur en affectant l'environnement cardiaque et en induisant une activité ventriculaire anormale. Le fort taux de mortalité retrouvé dans l'insuffisance cardiaque est associé à des anomalies hémodynamiques, une capacité réduite à l'exercice et une fonction cardiaque diminuée.⁶ Plus spécifiquement, l'insuffisance cardiaque est associée à une altération de la variabilité du rythme cardiaque. Nos données démontrent que la variabilité du rythme cardiaque peut être préservée, dans une certaine mesure, par un traitement court avec la protéine recombinante IGF-1.

Les résultats de notre étude histologique sur l'évolution de la pathologie au cours de la vie des hamsters CHF147 sont en accord avec les observations faites par Hunter *et coll.*⁹⁴ Les colorations histologiques de coupes de cœurs de hamsters CHF147 montrent une détérioration progressive de la structure myocardique. Au moment de la mort, aucune différence structurelle n'a pu être mise en évidence entre les coupes de cœurs des hamsters du groupe

rhIGF-1 et celles du groupe Sham. Cependant, les animaux traités avec la protéine rhIGF-1 présentent, après le traitement, une modification transitoire qui conduit à une augmentation de la survie. De manière attendue, la CMD reste la cause de mortalité chez les hamsters CHF147 traités avec la protéine recombinante, mais le traitement permet de prolonger la durée de vie des animaux.

L'analyse morphologique, réalisée par la mesure hebdomadaire des poids corporels des hamsters inclus dans l'étude, n'a montré aucun effet de la protéine rhIGF-1 sur ce paramètre. Ceci peut s'expliquer par l'utilisation d'une faible dose d'IGF-1 n'ayant pas augmenté le niveau sérique de la protéine. Ainsi, nous n'attendions pas de variation significative de la masse musculaire des animaux traités par rapport à celle des animaux non traités. La cachexie, qui est caractérisée par la perte de poids, la perte musculaire, l'augmentation de la fatiguabilité, la faiblesse et la perte d'appétit, est souvent associée à l'insuffisance cardiaque. Cependant, il semble ici difficile de distinguer la cachexie associée à l'insuffisance cardiaque de celle due à la myopathie des hamsters CHF147. Dans cette étude, les hamsters des groupes Sham et rhIGF-1 perdent du poids dans les mêmes proportions, bien qu'au moment de la mort, les animaux traités avec la protéine IGF-1 étaient plus maigres que ceux du groupe Sham, du fait de leur espérance de vie prolongée.

Les mesures sériques des niveaux d'IGF-1 n'ont pas montré de différences entre les hamsters Sains et CHF147. De plus, nous n'avons pas détecté de différences après la délivrance systémique de rhIGF-1, ni de manière précoce après le début du traitement, ni au moment de la mort. Ceci est probablement dû à l'utilisation d'une faible dose de protéine recombinante. Toutefois, les données disponibles dans la littérature sont difficiles à comparer du fait de l'administration de doses variables et de l'utilisation de différents modèles animaux. A des doses modérées ou élevées, le niveau d'IGF-1 dans le sang est significativement augmenté.^{53,60,116,159} A l'inverse, une étude réalisée par Adams & McCue a montré que l'infusion du tibialis antérieur de rat avec une faible dose de protéine rhIGF-1 n'augmente pas la concentration d'IGF-1 circulant et permet d'induire une hypertrophie au niveau du muscle étudié.³ Ainsi, l'utilisation d'une faible dose d'IGF-1 semble être capable d'induire des effets bénéfiques sans augmenter le niveau sérique, ce qui est en accord avec nos résultats. Nous avons mis ici en évidence que, chez les hamsters, un niveau sérique normal d'IGF-1 complété par une faible dose de rhIGF-1 peut induire des améliorations phénotypiques de la CMD.

Ainsi, nous avons pu montrer qu'un traitement limité dans le temps basé sur l'administration d'une faible dose d'IGF-1 peut induire des effets bénéfiques à long terme sur l'évolution de la CMD chez les hamsters CHF147.

L'administration systémique d'IGF-1 peut entraîner des effets secondaires extracardiaques. Jacquemin *et coll.* ont, en particulier, montré sur des cultures de myoblastes humains, qu'IGF-1 induit une hypertrophie des myotubes notamment en augmentant le recrutement de cellules satellites.¹⁰¹ Afin d'éviter l'apparition de tels effets secondaires indésirables, nous avons décidé de cibler le cœur en injectant directement dans le myocarde un plasmide d'ADN codant pour l'IGF-1. De manière attendue, aucune différence entre les

niveaux sériques en IGF-1 chez les animaux injectés et les animaux non injectés n'a pu être détectée. Ce résultat est en accord avec de précédentes observations réalisées chez des animaux ayant reçu de l'IGF-1 localement, soit dans le muscle squelettique, soit dans le cœur.^{35,191}

De même que l'administration de la protéine recombinante rhIGF-1, l'injection intramyocardique du plasmide pCMV-IGF1 permet de ralentir la dilatation cardiaque mais de manière plus significative. En effet, le diamètre cardiaque moyen des hamsters du groupe pCMV-IGF1 n'est pas significativement différent de celui du groupe Sains, ce qui n'était pas le cas du diamètre des hamsters du groupe rhIGF-1. Toutefois, le groupe pCMV-IGF1 montre une asymétrie au niveau de l'épaisseur de ses parois ventriculaires. La différence avec le groupe rhIGF-1 provient probablement du fait des deux méthodes d'administration utilisées, et aussi du fait que l'IGF-1 produit par le myocarde transfecté a une action spatialement limitée alors que la protéine rhIGF-1 est disponible dans tout le myocarde. Les hamsters du groupe pCMV-IGF1 ont, tout comme les hamsters traités avec la protéine rhIGF-1, une structure myocardique préservée et présentent, de plus, une diminution de la fibrose myocardique significative par rapport au groupe Non traités, ce qui n'était pas le cas des hamsters du groupe rhIGF-1.

Au niveau fonctionnel, nous avons noté une tendance à l'augmentation du débit cardiaque dans le groupe pCMV-IGF1 par rapport au groupe Non traités mais pas de différence significative par rapport au groupe Sham. Etant donné que la fréquence cardiaque n'est pas différente entre les groupes non traités et traités, l'amélioration du débit est due à une augmentation du volume d'éjection. De plus, nous avons observé une tendance à l'augmentation de la contractilité (dp/dt_{max}) et de la relaxation (dp/dt_{min}) dans le groupe pCMV-IGF1 par rapport au groupe Sham. L'amélioration de la contractilité cardiaque dans le groupe pCMV-IGF1 est également visible sur les courbes pression/volume et est matérialisée par une augmentation de la pente de la droite ESPVR. Chez les hamsters CHF147, la diminution de la contractilité cardiaque, reflétée par la diminution de la pente de la droite ESPVR peut avoir plusieurs explications. Tout d'abord, elle peut être due à une réduction du nombre d'unités contractiles, c'est-à-dire de cardiocytes, qui se manifeste par la diminution de la masse musculaire cardiaque, observée chez nos animaux. Ensuite, elle peut être expliquée par une baisse de la capacité contractile des cardiocytes restants. Deux phénomènes peuvent en être responsables : soit une diminution du nombre d'unités sarcomériques, ce qui est appuyé par notre observation de la dégradation de la myosine ; soit une altération au niveau du cytosquelette non contractile entraînant un défaut dans l'accrochage du sarcomère au sarcolemme et conduisant à une diminution de la transmission de la force contractile, ce qui est confirmé par la perte totale de la dystrophine, probablement due à une dégradation enzymatique. En effet, toutes les protéines du DAPC étant intimement liées, le déficit en δ -sarcoglycane entraîne l'absence du complexe des sarcoglycanes et résulte en une déstabilisation du complexe de la dystrophine et de ses protéines associées et peut-être, également, une augmentation de la perméabilité membranaire. Enfin, la diminution de la

contractilité chez les hamsters CHF147 peut traduire une augmentation de l'extension des lésions tissulaires, dans lesquelles les cardiomyocytes sont remplacés par de la nécrose évoluant vers la fibrose. Ainsi, la diminution du nombre de cardiocytes, l'altération du sarcomère et du cytosquelette non contractile ainsi que le développement des lésions tissulaires conduisent à une réduction de la transmission de la force de contraction dans les cardiomyocytes des hamsters CHF147. L'amélioration de la contractilité chez les animaux injectés avec le plasmide pCMV-IGF1 peut être expliquée en partie par une meilleure préservation du complexe des protéines associées la dystrophine, dont le mécanisme exact reste à déterminer, et par un ralentissement de l'évolution des lésions tissulaires et de l'extension de la fibrose. Il serait intéressant d'étudier les voies de signalisation, et notamment celle impliquée dans l'homéostasie calcique, chez les hamsters ayant reçu le plasmide pCMV-IGF1.

L'approche par thérapie génique, de manière comparable à l'approche utilisant la protéine recombinante, permet donc de ralentir l'évolution de la CMD chez les hamsters CHF147, à la fois au niveau structurel et au niveau fonctionnel. Nos résultats montrent également qu'il est possible de modifier le fonctionnement du muscle cardiaque sans être dans l'obligation de le traiter dans son intégralité.

PERSPECTIVES

En conclusion, ce travail de thèse a montré l'intérêt de l'IGF-1 comme candidat pour le traitement de l'insuffisance cardiaque due à une cardiomyopathie dilatée, dans le contexte des dystrophies musculaires. Il ouvre donc de nouvelles perspectives, et deux aspects, l'un ayant trait aux mécanismes moléculaires mis en jeu et l'autre, à l'optimisation du traitement, me semblent importants à étudier dans l'avenir.

En ce qui concerne l'aspect fondamental, les résultats obtenus au cours de cette étude ont, en effet, indiqué l'importance d'approfondir l'analyse des voies de signalisation moléculaires impliquées dans l'induction des effets bénéfiques du traitement par IGF-1. En particulier, il apparaît indispensable de s'intéresser, de manière plus fine, à la physiologie du calcium dans les cardiomyocytes des hamsters traités avec la protéine recombinante afin de valider notre hypothèse.

Pour ce qui est de l'aspect thérapeutique plusieurs questions restent en suspens. J'ai, d'une part, mis en évidence qu'il est possible d'obtenir des effets bénéfiques sur l'évolution de la cardiomyopathie dilatée en administrant une faible dose de protéine recombinante mais il me semble important de définir la dose thérapeutique optimale dans le contexte pathologique qui nous intéresse ici. D'autre part, j'ai pu montrer qu'un traitement limité dans le temps permet d'observer un effet thérapeutique, cependant il me paraît nécessaire d'optimiser la durée de ce traitement. Enfin, deux aspects concernant l'âge de traitement et la fréquence d'administration pourraient également être étudiés. Par exemple, pourrait-on observer des effets bénéfiques comparables à ceux obtenus chez les hamsters jeunes en traitant des animaux à un stade plus avancé de la pathologie ? Serait-il possible d'améliorer l'efficacité du traitement en délivrant la protéine recombinante de manière itérative ? Dans le cas de l'approche par thérapie génique, il me paraîtrait intéressant de vérifier si les effets à long terme sont comparables à ceux obtenus après l'administration de la protéine recombinante. Il serait également envisageable de remplacer le promoteur ubiquitaire par un promoteur spécifique du tissu cardiaque afin de restreindre l'expression du transgène au cœur et de ne pas induire d'effets délétères extra-cardiaques. Au cours de cette étude, le gène de l'IGF-1 a été délivré par injection directe d'un plasmide dans le cœur mais il semble indispensable de développer un vecteur, viral ou non viral, qui soit à la fois sûr, efficace et spécifique.

Pour finir, je me suis attachée, au cours de ma thèse, à développer une nouvelle approche thérapeutique. L'aboutissement ultime de ce travail serait donc d'être à la base de la mise en place d'essais cliniques chez l'Homme et de permettre, peut-être dans quelques années (!), la mise sur le marché d'un médicament pour une nouvelle application thérapeutique que celle connue aujourd'hui pour l'IGF-1.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. American Heart Association. Site Internet de la Société Américaine de Cardiologie. <http://www.americanheart.org>
2. **ADAMO, ML, NEUENSCHWANDER, S, LEROITH, D, et al.** Structure, expression, and regulation of the IGF-I gene. *Adv Exp Med Biol*, 1993, vol. 343, p.1-11.
3. **ADAMS, GR and MCCUE, SA.** Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. *J Appl Physiol*, 1998, vol. 84, n°5, p.1716-1722.
4. **ADAMS, ME, BUTLER, MH, DWYER, TM, et al.** Two forms of mouse syntrophin, a 58 kd dystrophin-associated protein, differ in primary structure and tissue distribution. *Neuron*, 1993, vol. 11, n°3, p.531-540.
5. **ADAMS, ME, MUELLER, HA and FROEHNER, SC.** In vivo requirement of the {alpha}-syntrophin PDZ domain for the sarcolemmal localization of nNOS and aquaporin-4. *J Cell Biol*, 2001, vol. 155, n°1, p.113-122.
6. **ADAMSON, PB, SMITH, AL, ABRAHAM, WT, et al.** Continuous autonomic assessment in patients with symptomatic heart failure: prognostic value of heart rate variability measured by an implanted cardiac resynchronization device. *Circulation*, 2004, vol. 110, n°16, p.2389-2394.
7. **AHN, A, YOSHIDA, M, ANDERSON, M, et al.** Cloning of Human Basic A1, a Distinct 59-kDa Dystrophin-Associated Protein Encoded on Chromosome 8q23-24. *PNAS*, 1994, vol. 91, n°10, p.4446-4450.
8. **AHN, AH, FREENER, CA, GUSSONI, E, et al.** The Three Human Syntrophin Genes Are Expressed in Diverse Tissues, Have Distinct Chromosomal Locations, and Each Bind to Dystrophin and Its Relatives. *J Biol Chem*, 1996, vol. 271, n°5, p.2724-2730.
9. **ALBERTS, B, JOHNSON, A, LEWIS, J, et al.** Chapter 16. The Cytoskeleton. In: *Molecular Biology of the Cell*, Fourth Ed. par Garland Science New York and London: 2002.
10. **ALESSI, DR and COHEN, P.** Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, vol. 8, n°1, p.55-62.
11. **ALLAMAND, V and CAMPBELL, KP.** Animal models for muscular dystrophy: valuable tools for the development of therapies. *Hum Mol Genet*, 2000, vol. 9, n°16, p.2459-2467.
12. **ANWAR, A, GASPOZ, JM, PAMPALLONA, S, et al.** Effect of congestive heart failure on the insulin-like growth factor-1 system. *Am J Cardiol*, 2002, vol. 90, n°12, p.1402-1405.
13. **AUMAILLEY, M, BRUCKNER-TUDERMAN, L, CARTER, WG, et al.** A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biology*, 2005, vol. 24, n°5, p.326-332.

14. **AVRUCH, J, KHOKHLATCHEV, A, KYRIAKIS, JM, et al.** Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res*, 2001, vol. 56, p.127-155.
15. **BARRESI, R, MOORE, SA, STOLLE, CA, et al.** Expression of gamma - Sarcoglycan in Smooth Muscle and Its Interaction with the Smooth Muscle Sarcoglycan-Sarcospan Complex. *J Biol Chem*, 2000, vol. 275, n°49, p.38554-38560.
16. **BARRESI, R and CAMPBELL, KP.** Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J Cell Sci*, 2006, vol. 119, n°2, p.199-207.
17. **BETTO, R, SENTER, L, CEOLDO, S, et al.** Ecto-ATPase activity of alpha-sarcoglycan (adhelin). *J Biol Chem*, 1999, vol. 274, n°12, p.7907-7912.
18. **BLAKE, DJ, WEIR, A, NEWEY, SE, et al.** Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle. *Physiol Rev*, 2002, vol. 82, n°2, p.291-329.
19. **BODINE, SC, STITT, TN, GONZALEZ, M, et al.** Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol*, 2001, vol. 3, n°11, p.1014-1019.
20. **BOND, M, JARAKI, AR, DISCH, CH, et al.** Subcellular calcium content in cardiomyopathic hamster hearts in vivo: an electron probe study. *Circ Res*, 1989, vol. 64, n°5, p.1001-1012.
21. **BONNEMANN, C, PASSOS-BUENO, M, MCNALLY, E, et al.** Genomic screening for beta-sarcoglycan gene mutations: missense mutations may cause severe limb-girdle muscular dystrophy type 2E (LGMD 2E). *Hum Mol Genet*, 1996, vol. 5, n°12, p.1953-1961.
22. **BONNEMANN, CG, MODI, R, NOGUCHI, S, et al.** Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat Genet*, 1995, vol. 11, n°3, p.266-273.
23. **BONNEMANN, CG and FINKEL, RS.** Sarcolemmal proteins and the spectrum of limb-girdle muscular dystrophies. *Semin Pediatr Neurol*, 2002, vol. 9, n°2, p.81-99.
24. **BRENMAN, JE, CHAO, DS, XIA, H, et al.** Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, 1995, vol. 82, n°5, p.743-752.
25. **BROGLIO, F, FUBINI, A, MORELLO, M, et al.** Activity of GH/IGF-I axis in patients with dilated cardiomyopathy. *Clinical Endocrinology*, 1999, vol. 50, n°4, p.417-430.
26. **BUERKE, M, MUROHARA, T, SKURK, C, et al.** Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, vol. 92, n°17, p.8031-8035.
27. **BUSHBY, K, MUNTONI, F and BOURKE, JP.** 107th ENMC International Workshop: the management of cardiac involvement in muscular dystrophy and

- myotonic dystrophy. 7th-9th June 2002, Naarden, the Netherlands. *Neuromuscular Disorders*, 2003, vol. 13, n°2, p.166-172.
28. **BUSHBY, KM.** The limb-girdle muscular dystrophies-multiple genes, multiple mechanisms. *Hum Mol Genet*, 1999, vol. 8, n°10, p.1875-1882.
 29. **BUSHBY, KMD and BECKMANN, JS.** 30th and 31st ENMC international workshops, Naarden, The Netherlands, Held 6-8 January 1995. *Neuromuscular Disorders*, 1995, vol. 5, n°4, p.337-343.
 30. **BUSHBY, KMD.** Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies. *Brain*, 1999, vol. 122, n°8, p.1403-1420.
 31. **CAMPBELL, KP and KAHL, SD.** Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature*, 1989, vol. 338, n°6212, p.259-262.
 32. **CAMPBELL, KP.** Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell*, 1995, vol. 80, n°5, p.675-679.
 33. **CECI, M, ROSS, J, JOHN and CONDORELLI, G.** Molecular determinants of the physiological adaptation to stress in the cardiomyocyte: a focus on AKT. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2004, vol. 37, n°5, p.905-912.
 34. **CHAN, Y-M, BONNEMANN, CG, LIDOV, HGW, et al.** Molecular Organization of Sarcoglycan Complex in Mouse Myotubes in Culture. *J Cell Biol*, 1998, vol. 143, n°7, p.2033-2044.
 35. **CHAO, W, MATSUI, T, NOVIKOV, MS, et al.** Strategic advantages of insulin-like growth factor-I expression for cardioprotection. *J Gene Med*, 2003, vol. 5, n°4, p.277-286.
 36. **CHEMLA, D, SCALBERT, E, DESCHE, P, et al.** [Cardiomyopathy in the Syrian hamster. Physiological and therapeutic aspects]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 1991, vol. 84 Spec No 4, p.85-87.
 37. **CHEN, J, SHI, W, ZHANG, Y, et al.** Identification of functional domains in sarcoglycans essential for their interaction and plasma membrane targeting. *Exp Cell Res*, 2006, vol. 312, n°9, p.1610-1625.
 38. **COHN, RD and CAMPBELL, KP.** Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve*, 2000, vol. 23, n°10, p.1456-1471.
 39. **COHN, RD.** Dystroglycan: important player in skeletal muscle and beyond. *Neuromuscul Disord*, 2005, vol. 15, n°3, p.207-217.
 40. **COLAO, A, SOMMA, CD, SAVANELLI, MC, et al.** Beginning to end: Cardiovascular implications of growth hormone (GH) deficiency and GH therapy. *Growth Hormone & IGF Research*, 2006, vol. 16, n°Supplement 1, p.41-48.
 41. **CORAL-VAZQUEZ, R, COHN, RD, MOORE, SA, et al.** Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell*, 1999, vol. 98, n°4, p.465-474.
 42. **COTE, PD, MOUKHLES, H and CARBONETTO, S.** Dystroglycan is not required for localization of dystrophin, syntrophin, and neuronal nitric-oxide synthase at the

- sarcolemma but regulates integrin alpha 7B expression and caveolin-3 distribution. *J Biol Chem*, 2002, vol. 277, n°7, p.4672-4679.
43. **CRESPO, MJ, ALTIERI, PI and ESCOBALES, N.** Altered vascular function in early stages of heart failure in hamsters. *Journal of Cardiac Failure*, 1997, vol. 3, n°4, p.311-318.
 44. **CROSBIE, RH, HEIGHWAY, J, VENZKE, DP, et al.** Sarcospan, the 25-kDa Transmembrane Component of the Dystrophin-Glycoprotein Complex. *J Biol Chem*, 1997, vol. 272, n°50, p.31221-31224.
 45. **CROSBIE, RH, YAMADA, H, VENZKE, DP, et al.** Caveolin-3 is not an integral component of the dystrophin glycoprotein complex. *FEBS Letters*, 1998, vol. 427, n°2, p.279-282.
 46. **CROSBIE, RH, LEBAKKEN, CS, HOLT, KH, et al.** Membrane targeting and stabilization of sarcospan is mediated by the sarcoglycan subcomplex. *J Cell Biol*, 1999, vol. 145, n°1, p.153-165.
 47. **CROSBIE, RH, LIM, LE, MOORE, SA, et al.** Molecular and genetic characterization of sarcospan: insights into sarcoglycan-sarcospan interactions. *Hum Mol Genet*, 2000, vol. 9, n°13, p.2019-2027.
 48. **CROSBIE, RH, BARRESI, R and CAMPBELL, KP.** Loss of sarcolemma nNOS in sarcoglycan-deficient muscle. *FASEB J*, 2002, vol. 16, n°13, p.1786-1791.
 49. **DELAUGHTER, MC, TAFFET, GE, FIOROTTO, ML, et al.** Local insulin-like growth factor I expression induces physiologic, then pathologic, cardiac hypertrophy in transgenic mice. *Faseb J*, 1999, vol. 13, n°14, p.1923-1929.
 50. **D'ERCOLE, AJ, STILES, AD and UNDERWOOD, LE.** Tissue Concentrations of Somatomedin C: Further Evidence for Multiple Sites of Synthesis and Paracrine or Autocrine Mechanisms of Action. *PNAS*, 1984, vol. 81, n°3, p.935-939.
 51. Center for Human and Clinical Genetics, Leiden University Medical Center, Leiden Muscular Dystrophy pages. Site Internet de l'Université de Leiden (Pays-Bas) sur les dystrophies musculaires. <http://www.dmd.nl/>
 52. **DONATH, MY, FROESCH, ER and ZAPF, J.** Insulin-like growth factor I and cardiac performance in heart failure. *Growth Horm IGF Res*, 1998, vol. 8 Suppl B, p.167-170.
 53. **DONATH, MY, SUTSCH, G, YAN, XW, et al.** Acute cardiovascular effects of insulin-like growth factor I in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, vol. 83, n°9, p.3177-3183.
 54. **DONATH, MY, ZIERHUT, W, GOSTELI-PETER, MA, et al.** Effects of IGF-I on cardiac growth and expression of mRNAs coding for cardiac proteins after induction of heart hypertrophy in the rat. *Eur J Endocrinol*, 1998, vol. 139, n°1, p.109-117.
 55. **DONATH, MY and ZAPF, J.** Insulin-like growth factor I: an attractive option for chronic heart failure? *Drugs Aging*, 1999, vol. 15, n°4, p.251-254.

56. **DORN, GW, 2ND and FORCE, T.** Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest*, 2005, vol. 115, n°3, p.527-537.
57. **DRESSMAN, D, ARAISHI, K, IMAMURA, M, et al.** Delivery of alpha- and beta-sarcoglycan by recombinant adeno-associated virus: efficient rescue of muscle, but differential toxicity. *Hum Gene Ther*, 2002, vol. 13, n°13, p.1631-1646.
58. **DUBOC, D, MEUNE, C, LEREBOURS, G, et al.** Effect of perindopril on the onset and progression of left ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of the American College of Cardiology*, 2005, vol. 45, n°6, p.855-857.
59. **DUBOWITZ, V.** The muscular dystrophies--clarity or chaos? *N Engl J Med*, 1997, vol. 336, n°9, p.650-651.
60. **DUERR, RL, HUANG, S, MIRALIAKBAR, HR, et al.** Insulin-like growth factor-1 enhances ventricular hypertrophy and function during the onset of experimental cardiac failure. *J Clin Invest*, 1995, vol. 95, n°2, p.619-627.
61. **DURBEEJ, M and CAMPBELL, KP.** Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2002, vol. 12, n°3, p.349-361.
62. **ERVASTI, JM, OHLENDIECK, K, KAHL, SD, et al.** Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature*, 1990, vol. 345, n°6273, p.315-319.
63. **ERVASTI, JM and CAMPBELL, KP.** Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell*, 1991, vol. 66, n°6, p.1121-1131.
64. **ERVASTI, JM and CAMPBELL, KP.** A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol*, 1993, vol. 122, n°4, p.809-823.
65. **ESC.** Recommandations pour le diagnostic et le traitement de l'insuffisance cardiaque chronique. Diagnostic de l'insuffisance cardiaque chronique. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 2002, vol. 95 Spec 2, n°5 Spec 2, p.5-53.
66. **ETTINGER, AJ, FENG, G and SANES, JR.** epsilon-Sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J Biol Chem*, 1997, vol. 272, n°51, p.32534-32538.
67. **FACTOR, SM, MINASE, T, CHO, S, et al.** Microvascular spasm in the cardiomyopathic Syrian hamster: a preventable cause of focal myocardial necrosis. *Circulation*, 1982, vol. 66, n°2, p.342-354.
68. **FAZIO, S, PALMIERI, EA, BIONDI, B, et al.** The role of the GH-IGF-I axis in the regulation of myocardial growth: from experimental models to human evidence. *Eur J Endocrinol*, 2000, vol. 142, n°3, p.211-216.
69. **FLORINI, JR, EWTON, DZ and COOLICAN, SA.** Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev*, 1996, vol. 17, n°5, p.481-517.

70. **FONCEA, R, ANDERSSON, M, KETTERMAN, A, et al.** Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 1997, vol. 272, n°31, p.19115-19124.
71. **FRANZ, WM, MULLER, OJ and KATUS, HA.** Cardiomyopathies: from genetics to the prospect of treatment. *Lancet*, 2001, vol. 358, n°9293, p.1627-1637.
72. **FREY, N, MCKINSEY, TA and OLSON, EN.** Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat Med*, 2000, vol. 6, n°11, p.1221-1227.
73. **FULLER, SJ, MYNETT, JR and SUGDEN, PH.** Stimulation of cardiac protein synthesis by insulin-like growth factors. *Biochem J*, 1992, vol. 282 (Pt 1), p.85-90.
74. **GEE, SH, BLACHER, RW, DOUVILLE, PJ, et al.** Laminin-binding protein 120 from brain is closely related to the dystrophin-associated glycoprotein, dystroglycan, and binds with high affinity to the major heparin binding domain of laminin. *J Biol Chem*, 1993, vol. 268, n°20, p.14972-14980.
75. **GINJAAR, HB, VAN DER KOOL, AJ, CEELIE, H, et al.** Sarcoglycanopathies in Dutch patients with autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy. *J Neurol*, 2000, vol. 247, n°7, p.524-529.
76. **GIUDICE, PL, GAGNOL, JP, BELLUCCI, A, et al.** Autonomic nervous system activity imbalance in cardiomyopathic hamster. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2000, vol. 36, n°3, p.369-375.
77. **GLASS, DJ.** Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol Med*, 2003, vol. 9, n°8, p.344-350.
78. **GOODWIN, FC and MUNTONI, F.** Cardiac involvement in muscular dystrophies: molecular mechanisms. *Muscle Nerve*, 2005, vol. 32, n°5, p.577-588.
79. **HACK, AA, GROH, ME and MCNALLY, EM.** Sarcoglycans in muscular dystrophy. *Microscopy Research and Technique*, 2000, vol. 48, n°3-4, p.167-180.
80. **HALEEN, SJ, WEISHAAR, RE, OVERHISER, RW, et al.** Effects of quinapril, a new angiotensin converting enzyme inhibitor, on left ventricular failure and survival in the cardiomyopathic hamster. Hemodynamic, morphological, and biochemical correlates. *Circ Res*, 1991, vol. 68, n°5, p.1302-1312.
81. **HANADA, H, YOSHIDA, T, PAN, Y, et al.** mRNA expression and cDNA sequences of beta- and gamma-sarcoglycans are normal in cardiomyopathic hamster heart. *Biol Pharm Bull*, 1997, vol. 20, n°2, p.134-137.
82. **HASENFUSS, G and PIESKE, B.** Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, vol. 34, n°8, p.951-969.
83. **HAYASHI, K, WAKAYAMA, Y, INOUE, M, et al.** Sarcospan: ultrastructural localization and its relation to the sarcoglycan subcomplex. *Micron*, 2006, vol. 37, n°6, p.591-596.
84. **HEIMER, GV and TAYLOR, CE.** Improved mountant for immunofluorescence preparations. *J Clin Pathol*, 1974, vol. 27, n°3, p.254-256.

85. **HEINEKE, J and MOLKENTIN, JD.** Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, vol. 7, n°8, p.589-600.
86. **HEYDEMANN, A, WHEELER, MT and MCNALLY, EM.** Cardiomyopathy in animal models of muscular dystrophy. *Curr Opin Cardiol*, 2001, vol. 16, n°3, p.211-217.
87. **HEYDEMANN, A, HUBER, JM, KAKKAR, R, et al.** Functional nitric oxide synthase mislocalization in cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2004, vol. 36, n°2, p.213-223.
88. **HOLT, KH and CAMPBELL, KP.** Assembly of the sarcoglycan complex. Insights for muscular dystrophy. *J Biol Chem*, 1998, vol. 273, n°52, p.34667-34670.
89. **HOLT, KH, LIM, LE, STRAUB, V, et al.** Functional rescue of the sarcoglycan complex in the BIO 14.6 hamster using delta-sarcoglycan gene transfer. *Mol Cell*, 1998, vol. 1, n°6, p.841-848.
90. **HOMBURGER, F, BAKER, J, NIXON, C, et al.** Primary, generalized polymyopathy and cardiac necrosis in an inbred line of Syrian hamsters. *Med Exp*, 1962, vol. 6, p.339-345.
91. **HOMBURGER, F, BAKER, JR, NIXON, CW, et al.** New hereditary disease of Syrian hamsters. Primary, generalized polymyopathy and cardiac necrosis. *Arch Intern Med*, 1962, vol. 110, p.660-662.
92. **HOMBURGER, F, NIXON, CW, EPPENBERGER, M, et al.** Hereditary myopathy in the Syrian hamster: studies on pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 1966, vol. 138, n°1, p.14-27.
93. **HOMBURGER, F.** Myopathy of hamster dystrophy: history and morphologic aspects. *Ann N Y Acad Sci*, 1979, vol. 317, p.1-17.
94. **HUNTER, EG, HUGHES, V and WHITE, J.** Cardiomyopathic hamsters, CHF 146 and CHF 147: a preliminary study. *Can J Physiol Pharmacol*, 1984, vol. 62, n°11, p.1423-1428.
95. **IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA, O, ERVASTI, JM, LEVEILLE, CJ, et al.** Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*, 1992, vol. 355, n°6362, p.696-702.
96. **IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA, O, MILATOVICH, A, OZCELIK, T, et al.** Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization. *Hum Mol Genet*, 1993, vol. 2, n°10, p.1651-1657.
97. **IKEDA, Y and ROSS, J, JR.** Models of dilated cardiomyopathy in the mouse and the hamster. *Curr Opin Cardiol*, 2000, vol. 15, n°3, p.197-201.
98. **IKEDA, Y, GU, Y, IWANAGA, Y, et al.** Restoration of deficient membrane proteins in the cardiomyopathic hamster by in vivo cardiac gene transfer. *Circulation*, 2002, vol. 105, n°4, p.502-508.

99. **ISHIKAWA, Y, BACH, JR and MINAMI, R.** Cardioprotection for Duchenne's muscular dystrophy, . *American Heart Journal*, 1999, vol. 137, n°5, p.895-902.
100. **IWATA, Y, NAKAMURA, H, MIZUNO, Y, et al.** Defective association of dystrophin with sarcolemmal glycoproteins in the cardiomyopathic hamster heart. *FEBS Lett*, 1993, vol. 329, n°1-2, p.227-231.
101. **JACQUEMIN, V, FURLING, D, BIGOT, A, et al.** IGF-1 induces human myotube hypertrophy by increasing cell recruitment. *Exp Cell Res*, 2004, vol. 299, n°1, p.148-158.
102. **JEFFERIES, JL, EIDEM, BW, BELMONT, JW, et al.** Genetic Predictors and Remodeling of Dilated Cardiomyopathy in Muscular Dystrophy. *Circulation*, 2005, vol. 112, n°18, p.2799-2804.
103. **JONES, JI and CLEMMONS, DR.** Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*, 1995, vol. 16, n°1, p.3-34.
104. **KAMP, TJ and CHIAMVIMONVAT, N.** Mission impossible: IGF-1 and PTEN specifically "Akt"ing on cardiac L-type Ca²⁺ channels. *Circ Res*, 2006, vol. 98, n°11, p.1349-1351.
105. **KAWADA, T, NAKATSURU, Y, SAKAMOTO, A, et al.** Strain- and age-dependent loss of sarcoglycan complex in cardiomyopathic hamster hearts and its re-expression by delta- sarcoglycan gene transfer in vivo. *FEBS Lett*, 1999, vol. 458, n°3, p.405-408.
106. **KAWADA, T, SAKAMOTO, A, NAKAZAWA, M, et al.** Morphological and physiological restorations of hereditary form of dilated cardiomyopathy by somatic gene therapy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, vol. 284, n°2, p.431-435.
107. **KAWADA, T, NAKAZAWA, M, NAKAUCHI, S, et al.** Rescue of hereditary form of dilated cardiomyopathy by rAAV-mediated somatic gene therapy: amelioration of morphological findings, sarcolemmal permeability, cardiac performances, and the prognosis of TO- 2 hamsters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, vol. 99, n°2, p.901-906.
108. **KAYE, DM and KRUM, H.** Drug discovery for heart failure: a new era or the end of the pipeline? *Nat Rev Drug Discov*, 2007, vol. 6, n°2, p.127-139.
109. **KINUGAWA, S, TSUTSUI, H, IDE, T, et al.** Positive inotropic effect of insulin-like growth factor-1 on normal and failing cardiac myocytes. *Cardiovascular Research*, 1999, vol. 43, n°1, p.157-164.
110. **KLIETSCH, R, ERVASTI, JM, ARNOLD, W, et al.** Dystrophin-glycoprotein complex and laminin colocalize to the sarcolemma and transverse tubules of cardiac muscle. *Circ Res*, 1993, vol. 72, n°2, p.349-360.
111. **KOCICA, MJ, CORNO, AF, CARRERAS-COSTA, F, et al.** The helical ventricular myocardial band: global, three-dimensional, functional architecture of the ventricular myocardium. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2006, vol. 29, n°Supplement 1, p.S21-S40.

112. **KONTOLEON, PE, ANASTASIOU-NANA, MI, PAPAPETROU, PD, et al.** Hormonal profile in patients with congestive heart failure. *Int J Cardiol*, 2003, vol. 87, n°2-3, p.179-183.
113. **KOTLYAR, AA, VERED, Z, GOLDBERG, I, et al.** Insulin-like growth factor I and II preserve myocardial structure in postinfarct swine. *Heart*, 2001, vol. 86, n°6, p.693-700.
114. **LAPIDOS, KA, KAKKAR, R and MCNALLY, EM.** The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res*, 2004, vol. 94, n°8, p.1023-1031.
115. **LAVIOLLE, B, PAPE, D, TURLIN, B, et al.** Direct effects of 3 combinations of enalapril, metoprolol, and spironolactone on cardiac remodeling in dilated cardiomyopathic hamsters. *J Card Fail*, 2006, vol. 12, n°9, p.752-758.
116. **LEE, WL, CHEN, JW, TING, CT, et al.** Insulin-like growth factor I improves cardiovascular function and suppresses apoptosis of cardiomyocytes in dilated cardiomyopathy. *Endocrinology*, 1999, vol. 140, n°10, p.4831-4840.
117. **LEROITH, D and ROBERTS, CT, JR.** Insulin-like growth factor I (IGF-I): a molecular basis for endocrine versus local action? *Mol Cell Endocrinol*, 1991, vol. 77, n°1-3, p.C57-61.
118. **LEROITH, D and ROBERTS, CT, JR.** Insulin-like growth factors. *Ann N Y Acad Sci*, 1993, vol. 692, p.1-9.
119. **LEROITH, D, SCAVO, L and BUTLER, A.** What is the role of circulating IGF-I? *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2001, vol. 12, n°2, p.48-52.
120. **LEROITH, D and ROBERTS, CT, JR.** The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett*, 2003, vol. 195, n°2, p.127-137.
121. **LI, J, DRESSMAN, D, TSAO, YP, et al.** rAAV vector-mediated sarcoglycan gene transfer in a hamster model for limb girdle muscular dystrophy. *Gene Ther*, 1999, vol. 6, n°1, p.74-82.
122. **LI, J, WANG, D, QIAN, S, et al.** Efficient and long-term intracardiac gene transfer in delta-sarcoglycan-deficiency hamster by adeno-associated virus-2 vectors. *Gene Ther*, 2003, vol. 10, n°21, p.1807-1813.
123. **LIM, LE, DUCLOS, F, BROUX, O, et al.** Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nat Genet*, 1995, vol. 11, n°3, p.257-265.
124. **LIM, LE and CAMPBELL, KP.** The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol*, 1998, vol. 11, n°5, p.443-452.
125. **LIU, T, LAI, H, WU, W, et al.** Developing a strategy to define the effects of insulin-like growth factor-1 on gene expression profile in cardiomyocytes. *Circ Res*, 2001, vol. 88, n°12, p.1231-1238.
126. **MALHOTRA, A.** Regulatory proteins in hamster cardiomyopathy. *Circ Res*, 1990, vol. 66, n°5, p.1302-1309.

127. **MASUTOMO, K, MAKINO, N, SUGANO, M, et al.** Extracellular matrix regulation in the development of Syrian cardiomyopathic Bio 14.6 and Bio 53.58 hamsters. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, vol. 31, n°9, p.1607-1615.
128. **MATSUMURA, K, ARAI, K, ZHONG, D, et al.** Disruption of dystroglycan axis by beta-dystroglycan processing in cardiomyopathic hamster muscle. *Neuromuscul Disord*, 2003, vol. 13, n°10, p.796-803.
129. **MATTHEWS, KG, DEVLIN, GP, STUART, SP, et al.** Intrapericardial igf-I improves cardiac function in an ovine model of chronic heart failure. *Heart Lung Circ*, 2005, vol. 14, n°2, p.98-103.
130. **MCMULLEN, JR and JENNINGS, GL.** Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2007, vol. 34, n°4, p.255-262.
131. **MCNALLY, E, YOSHIDA, M, MIZUNO, Y, et al.** Human Adhalin is Alternatively Spliced and the Gene is Located on Chromosome 17q21. *PNAS*, 1994, vol. 91, n°21, p.9690-9694.
132. **MCNALLY, EM, PASSOS-BUENO, MR, BONNEMANN, CG, et al.** Mild and severe muscular dystrophy caused by a single gamma-sarcoglycan mutation. *Am J Hum Genet*, 1996, vol. 59, n°5, p.1040-1047.
133. **MCNALLY, EM, LY, CT and KUNKEL, LM.** Human [epsilon]-sarcoglycan is highly related to [alpha]-sarcoglycan (adhalin), the limb girdle muscular dystrophy 2D gene. *FEBS Letters*, 1998, vol. 422, n°1, p.27-32.
134. **MCNALLY, EM and MACLEOD, H.** Therapy insight: cardiovascular complications associated with muscular dystrophies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2005, vol. 2, n°6, p.301-308.
135. **MELACINI, P, FANIN, M, DUGGAN, DJ, et al.** Heart involvement in muscular dystrophies due to sarcoglycan gene mutations. *Muscle Nerve*, 1999, vol. 22, n°4, p.473-479.
136. **MELO, LG, PACHORI, AS, KONG, D, et al.** Gene and cell-based therapies for heart disease. *Faseb J*, 2004, vol. 18, n°6, p.648-663.
137. **MILLER, G, WANG, EL, NASSAR, KL, et al.** Structural and functional analysis of the sarcoglycan-sarcospan subcomplex. *Experimental Cell Research*, 2007, vol. 313, n°4, p.639-651.
138. **MITSUHASHI, S, SAITO, N, WATANO, K, et al.** Defect of delta-sarcoglycan gene is responsible for development of dilated cardiomyopathy of a novel hamster strain, J2N-k: calcineurin/PP2B activity in the heart of J2N-k hamster. *J Biochem (Tokyo)*, 2003, vol. 134, n°2, p.269-276.
139. **MIZUNO, Y, NOGUCHI, S, YAMAMOTO, H, et al.** Sarcoglycan complex is selectively lost in dystrophic hamster muscle. *Am J Pathol*, 1995, vol. 146, n°2, p.530-536.

140. **MOELLING, K, SCHAD, K, BOSSE, M, et al.** Regulation of Raf-Akt Cross-talk. *J Biol Chem*, 2002, vol. 277, n°34, p.31099-31106.
141. **MOURKIOTI, F and ROSENTHAL, N.** IGF-1, inflammation and stem cells: interactions during muscle regeneration. *Trends Immunol*, 2005, vol. 26, n°10, p.535-542.
142. **NIGRO, V, PILUSO, G, BELSITO, A, et al.** Identification of a novel sarcoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemmal 35 kDa glycoprotein. *Hum Mol Genet*, 1996, vol. 5, n°8, p.1179-1186.
143. **NIGRO, V, OKAZAKI, Y, BELSITO, A, et al.** Identification of the Syrian hamster cardiomyopathy gene. *Hum Mol Genet*, 1997, vol. 6, n°4, p.601-607.
144. **NOGUCHI, S, MCNALLY, EM, BEN OTHMANE, K, et al.** Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science*, 1995, vol. 270, n°5237, p.819-822.
145. **NOGUCHI, S and HAYASHI, Y.** Animal models of muscular dystrophy. In: The muscular dystrophies, 1st edition. par Oxford University Press, USA New York: Emery, A, 2001.
146. **OKAZAKI, Y, OKUIZUMI, H, OHSUMI, T, et al.** A genetic linkage map of the Syrian hamster and localization of cardiomyopathy locus on chromosome 9qa2.1-b1 using RLGS spot-mapping. *Nat Genet*, 1996, vol. 13, n°1, p.87-90.
147. **OLSON, TM, MICHELS, VV, THIBODEAU, SN, et al.** Actin Mutations in Dilated Cardiomyopathy, a Heritable Form of Heart Failure. *Science*, 1998, vol. 280, n°5364, p.750-752.
148. **OPGAARD, OS and WANG, PH.** IGF-I is a matter of heart. *Growth Horm IGF Res*, 2005, vol. 15, n°2, p.89-94.
149. **OSTERZIEL, KJ, RANKE, MB, STROHM, O, et al.** The somatotrophic system in patients with dilated cardiomyopathy: Relation of insulin-like growth factor-1 and its alterations during growth hormone therapy to cardiac function. *Clinical Endocrinology*, 2000, vol. 53, n°1, p.61-68.
150. **OZAWA, E, NOGUCHI, S, MIZUNO, Y, et al.** From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: evolution of a concept of muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, 1998, vol. 21, n°4, p.421-438.
151. **OZAWA, E, MIZUNO, Y, HAGIWARA, Y, et al.** Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex. *Muscle Nerve*, 2005, vol. 32, n°5, p.563-576.
152. **PETROF, B, SHRAGER, J, STEDMAN, H, et al.** Dystrophin Protects the Sarcolemma from Stresses Developed During Muscle Contraction. *PNAS*, 1993, vol. 90, n°8, p.3710-3714.
153. **PHILLIPS, LS, HARP, JB, GOLDSTEIN, S, et al.** Regulation and action of insulin-like growth factors at the cellular level. *Proc Nutr Soc*, 1990, vol. 49, n°3, p.451-458.

154. **POLITANO, L, NIGRO, V, PASSAMANO, L, et al.** Evaluation of cardiac and respiratory involvement in sarcoglycanopathies. *Neuromuscul Disord*, 2001, vol. 11, n°2, p.178-185.
155. **POULY, J, HAGEGE, AA, VILQUIN, J-T, et al.** Does the Functional Efficacy of Skeletal Myoblast Transplantation Extend to Nonischemic Cardiomyopathy? *Circulation*, 2004, vol. 110, n°12, p.1626-1631.
156. **PROUD, CG.** Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research*, 2004, vol. 63, n°3, p.403-413.
157. **RANKE, MB.** Insulin-like growth factor-I treatment of growth disorders, diabetes mellitus and insulin resistance. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2005, vol. 16, n°4, p.190-197.
158. **REN, J, SAMSON, WK and SOWERS, JR.** Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, vol. 31, n°11, p.2049-2061.
159. **REN, J.** Short-term administration of insulin-like growth factor I (IGF-1) does not induce myocardial IGF-1 resistance. *Growth Horm IGF Res*, 2002, vol. 12, n°3, p.162-168.
160. **RENLEY, B, RYBAKOVA, I, AMANN, K, et al.** Dystrophin binding to nonmuscle actin. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 1998, vol. 41, n°3, p.264-270.
161. **RINDERKNECHT, E and HUMBEL, RE.** The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem*, 1978, vol. 253, n°8, p.2769-2776.
162. **ROBERDS, S, ANDERSON, R, IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA, O, et al.** Primary structure and muscle-specific expression of the 50-kDa dystrophin-associated glycoprotein (adhalin). *J Biol Chem*, 1993, vol. 268, n°32, p.23739-23742.
163. **ROBERDS, SL, ERVASTI, JM, ANDERSON, RD, et al.** Disruption of the dystrophin-glycoprotein complex in the cardiomyopathic hamster. *J Biol Chem*, 1993, vol. 268, n°16, p.11496-11499.
164. **ROBERDS, SL and CAMPBELL, KP.** Adhalin mRNA and cDNA sequence are normal in the cardiomyopathic hamster. *FEBS Lett*, 1995, vol. 364, n°3, p.245-249.
165. **ROBERTS, RG.** Dystrophins and dystrobrevins. *Genome Biol*, 2001, vol. 2, n°4, p.REVIEWS3006.
166. **ROMMEL, C, CLARKE, BA, ZIMMERMANN, S, et al.** Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science*, 1999, vol. 286, n°5445, p.1738-1741.
167. **ROSS, J, JR. and HONGO, M.** The role of hypertrophy and growth factors in heart failure. *J Card Fail*, 1996, vol. 2, n°4 Suppl, p.S121-128.
168. **ROTWEIN, P, POLLOCK, K, DIDIER, D, et al.** Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene. Alternative RNA processing produces two

- insulin-like growth factor I precursor peptides. *J Biol Chem*, 1986, vol. 261, n°11, p.4828-4832.
169. **ROUBENOFF, R, PARISE, H, PAYETTE, HA, et al.** Cytokines, insulin-like growth factor 1, sarcopenia, and mortality in very old community-dwelling men and women: the Framingham Heart Study. *Am J Med*, 2003, vol. 115, n°6, p.429-435.
170. **RYBAKOVA, IN, PATEL, JR and ERVASTI, JM.** The Dystrophin Complex Forms a Mechanically Strong Link Between the Sarcolemma and Costameric Actin. *J Cell Biol*, 2000, vol. 150, n°5, p.1209-1214.
171. **SAKAMOTO, A, ONO, K, ABE, M, et al.** Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, delta-sarcoglycan, in hamster: an animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, vol. 94, n°25, p.13873-13878.
172. **SAKAMOTO, A, ABE, M and MASAKI, T.** Delineation of genomic deletion in cardiomyopathic hamster. *FEBS Lett*, 1999, vol. 447, n°1, p.124-128.
173. **SAKAMOTO, A.** Electrical and ionic abnormalities in the heart of cardiomyopathic hamsters: in quest of a new paradigm for cardiac failure and lethal arrhythmia. *Mol Cell Biochem*, 2004, vol. 259, n°1-2, p.183-187.
174. **SANTINI, MP, WINN, N and ROSENTHAL, N.** Signalling pathways in cardiac regeneration. *Novartis Found Symp*, 2006, vol. 274, p.228-238; discussion 239-243, 272-226.
175. **SCHNEIDER, M, WOLF, E, HOEFLICH, A, et al.** IGF-binding protein-5: flexible player in the IGF system and effector on its own. *J Endocrinol*, 2002, vol. 172, n°3, p.423-440.
176. **SCHULZE, PC, GIELEN, S, ADAMS, V, et al.** Muscular levels of proinflammatory cytokines correlate with a reduced expression of insulinlike growth factor-I in chronic heart failure. *Basic Res Cardiol*, 2003, vol. 98, n°4, p.267-274.
177. **SCIANDRA, F, SCHNEIDER, M, GIARDINA, B, et al.** Identification of the beta-dystroglycan binding epitope within the C-terminal region of alpha-dystroglycan. *Eur J Biochem*, 2001, vol. 268, n°16, p.4590-4597.
178. **SCIANDRA, F, BOZZI, M, BIANCHI, M, et al.** Dystroglycan and muscular dystrophies related to the dystrophin-glycoprotein complex. *Ann Ist Super Sanita*, 2003, vol. 39, n°2, p.173-181.
179. **SHELTON, GD and ENGVALL, E.** Canine and feline models of human inherited muscle diseases. *Neuromuscul Disord*, 2005, vol. 15, n°2, p.127-138.
180. **SHI, W, CHEN, Z, SCHOTTENFELD, J, et al.** Specific assembly pathway of sarcoglycans is dependent on beta- and delta-sarcoglycan. *Muscle Nerve*, 2004, vol. 29, n°3, p.409-419.
181. **SHIGA, K, YOSHIOKA, H, MATSUMIYA, T, et al.** Zeta-sarcoglycan is a functional homologue of gamma-sarcoglycan in the formation of the sarcoglycan complex. *Exp Cell Res*, 2006, vol. 312, n°11, p.2083-2092.

182. **SMALHEISER, NR and SCHWARTZ, NB.** Cranin: a laminin-binding protein of cell membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, vol. 84, n°18, p.6457-6461.
183. **SOLE, MJ and LIEW, CC.** Catecholamines, calcium and cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 1988, vol. 62, n°11, p.20G-24G.
184. **SONG, KS, SCHERER, PE, TANG, Z, et al.** Expression of Caveolin-3 in Skeletal, Cardiac, and Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem*, 1996, vol. 271, n°25, p.15160-15165.
185. **SONNEMANN, KJ, FITZSIMONS, DP, PATEL, JR, et al.** Cytoplasmic gamma-actin is not required for skeletal muscle development but its absence leads to a progressive myopathy. *Dev Cell*, 2006, vol. 11, n°3, p.387-397.
186. **SOTGIA, F, LEE, JK, DAS, K, et al.** Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of beta -dystroglycan. Identification of a central WW-like domain within caveolin family members. *J Biol Chem*, 2000, vol. 275, n°48, p.38048-38058.
187. **STRAUB, V, DUCLOS, F, VENZKE, DP, et al.** Molecular pathogenesis of muscle degeneration in the delta-sarcoglycan-deficient hamster. *Am J Pathol*, 1998, vol. 153, n°5, p.1623-1630.
188. **STRAUB, V, ETTINGER, AJ, DURBEEJ, M, et al.** epsilon-sarcoglycan replaces alpha-sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem*, 1999, vol. 274, n°39, p.27989-27996.
189. **SUN, H, KERFANT, BG, ZHAO, D, et al.** Insulin-like growth factor-1 and PTEN deletion enhance cardiac L-type Ca²⁺ currents via increased PI3Kalpha/PKB signaling. *Circ Res*, 2006, vol. 98, n°11, p.1390-1397.
190. **SWEDBERG, K, CLELAND, J, DARGIE, H, et al.** Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*, 2005, vol. 26, n°11, p.1115-1140.
191. **TAKAHASHI, T, ISHIDA, K, ITOH, K, et al.** IGF-I gene transfer by electroporation promotes regeneration in a muscle injury model. *Gene Ther*, 2003, vol. 10, n°8, p.612-620.
192. **TAYLOR, MR, CARNIEL, E and MESTRONI, L.** Cardiomyopathy, familial dilated. *Orphanet J Rare Dis*, 2006, vol. 1, p.27.
193. **THOMPSON, TG, CHAN, Y-M, HACK, AA, et al.** Filamin 2 (FLN2): A Muscle-specific Sarcoglycan Interacting Protein. *J Cell Biol*, 2000, vol. 148, n°1, p.115-126.
194. **TOBIN, G, YEE, D, BRUNNER, N, et al.** A novel human insulin-like growth factor I messenger RNA is expressed in normal and tumor cells. *Mol Endocrinol*, 1990, vol. 4, n°12, p.1914-1920.
195. **TOWBIN, JA and BOWLES, NE.** The failing heart. 2002, vol. 415, n°6868, p.227-233.

196. **TOYO-OKA, T, KAWADA, T, XI, H, et al.** Gene therapy prevents disruption of dystrophin-related proteins in a model of hereditary dilated cardiomyopathy in hamsters. *Heart Lung Circ*, 2002, vol. 11, n°3, p.174-181.
197. **VAINZOF, M, PASSOS-BUENO, MR, CANOVAS, M, et al.** The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Hum Mol Genet*, 1996, vol. 5, n°12, p.1963-1969.
198. **VAINZOF, M, MOREIRA, ES, FERRAZ, G, et al.** Further evidence for the organisation of the four sarcoglycans proteins within the dystrophin-glycoprotein complex. *Eur J Hum Genet*, 1999, vol. 7, n°2, p.251-254.
199. **VAINZOF, M, PASSOS-BUENO, MR, PAVANELLO, RC, et al.** Sarcoglycanopathies are responsible for 68% of severe autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in the Brazilian population. *J Neurol Sci*, 1999, vol. 164, n°1, p.44-49.
200. **VAINZOF, M and ZATZ, M.** Protein defects in neuromuscular diseases. *Braz J Med Biol Res*, 2003, vol. 36, n°5, p.543-555.
201. **VAN DER KOOL, AJ, DE VOOGT, WG, BARTH, PG, et al.** The heart in limb girdle muscular dystrophy. *Heart*, 1998, vol. 79, n°1, p.73-77.
202. **VASAN, RS, SULLIVAN, LM, D'AGOSTINO, RB, et al.** Serum insulin-like growth factor I and risk for heart failure in elderly individuals without a previous myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Ann Intern Med*, 2003, vol. 139, n°8, p.642-648.
203. **VENEMA, VJ, JU, H, ZOU, R, et al.** Interaction of Neuronal Nitric-oxide Synthase with Caveolin-3 in Skeletal Muscle. *J Biol Chem*, 1997, vol. 272, n°45, p.28187-28190.
204. **VINCENT, AM and FELDMAN, EL.** Control of cell survival by IGF signaling pathways. *Growth Horm IGF Res*, 2002, vol. 12, n°4, p.193-197.
205. **VON LEWINSKI, D, VOSS, K, HULSMANN, S, et al.** Insulin-like growth factor-1 exerts Ca²⁺-dependent positive inotropic effects in failing human myocardium. *Circ Res*, 2003, vol. 92, n°2, p.169-176.
206. **WANG, L, GOUT, I and PROUD, CG.** Cross-talk between the ERK and p70 S6 kinase (S6K) signaling pathways. MEK-dependent activation of S6K2 in cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 2001, vol. 276, n°35, p.32670-32677.
207. **WANG, PH.** Roads to survival: insulin-like growth factor-1 signaling pathways in cardiac muscle. *Circ Res*, 2001, vol. 88, n°6, p.552-554.
208. **WATCHKO, JF, O'DAY, TL and HOFFMAN, EP.** Functional characteristics of dystrophic skeletal muscle: insights from animal models. *J Appl Physiol*, 2002, vol. 93, n°2, p.407-417.
209. **WEHRENS, XH and MARKS, AR.** Novel therapeutic approaches for heart failure by normalizing calcium cycling. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, vol. 3, n°7, p.565-573.

210. **WEHRENS, XH, LEHNART, SE and MARKS, AR.** Intracellular calcium release and cardiac disease. *Annu Rev Physiol*, 2005, vol. 67, p.69-98.
211. **WELCH, S, PLANK, D, WITT, S, et al.** Cardiac-specific IGF-1 expression attenuates dilated cardiomyopathy in tropomodulin-overexpressing transgenic mice. *Circ Res*, 2002, vol. 90, n°6, p.641-648.
212. **WELLS, DJ and WELLS, KE.** What do animal models have to tell us regarding Duchenne muscular dystrophy? *Acta Myol*, 2005, vol. 24, n°3, p.172-180.
213. **WEWER, UM and ENGVALL, E.** Merosin/laminin-2 and muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*, 1996, vol. 6, n°6, p.409-418.
214. **WHEELER, MT, ZARNEGAR, S and MCNALLY, EM.** {zeta}-Sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*, 2002, vol. 11, n°18, p.2147-2154.
215. **WHEELER, MT and MCNALLY, EM.** Sarcoglycans in vascular smooth and striated muscle. *Trends Cardiovasc Med*, 2003, vol. 13, n°6, p.238-243.
216. **WHEELER, MT, ALLIKIAN, MJ, HEYDEMANN, A, et al.** Smooth muscle cell-extrinsic vascular spasm arises from cardiomyocyte degeneration in sarcoglycan-deficient cardiomyopathy. *J Clin Invest*, 2004, vol. 113, n°5, p.668-675.
217. **WHITMER, JT, KUMAR, P and SOLARO, RJ.** Calcium transport properties of cardiac sarcoplasmic reticulum from cardiomyopathic Syrian hamsters (BIO 53.58 and 14.6): evidence for a quantitative defect in dilated myopathic hearts not evident in hypertrophic hearts. *Circ Res*, 1988, vol. 62, n°1, p.81-85.
218. **WINDER, SJ.** The complexities of dystroglycan. *Trends in Biochemical Sciences*, 2001, vol. 26, n°2, p.118-124.
219. **YAMADA, H, SAITO, F, FUKUTA-OHI, H, et al.** Processing of {beta}-dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. *Hum Mol Genet*, 2001, vol. 10, n°15, p.1563-1569.
220. **YAMAMOTO, H, HAGIWARA, Y, MIZUNO, Y, et al.** Heterogeneity of dystrophin-associated proteins. *J Biochem (Tokyo)*, 1993, vol. 114, n°1, p.132-139.
221. **YAMAMOTO, H, MIZUNO, Y, HAYASHI, K, et al.** Expression of dystrophin-associated protein 35DAG (A4) and 50DAG (A2) is confined to striated muscles. *J Biochem (Tokyo)*, 1994, vol. 115, n°1, p.162-167.
222. **YAMANOUCHI, Y, MIZUNO, Y, YAMAMOTO, H, et al.** Selective defect in dystrophin-associated glycoproteins 50DAG (A2) and 35DAG (A4) in the dystrophic hamster: an animal model for severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy (SCARMD). *Neuromuscul Disord*, 1994, vol. 4, n°1, p.49-54.
223. **YANG, B, JUNG, D, MOTTO, D, et al.** SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J Biol Chem*, 1995, vol. 270, n°20, p.11711-11714.
224. **YANO, M, IKEDA, Y and MATSUZAKI, M.** Altered intracellular Ca²⁺ handling in heart failure. *J Clin Invest*, 2005, vol. 115, n°3, p.556-564.

225. **YOSHIDA, M and OZAWA, E.** Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J Biochem (Tokyo)*, 1990, vol. 108, n°5, p.748-752.
226. **YOSHIDA, M, SUZUKI, A, YAMAMOTO, H, et al.** Dissociation of the complex of dystrophin and its associated proteins into several unique groups by n-octyl beta-D-glucoside. *Eur J Biochem*, 1994, vol. 222, n°3, p.1055-1061.
227. **YOSHIDA, M, HAMA, H, ISHIKAWA-SAKURAI, M, et al.** Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy. *Hum Mol Genet*, 2000, vol. 9, n°7, p.1033-1040.
228. **YOUNG, LH, RENFU, Y, HU, X, et al.** Insulin-like growth factor I stimulates cardiac myosin heavy chain and actin synthesis in the awake rat. *Am J Physiol*, 1999, vol. 276, n°1 Pt 1, p.E143-150.
229. **YU, H and ROHAN, T.** Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst*, 2000, vol. 92, n°18, p.1472-1489.
230. **ZATZ, M, VAINZOF, M and PASSOS-BUENO, MR.** Limb-girdle muscular dystrophy: one gene with different phenotypes, one phenotype with different genes. *Curr Opin Neurol*, 2000, vol. 13, n°5, p.511-517.
231. **ZATZ, M, DE PAULA, F, STARLING, A, et al.** The 10 autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromuscular Disorders*, 2003, vol. 13, n°7-8, p.532-544.
232. **ZHONG, D, SAITO, F, SAITO, Y, et al.** Characterization of the protease activity that cleaves the extracellular domain of [beta]-dystroglycan. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, vol. 345, n°2, p.867-871.
233. **ZHU, T, ZHOU, L, MORI, S, et al.** Sustained whole-body functional rescue in congestive heart failure and muscular dystrophy hamsters by systemic gene transfer. *Circulation*, 2005, vol. 112, n°17, p.2650-2659.
234. **ZHU, X, HADHAZY, M, GROH, ME, et al.** Overexpression of gamma-sarcoglycan induces severe muscular dystrophy. Implications for the regulation of Sarcoglycan assembly. *J Biol Chem*, 2001, vol. 276, n°24, p.21785-21790.

ANNEXES

A-Annexe 1 : Solutions utilisées pour les Western blots

Tampon de charge Laemmli 2X : 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% Glycérol, 4% SDS, 0,1% Bleu de bromophénol, 10% β -mercaptoéthanol.

Tampon de concentration 4X : 0,5 M Tris Base, 0,4% SDS, pH 6,8.

Tampon de séparation 4X : 1,5 M Tris Base, 0,4% SDS, pH 8,8.

Gels de concentration SDS-PAGE : 3,9 % Acrylamide/Bis-Acrylamide (solution à 40%, ratio 29:1), 1X tampon de concentration, 0,1% APS, 0,05% TEMED.

Gels de séparation SDS-PAGE : 5 à 15% Acrylamide/Bis-Acrylamide (solution à 40%, ratio 29:1), 1X tampon de séparation, 0,1% APS, 0,05% TEMED.

Tampon de migration 1X : 25 mM Tris Base, 192 mM Glycine, 0,1% SDS.

Tampon de transfert 1X : 25 mM Tris Base, 192 mM Glycine, 20% Isopropanol.

PBS 10X (pour 1L) : 2 g KCl, 2 g KH_2PO_4 , 80 g NaCl, 14,42 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou 11,5 g Na_2HPO_4 ou 24 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

TBS 10X (pour 1L) : 24,2 g Tris Base, 80g NaCl, ajuster le pH à 7,6 avec une solution d'HCl.

B- Annexe 2 : Article 1

Serose A, Prudhon B, Salmon A, Doyennette MA, Fiszman MY, Fromes Y, Administration of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) improves both structure and function of delta-sarcoglycan deficient cardiac muscle in the hamster. *Basic Res Cardiol*, 2005. **100**(2): 161-70.

Armelle Serose
Bernard Prudhon
André Salmon
Marie-Agnès Doyennette
Marc Y. Fiszman
Yves Fromes

Administration of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) improves both structure and function of delta-sarcoglycan deficient cardiac muscle in the hamster

Received: 3 August 2004
Returned for 1. revision: 23 August 2004
1. Revision received: 24 September 2004
Returned for 2. revision: 10 October 2004
2. Revision received: 26 October 2004
Accepted: 15 November 2004
Published online: 22 December 2004

■ **Abstract** Dilated cardiomyopathies (DCM) are due to progressive dilatation of the cardiac cavities and thinning of the ventricular walls and lead unavoidably to heart failure. They represent a major cause for heart transplantation and, therefore, defining an efficient symptomatic treatment for DCM remains a challenge. We have taken advantage of the hamster strain CHF147 that displays progressive cardiomyopathy leading to heart failure to test whether stimulation of a hypertrophic pathway could delay the process of dilatation.

Six month old CHF147 hamsters were treated with IGF-1 so that we could compare the efficacy of systemic administration of human recombinant IGF-1 protein (rh IGF-1) at low dose to that of direct myocardial injections of a plasmid DNA containing IGF-1 cDNA (pCMV-IGF1).

IGF-1 treatment did not induce a significant variation of ventricle mass, but preserved left ventricular (LV) wall thickness and delayed dilatation of cardiac cavities when compared to non-treated hamsters. Together with this reduction of dilatation, we also noted a reduction in the amount of interstitial collagen. Furthermore, IGF-1 treatment induced beneficial effects on cardiac function since treated hamsters presented improved cardiac output and stroke volume, decreased end diastolic pressure when compared to non-treated hamsters and also showed a trend towards increased contractility (dp/dt_{max}).

This study provides evidence that IGF-1 treatment induces beneficial structural and functional effects on DCM of CHF147 hamsters, hence making this molecule a promising candidate for future gene therapy of heart failure due to DCM.

■ **Key words** Dilated cardiomyopathy – heart failure – CHF147 hamsters – gene therapy – IGF-1

A. Serose · B. Prudhon · A. Salmon
M.-A. Doyennette · M. Y. Fiszman
Y. Fromes, MD, PhD (✉)
Institute de myologie – Inserm U582
Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière
47, Boulevard de l'Hôpital
75651 Paris Cedex 13, France
E-Mail: y.fromes@myologie.chups.jussieu.fr

Introduction

Heart failure is a major issue in public health care due to its frequency and severity. Dilated cardiomyopathies (DCM) are one of the most frequent causes for heart failure and are characterized by left and/or right ventricular dilatation associated with systolic dysfunction. Two

mechanisms are responsible for this progression to chronic heart failure: thinning of the ventricular walls and dilatation of the ventricles. Moreover, myocardial contraction is decreased as cardiac cavities dilate and as there is a loss of contractile units due to cardiac walls thinning. Thus, the heart is unable to maintain its output. Even though a genetic cause of DCM has been identified in about 30% of the cases, it, nevertheless, remains true

that heart failure results in common deregulations independent of the etiology.

Without etiologic diagnosis, clinicians set up symptomatic treatments. In the acute phase, beta-adrenergic agonists are used to increase inotropism and overcome acute heart failure episodes. At the chronic phase of heart failure, this treatment is often composed of diuretics that reduce volume overload, angiotensin-converting enzyme inhibitors, beta-blockers and anti-aldosterone treatments [20]. So far, the aim of drug therapy in DCM is to attenuate symptoms of the failing heart; however, no long-term positive inotropic treatments are available. Thus, DCM is the most common and frequent cause of heart failure. Therefore, it seems essential to develop new therapies for DCM treatment.

The availability of animal models of DCM is essential for the development of *in vivo* therapeutic approaches. One such model of inherited cardiomyopathy is the CHF147 hamster, which has a large deletion of the delta-sarcoglycan gene [10]. This deletion leads to the absence of delta-sarcoglycan transcripts and of the delta-sarcoglycan protein, which is a structural protein of all muscle cell membranes [24]. This model displays both morphological and functional cardiac alterations.

It has been shown that re-expression of the delta-sarcoglycan gene before the state of heart failure can slow the development of cardiac lesions [11]. Heart failure due to DCM induces modifications in neuro-endocrine pathways; especially the GH/IGF-1 axis is altered [1, 2, 15, 19]. Along this line, growth hormone (GH) was proposed as a potential treatment. The efficiency of GH treatment was assessed at early (4 months) and late (10 months) phases of the disease in the CHF147 hamster [23]. GH treatment improved left ventricular dysfunction at 4 months in CHF147 hamsters by increasing contractility and reducing wall stress but had little beneficial effect at 10 months in severe left ventricular heart failure.

In this study, we propose to stimulate a hypertrophic response to compensate dilatation of the cavities and to increase cardiac muscle wall thickness. To achieve this goal, we used insulin-like growth factor-1 (IGF-1), a GH effector. IGF-1 is involved in cardiomyocyte proliferation, differentiation and cell survival [25]. Reiss et al. showed that total heart weight of transgenic mice overexpressing IGF-1 in myocardium is increased by 50% and cardiomyocyte number is as well increased by 20 to 50% [21]. IGF-1 is also known for its role in regulation of structure and function of adult myocardium [31]. Moreover, IGF-1 is able to improve myocardial contractility by increasing the synthesis of cardiac contractile proteins [30, 31].

In this report, we compare IGF-1 treatment of DCM in adult hamster, either by IGF-1 expressed before injection and delivered as a recombinant protein (rh IGF-1) or by direct myocardial injection of a plasmid DNA containing the IGF-1 cDNA. We provide evidence that both strate-

gies have beneficial structural and functional effects on DCM. We show that IGF-1 induced a thickening of the cardiac walls that slows cardiac dilatation and that improves global cardiac performance.

Materials and methods

■ Animals and experimental protocols

Male Syrian hamsters (CHF147 and wild type) were used for the experiments. Wild type (healthy group) Syrian hamsters (strain Rj:AURA) were purchased from Elevage Janvier, France. CHF147 hamsters were bred at the local animal facility of the Institut de Myologie and were fed on normal chow diet after six weeks of age. The animals were maintained at 20 °C with 10/14 hours light/dark cycles and free access to food and water was provided. Care of the animals was in compliance with the *Guide of the Care and Use of Laboratory Animals*, published by the National Institute of Health (National Institute of Health publication no. 85-23, revised 1996). Wild type Syrian hamsters and CHF147 non-treated hamsters were used to establish reference groups. The 6-month old CHF147 hamsters were randomized into four groups: a control group was sham operated receiving an osmotic pump filled with saline (Sham 1 group, n = 3), a group in which animals were treated with recombinant human IGF-1 (rh IGF-1; Chemicon International, Inc.) at a total dose of 22 µg (rh IGF-1 treated group, n = 7) which was delivered by an osmotic pump (Alzet, model 2004) implanted under the skin, a control group was sham operated receiving saline injection (Sham 2 group, n = 3) and a fourth group in which animals were treated by gene transfer with the IGF-1 cDNA (pCMV-IGF1 treated group, n = 6). The two last groups of animals were operated as follows. Hamsters were anesthetized with ketamine (75 mg/kg), xylazine (15 mg/kg) and midazolam (0.75 mg/kg) administered intraperitoneally, intubated, and ventilated (SAR-830/P ventilator, Bioseb, France). IGF-1 cDNA was injected through a small laparotomy and a left ventral phrenotomy. A total dose of 500 to 650 µg of IGF-1 cDNA was injected at multiple sites into the left ventricular wall using a 31 Gauge needle. All animals were sacrificed with an overdose of anesthetics after 35 days of treatment.

■ Plasmid vector pCMV-IGF1

The vector used in this study is a plasmid DNA, pCMV-IGF1, containing the cytomegalovirus (CMV) promoter and a cDNA encoding a rat preprohormone form of IGF-1. This plasmid has a size of 4356 bp and was produced,

after amplification, by a Gigapreps kit (Qiagen) using the protocol given by the manufacturer. Measuring IGF-1 secretion following transfection of HEK293 cells assessed the functional property of the plasmid. IGF-1 secretion by pCMV-IGF1 transfected myocytes was detected by immunohistochemistry using polyclonal anti-IGF-1 (1:1500, Chemicon International) primary antibody on cryostat sections.

■ Measure of LV function

We used a cardiac loop analysis computer system with specific software iox v.1.7. (Emka, France) with a pressure and volumetric system (spr-SERIES 1.4 FRENCH p-v conductance catheter, Millar Instruments) to perform LV pressure-volume loop analysis. The system allows beat-by-beat monitoring of heart performance in hamsters, and measurements and analysis were performed as follows. The ultra-miniature catheters were used in closed-chest surgical procedures, introduced through the right carotid artery and properly positioned in the left ventricular cavity. Pressure and volume measurements were recorded from a single instrument. The calculated hemodynamic parameters serve as indicators of cardiovascular performance in response to different interventions (occlusions). Pressure-volume loops were established by variation of cardiac load after compression of the inferior vena cava. The end-systolic pressure-volume relation (ESPVR) was calculated to represent LV global systolic function.

■ Morphological analysis of the cardiac muscle

Macroscopy

Animals were weighed before evaluation of cardiac function. Hearts were quickly harvested and perfused with a normal saline solution under low-pressure conditions. Ventricles were also weighed after heart removal and atrium dissection. Ventricular weight-to-body weight ratio was calculated and is given in mg/g. Thickness of inter ventricular septum and posterior wall, as well as cardiac diameters, were measured on cardiac cryostat sections.

Histology

Hearts were removed and atriums were dissected. Then the ventricles were cut in half along the cardiac transversal axis. Each half was frozen in liquid nitrogen cooled in isopropanol and stored at -80°C . Cryostat sections ($8\ \mu\text{m}$) were cut and mounted on glass slides for histological analysis. Four different histochemical staining were realized: hematoxylin-eosin (H&E), Sirius red (SR),

succinyl deshydrogenase (SDH) and von Kossa nitrate. Microscopy observations were performed with a Nikon Eclipse E800 microscope (Nikon). Image acquisition was carried out using a Nikon Digital camera (Nikon).

Fibrosis on SR slides was quantified with Lucia G version 4.61 software (Nikon). Nine heart sections were quantified in the healthy group, five in the non-treated group, four in the rh IGF-1 treated group and ten in the pCMV-IGF1 treated group.

Immunohistochemistry

Six micrometers cryostat sections of left ventricles were cut for immunohistochemical analysis in order to examine collagen and contractile proteins. The following primary antibodies were used: polyclonal anti-collagen type 1 (1:30 Chemicon International), monoclonal anti-troponin I (1:2000, Chemicon International), monoclonal anti-myosin heavy chain (1:1500, NOQ7.5.4D clone, Sigma). We also looked at the cytoskeletal alterations in the cardiomyocytes using the monoclonal anti-dystrophin (1:40, NCL-DYS1 clone, Novocastra) primary antibody. All slides were mounted with Vectashield with DAPI (Vector Laboratories). Microscopy observations were performed with a Leica DMR microscope (Leica) and image acquisition was carried out using a Sony 3CCD color video camera (Nikon) and TRIBVN ICS software (ICG).

Macrophages and CD8 lymphocytes were detected using monoclonal anti-rat macrophages (1:800, Biosource International) and monoclonal anti-rat CD8 lymphocytes (1:500, PharMingen International) primary antibodies.

■ Statistics

Morphometric and functional results are presented as mean \pm standard deviation and fibrosis results correspond to the percentage of fibrosis on the surface of the slide. Experimental data were analyzed pair-wise between control and treated groups. Statistical significance between two measurements was determined by the ANOVA method using the Stat View software. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Table 1 Macroscopical analysis

| n = | Healthy 19 | Non-treated 3 | Sham 1 3 | rh IGF-1 7 | Sham 2 3 | pCMV-IGF1 6 |
|--------------|---------------|---------------------------|--------------|------------------------------|--------------|--------------------------------|
| VW (mg) | 529.0 ± 93.1 | 505.9 ± 64.9 | 599.9 ± 26.7 | 597.0 ± 64.1 | 544.4 ± 50.7 | 494.8 ± 91.0 ⁴ |
| BW (g) | 155.5 ± 17.5 | 101.7 ± 27.4 ¹ | 141.6 ± 11.6 | 136.1 ± 16.3 ^{1,2} | 132.4 ± 14.5 | 120.8 ± 16.3 ¹ |
| VW/BW (mg/g) | 3.41 ± 0.56 | 5.09 ± 0.64 ¹ | 4.25 ± 0.28 | 4.39 ± 0.28 ^{1,2} | 4.12 ± 0.09 | 4.13 ± 0.49 ^{1,2} |
| D (mm) | 4.34 ± 0.36 | 10.36 ± 0.63 ¹ | 10.49 ± 0.47 | 4.91 ± 0.44 ^{1,2,4} | 10.46 ± 0.41 | 4.29 ± 0.26 ^{2,3,5} |
| PW (mm) | 1.92 ± 0.15 | 2.17 ± 0.34 | 2.21 ± 0.40 | 2.93 ± 0.25 ^{1,2,4} | 2.17 ± 0.30 | 2.31 ± 0.24 ^{1,3} |
| IVS (mm) | 1.34 ± 0.32 | 1.62 ± 0.27 | 1.62 ± 0.28 | 2.12 ± 0.20 ^{1,2,4} | 1.54 ± 0.14 | 2.04 ± 0.32 ^{1,2,5} |
| PW/IVS | 1.44 ± 0.27 | 1.34 ± 0.07 | 1.36 ± 0.06 | 1.39 ± 0.14 | 1.41 ± 0.11 | 1.15 ± 0.14 ^{1,2,3,5} |

rh IGF-1 IGF-1 protein treated group; pCMV-IGF1 IGF-1 plasmid treated group; VW ventricle weight, in mg, BW body weight, in g, VW/BW ventricle weight-to-body weight ratio, in mg/g, D cardiac diameter, in mm, PW posterior wall thickness, in mm, IVS inter-ventricular septum thickness, in mm, PW/IVS PW-to-IVS thickness ratio; cardiac diameters and thickness measurements were done on cryostat heart sections, in mm; ¹ = p < 0.05 vs. healthy group, ² = p < 0.05 vs. non-treated group; ³ = p < 0.05 vs. rh IGF-1 treated group, ⁴ = p < 0.05 vs. Sham 1 group, ⁵ = p < 0.05 vs. Sham 2 group

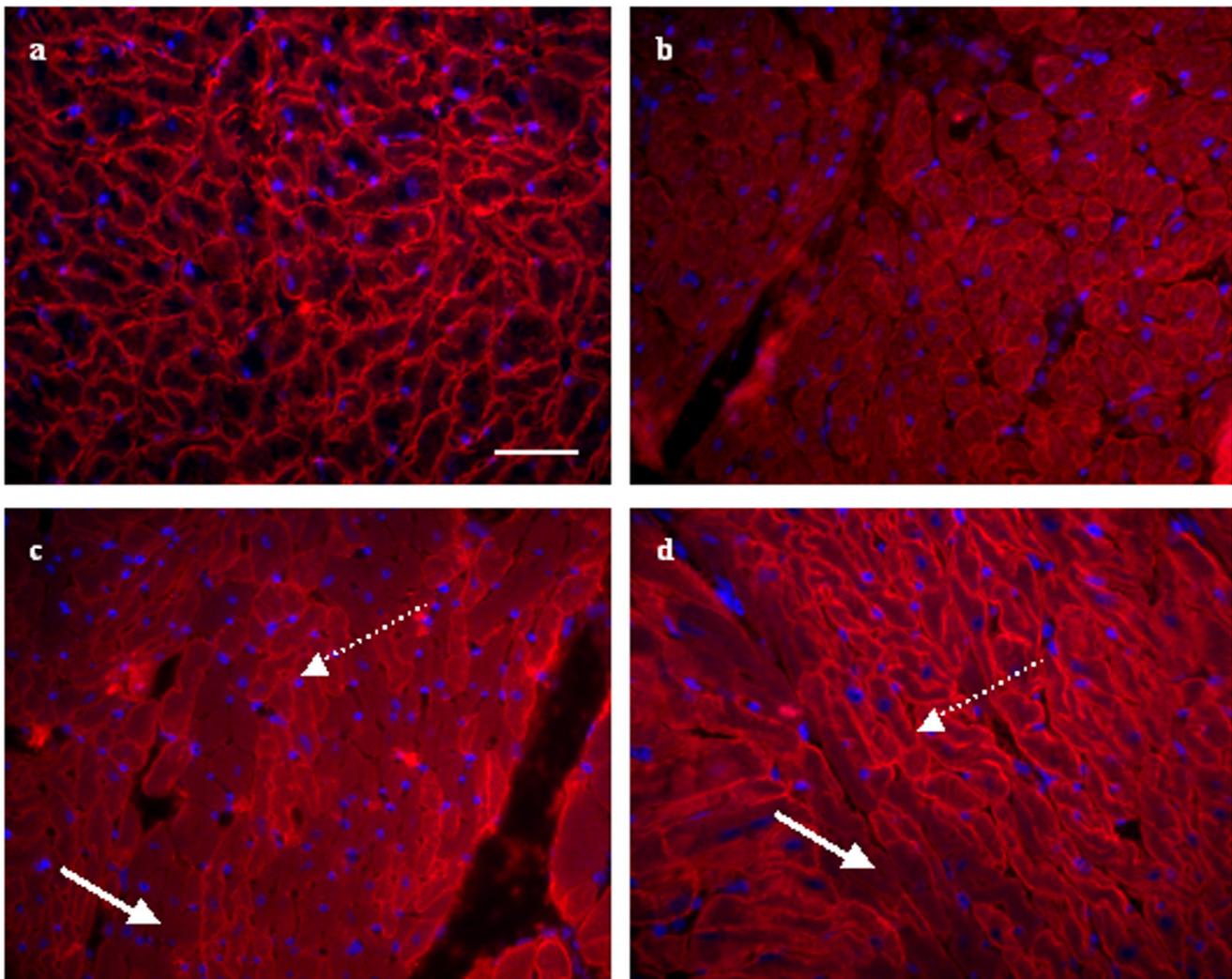


Fig. 1 Cytoskeletal alteration. Anti-dystrophin immunostaining (in red) on transverse heart sections of healthy (a), non-treated (b), rh IGF-1 treated (c) and pCMV-IGF1 treated (d) hamsters. Plain arrows show immunonegative areas with reference

to immunopositive stained areas (dotted arrows). Magnification 40x, bar = 50 μ m, nuclei are visualized by DAPI staining (in blue)

Results

■ Myocardium treatment using IGF-1 induces beneficial effects on cardiac morphology

Cardiac dilatation is slowed down and wall thickness is increased after IGF-1 treatment

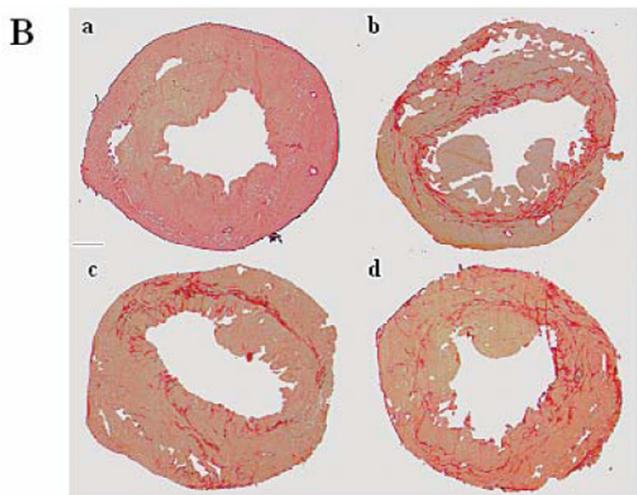
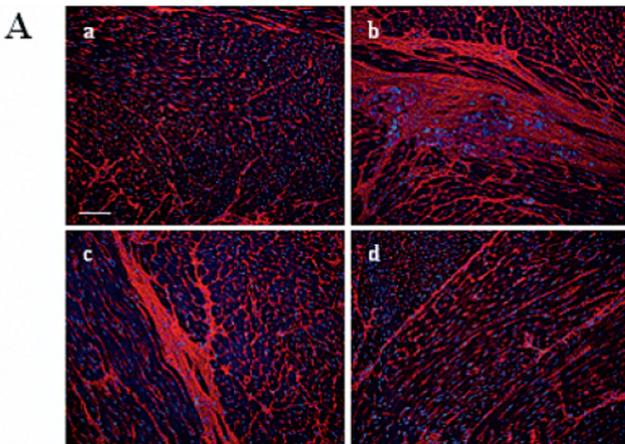
Ventricular weights (VW), body weights (BW) and VW/BW ratios are reported in Table 1. The VW/BW ratio is significantly increased in all CHF147 animals, whether treated or non-treated, when compared to healthy animals. However, in the protein treated group, there is a trend towards a further increase of VW/BW ratio with reference to the sham-operated animals. As expected, non-treated animals have significantly increased cardiac diameters when compared to healthy hamsters. However, cardiac diameters are significantly less increased in the protein treated group as well as in the plasmid treated animals compared to their respective counterparts. Mean cardiac diameters remain in the range of those of the healthy group (Table 1).

We also measured the thickness of the posterior wall (PW) and of the inter-ventricular septum (IVS) and cal-

culated the PW/IVS ratio (Table 1). Treated animals showed significantly increased thickness of both PW and IVS which, in the case of the rh IGF-1 treated group, gives a ratio indistinguishable with that of the healthy animals, however significantly different from the non-treated group. Hence, systemic delivery of the recombinant IGF-1 protein maintains a balanced shape of cardiac morphology. In contrast, the PW/IVS ratio in the pCMV-IGF1 treated group is statistically decreased compared to the healthy group PW/IVS ratio.

Structure preservation of the myocardium fibrosis after IGF-1 treatment

All CHF147 animals, whether treated or non-treated, display important localized lesions, such as necrosis, calcifications and interstitial fibrosis, as evidenced with histochemical staining. Anti-dystrophin immunostaining of healthy heart sections shows a normal localization of the dystrophin in the sub-sarcolemmal space (Fig. 1a), whereas a partial loss of dystrophin in the non-treated group can be observed (Fig. 1b). IGF-1 treated hamsters present a more heterogeneous profile with some positive areas as well as negative areas (Fig. 1c). Similar findings can be observed in the plasmid treated group strength-



C Myocardial fibrosis

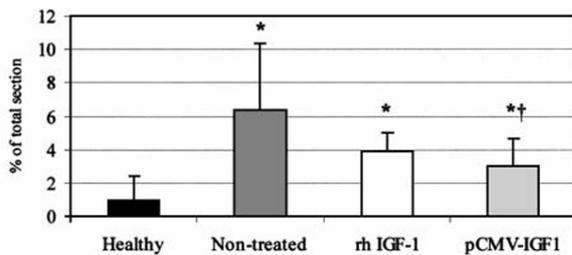


Fig.2 Myocardial fibrosis. **A** Collagen type 1 immunostaining (in red) on heart sections of healthy (a), non-treated (b), rh IGF-1 treated (c) and pCMV-IGF1 treated (d) hamsters; magnification 16x; bar = 100 μ m, nuclei are visualized by DAPI staining (in blue). **B** Histological and immunohistochemical analysis of myocardial fibrosis, Sirius red staining on heart sections of healthy (a), non-treated (b), rh IGF-1 treated (c) and pCMV-IGF1 treated (d) hamsters; magnification 1x; bar = 1 mm. **C** Myocardial fibrosis quantification, in percentage of total heart section; * = $p < 0.05$ vs. healthy group, † = $p < 0.05$ vs. non-treated group

ening the findings observed in the protein treated group (Fig. 1d). Interestingly, outside of the fibrotic lesions, there is no disorganization of the cardiac tissue, as evidenced by single and double immunolabeling of troponin-I and myosin heavy chain (data not shown).

We also analyzed the type of fibrosis, as shown in Fig. 2A. Immunohistochemical staining reveals large deposits of collagen type I. The extent of fibrosis was further analyzed with the use of Sirius red staining (Fig. 2B). No pathological fibrosis was detected in healthy hamster (Fig. 2B, a) while non-treated hamsters displayed an important fibrotic scar, essentially located in the medial area of the heart between endocardium and epicardium (Fig. 2B, b). In treated animals, the fibrotic scar was much more limited (Fig. 2B, c and d) and this is particularly evident for the pCMV-IGF1 treated group, where the Sirius red stained region was not any more concentrated in the medial area (Fig. 2B, d). When the surface area of the Sirius red stained tissue was precisely measured, this conclusion held true and the extent of the fibrotic area was significantly decreased in pCMV-IGF-1 treated animals when compared to the non-treated animals (Fig. 2C). Hence, IGF-1 treatment probably prevents fibrosis from further spreading.

At that point, we felt that it was important to check whether injection of the plasmid DNA had induced either an inflammatory or an immunological response. Indeed, some inflammation could be observed since a limited number of macrophages was seen; however, no CD8+ lymphocytes were detected, ruling out the possibility that an immunological response could have had any adverse effect (data not shown).

■ Functional analysis of the effects of IGF-1 gene transfer into the myocardium

CHF147 hamsters display overt signs of chronic heart failure

Pressure and volume measurements at steady state are presented in Table 2. Non-treated CHF147 hamsters at the age of 6 months display cardiac dilatation, which is confirmed by a clear trend towards increased end diastolic volume (EDV). Heart failure appears as a significant decrease in stroke volume (SV). Heart rate (HR) increases in a non-significant rate but cardiac output (CO) is clearly decreased ($p = 0.068$). Furthermore, cardiac contractility, as measured by dP/dt_{max} , is significantly decreased.

Treatment using IGF-1 induces functional improvements

Pressure and volume measurements after treatment are presented in Table 2. Recombinant protein treatment prevents some degree of cardiac dilatation as shown by a lower increase of EDV. SV and CO display a trend to higher performance, confirmed by lower end diastolic pressure (Ped). HR does not display any difference between any of the groups. Moreover, recombinant protein treatment induces a significant increase of cardiac contractility and relaxation when compared to sham-treated group. Furthermore, when plasmid coding for IGF-1 was injected into the myocardium, a similar trend towards the slowing of cardiac deterioration could be observed.

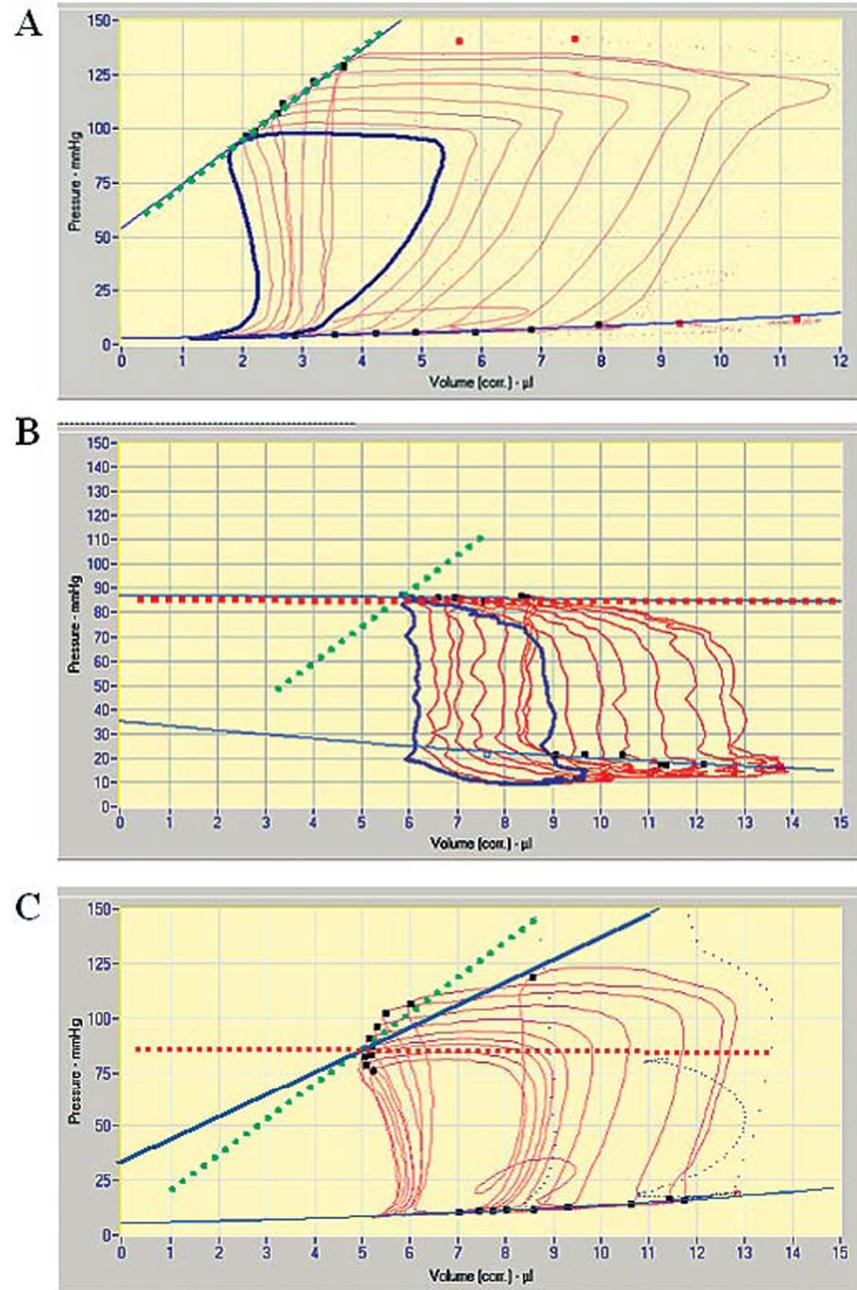
One representative PV loop for each group of hamsters is reported in Fig. 3. These loops show cardiac cycles in the healthy group, and before and after pCMV-IGF1 treatment of CHF147 hamsters. End systole pressure and volume values are given by a point, which results in an end systolic pressure and volume relation (ESPVR),

Table 2 Cardiac function. Measurements were done at steady state

| n = | Healthy 7 | Non-treated 3 | Sham 1 3 | rh IGF-1 7 | Sham 2 3 | pCMV-IGF1 6 |
|------------------------|--------------|--------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------|--------------------------|
| Pes (mmHg) | 90 ± 11 | 60 ± 7 ¹ | 71 ± 8 | 73 ± 11 ¹ | 68 ± 16 | 73 ± 17 |
| Ped (mmHg) | 3 ± 4 | 17 ± 4 ¹ | 21 ± 5 | 14 ± 5 ¹ | 12 ± 1 | 2 ± 2 ^{2,3,5} |
| EDV (Kl) | 20.4 ± 4.8 | 24.9 ± 9.8 | 32.9 ± 1.7 | 28.4 ± 5.9 ¹ | 23.1 ± 5.5 | 20.4 ± 7.3 ³ |
| SV (μl) | 4.9 ± 1.6 | 1.8 ± 0.4 ¹ | 3.3 ± 0.3 ² | 2.9 ± 0.6 ^{1,2} | 3.5 ± 0.7 ² | 3.4 ± 1.0 ² |
| CO (μl/min) | 1044 ± 482 | 431 ± 100 | 606 ± 137 | 617 ± 156 ¹ | 621 ± 110 | 641 ± 153 |
| HR (bpm) | 215 ± 35 | 253 ± 63 | 169 ± 32 | 213 ± 39 | 255 ± 71 | 190 ± 37 |
| dP/dt_{max} (mmHg/s) | 5400 ± 1725 | 2492 ± 308 ¹ | 2479 ± 602 | 3333 ± 410 ^{1,2,4} | 2789 ± 576 | 3054 ± 662 ¹ |
| dP/dt_{min} (mmHg/s) | -5528 ± 1722 | -2092 ± 247 ¹ | -1966 ± 343 | -2796 ± 406 ^{1,2,4} | -2304 ± 554 | -2890 ± 881 ¹ |

Pes end systolic pressure, in mmHg, Ped end diastolic pressure, in mmHg, EDV end diastolic volume, in μl, SV stroke volume, in μl, CO cardiac output, in μl/min, HR heart rate, in bpm, dP/dt_{max} in mmHg/s, dP/dt_{min} in mmHg/s; 1 = $p < 0.05$ vs. healthy group; 2 = $p < 0.05$ vs. non-treated group; 3 = $p < 0.05$ vs. rh IGF-1 treated group, 4 = $p < 0.05$ vs. Sham 1 group, 5 = $p < 0.05$ vs. Sham 2 group

Fig. 3 Representative example of PV loops. PV loops are obtained after cardiac preload variation; **A** healthy group, **B** non-treated group, **C** pCMV-IGF1 treated group; bold loops correspond to PV loop at steady state, dotted red line = end systolic pressure volume relation (ESPVR) for healthy group, dotted green line = ESPVR for non-treated group, blue line = ESPVR for pCMV-IGF1 treated group



whose slope is representative of cardiac contractility. In Fig. 3, the slope of ESPVR is equal to 20.73 for the healthy group. ESPVR slope value is 0.19 in the non-treated group and 10.41 in the pCMV-IGF1 treated group.

Discussion

IGF-1 is known to play a key role in cardiac function and cardiac growth [22] and several observations have suggested a possible link between an alteration of its pathway and congestive heart failure due to DCM [1, 2, 15, 19]. For example, IGF-1 serum levels are decreased in heart failure and Vasan et al. have shown that the IGF-1

serum level was inversely related to the risk for congestive heart failure in elderly people without a previous myocardial infarction [12, 15, 26, 29]. These results were taken as an indication that IGF-1 could be considered as a marker of heart failure severity. Moreover, it has been shown that IGF-1 administration causes hypertrophy in normal hearts and severely dysfunctional heart could also undergo hypertrophy, which improves cardiac function [7]. On the other hand, the effects of low dose of IGF-1 on heart failure are not well documented.

DeLaughter et al., using transgenic mice overexpressing IGF-1 in the heart, have shown that long-term exposure to IGF-1 leads to the development of pathological cardiac hypertrophy, in contrast to short-term exposure, which induces physiological hypertrophy [5]. In their study, they proposed to limit temporal exposure to IGF-1 in order to deliver the potential benefits of IGF-1 while avoiding its deleterious side effects.

Systemic administration of the recombinant human IGF-1 protein to 6 month-old CHF147 hamsters led to a decreased cardiac dilatation and a significant hemodynamic improvement. This result vindicates the hypothesis that IGF-1 treatment can delay the process of cardiac dilatation and improve cardiac function. However, a number of studies have indicated that a high IGF-1 serum level could be linked to an increased risk of cancer [3, 9]. To avoid this problem, we decided to target IGF-1 delivery to the heart by injecting into the myocardium a plasmid DNA encoding IGF-1. As expected, no difference could be detected in the IGF-1 serum level between injected and noninjected animals, and this result is in agreement with previous observations obtained with animals receiving local delivery of IGF-1 either in skeletal or cardiac muscle [4, 28].

At a macroscopic level, a significant reduction in body weights was observed between healthy, CHF147 non-treated or treated groups. This difference can reflect both cardiac cachexy and the myopathic lesions that reduce the muscular mass. Upon microscopic observation, we noted differences in the left ventricular shape as reflected by posterior wall-to-inter ventricular septum (PW-to-IVS) ratios. Protein treatment restores a close to normal ratio, whereas the pCMV-IGF1 treated group displays some asymmetry in wall thickness. These differences are probably due to the two different methods of administration used and also to the fact that IGF-1 produced by transfected myocardium has a spatially limited action while rh IGF-1 is available to the entire myocardium. Lastly, myocardial fibrosis showed a trend towards decrease in rh IGF-1 treated animals, the decrease reaching significance in the pCMV-IGF1 treated group when compared to non-treated hamsters.

At the functional level, we noted a trend towards increased cardiac output in the pCMV-IGF1 treated group when compared to the non-treated group and no statistical difference when compared to the sham-oper-

ated group. As heart rate is not different between the non-treated and the treated groups, the improvement of cardiac output can be due to an increase of stroke volume. Moreover, we observed an increase of contractility (dp/dt_{max}) and relaxation (dp/dt_{min}) in the rh IGF-1 group and a trend in the pCMV-IGF1 group when compared to the sham-treated group. The improvement of cardiac contractility after pCMV-IGF1 treatment can also be seen in the P/V loops, by an increase of the ESPVR slope. Our immunohistochemical data suggest that the complete loss of dystrophin and the associated proteins could lead to a lack of force transmission in diseased animals as the sharp decrease of the ESPVR slope shows on the functional data. The improved contractility in IGF-1 treated animals could be explained at least in part by the preservation of the dystrophin related membrane complex. Thus, we suggest that beside the initial defect of the sarcoglycan, secondary loss of associated protein such as dystrophin might explain the secondary degradation of the cardiac function.

In conclusion, this study showed that a local myocardial treatment using IGF-1 is able to induce diffuse and balanced modifications that allow an increase of the cardiac function. Hence, IGF-1 appears to be a promising molecule for the treatment of heart failure in DCM. Nevertheless, it could be interesting to test other molecules implicated in the IGF-1 pathway, which could have similar beneficial effects on heart failure than IGF-1.

Binding of IGF-1 activates the IGF-1 receptor which leads to the activation of two signaling pathways: the Ras-Raf-MEK-ERK pathway and the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway [8]. It has been shown that the pathway downstream of Ras is inactivated during hypertrophy in contrast to the PI3K-Akt pathway, which is activated. It is also known that Akt1 activity is required for IGF-1-mediated hypertrophy, and its activation is sufficient to induce muscle hypertrophy [8]. Mc Mullen et al. showed that the activation of the IGF-1/PI3K p110 α /Akt is able to induce physiological cardiac hypertrophy [17]. Another study conducted by Chao showed that Akt activation is both necessary and sufficient for many of the beneficial effects of IGF-1 in cardiomyocytes [4].

However, the use of Akt presents drawbacks compared to IGF-1. First, Chao et al. have compared the ability of adenovirus coding for IGF-1 (Ad IGF-1) or a constitutively active Akt (Ad myr-Akt) to protect cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis. They demonstrated that Ad IGF-1 exerts both autocrine and paracrine protection of cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis. In contrast, Ad myr-Akt protected cardiomyocytes only in an autocrine manner. Hence, the use of Akt in the treatment of the myocardium will require a higher efficacy of transduction than IGF-1, which will probably be an important hurdle for clinical application due to the problem of transduction efficacy.

Moreover, Akt has been described as an oncogene [18, 27] and is implicated in cell proliferation [6, 16]. Thus a constitutive activation of this molecule would probably have unwanted side effects. The use of IGF-1 allows a physiologic regulation of the gene expression that will not be possible with Akt, which is downstream of IGF-1 in the molecular pathway.

In conclusion, we have chosen a strategy aimed at inducing a correction of the DCM syndromes, in contrast to Kawada et al. who tried to correct the gene defect using a transduction of the delta-sarcoglycan gene but did not stop the evolution of the pathology [13, 14]. Here, we

have shown that IGF-1 treatment leads to morphological and functional improvements of DCM that slow the evolution of the pathology. Our study also shows that the gene therapy approach allows similar results to be obtained as in protein treatment. However, whether long-term treatment using IGF-1 could display differences between recombinant protein and plasmid is still open.

Acknowledgment We thank Andrée Rouche for her assistance for fibrosis quantitative analysis. We also thank Claire Carrion for her assistance on the ELISA assay for IGF-1 dosing. We acknowledge Association Française contre les Myopathies (AFM) for their financial support.

References

- Anwar A, Gaspoz JM et al. (2002) Effect of congestive heart failure on the insulin-like growth factor-1 system. *Am J Cardiol* 90 (12):1402–1405
- Broglio, F, Fubini A et al. (1999) Activity of GH/IGF-I axis in patients with dilated cardiomyopathy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 50 (4):417–430
- Chan JM, Stampfer MJ et al. (1998) Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* 279 (5350):563–566
- Chao W, Matsui T et al. (2003) Strategic advantages of insulin-like growth factor-I expression for cardioprotection. *J Gene Med* 5 (4):277–286
- Delaughter MC, Taffet GE et al. (1999) Local insulin-like growth factor I expression induces physiologic, then pathologic, cardiac hypertrophy in transgenic mice. *Faseb J* 13 (14):1923–1929
- Diez C, Nestler M et al. (2001) Downregulation of Akt/PKB in senescent cardiac fibroblasts impairs PDGF-induced cell proliferation. *Cardiovasc Res* 49 (4):731–740
- Duerr RL, Huang S et al. (1995) Insulin-like growth factor-1 enhances ventricular hypertrophy and function during the onset of experimental cardiac failure. *J Clin Invest* 95 (2):619–627
- Glass DJ (2003) Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol Med* 9 (8):344–350
- Hankinson SE, Willett WC et al. (1998) Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* 351 (9113):1393–1396
- Hunter EG, Hughes V et al. (1984) Cardiomyopathic hamsters, CHF 146 and CHF 147: a preliminary study. *Can J Physiol Pharmacol* 62 (11):1423–1428
- Ikeda Y, Gu Y et al. (2002) Restoration of deficient membrane proteins in the cardiomyopathic hamster by in vivo cardiac gene transfer. *Circulation* 105 (4):502–508
- Juul A (2003) Serum levels of insulin-like growth factor I and its binding proteins in health and disease. *Growth Horm IGF Res* 13 (4):113–170
- Kawada T, Nakazawa M et al. (2002) Rescue of hereditary form of dilated cardiomyopathy by rAAV-mediated somatic gene therapy: amelioration of morphological findings, sarcolemmal permeability, cardiac performances, and the prognosis of TO-2 hamsters. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (2):901–906
- Kawada T, Sakamoto A et al. (2001) Morphological and physiological restorations of hereditary form of dilated cardiomyopathy by somatic gene therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 284 (2):431–435
- Kontoleon PE, Anastasiou-Nana MI et al. (2003) Hormonal profile in patients with congestive heart failure. *Int J Cardiol* 87 (2–3):179–183
- Lawlor MA, Alessi D.R (2001) PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* 114 (Pt 16):2903–2910
- McMullen JR, Shioi T et al. (2003) Phosphoinositide 3-kinase (p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (21):12355–12360
- Mirza AM, Kohn AD et al. (2000) Oncogenic transformation of cells by a conditionally active form of the protein kinase Akt/PKB. *Cell Growth Differ* 11 (6):279–292
- Osterziel KJ, Ranke MB et al. (2000) The somatotrophic system in patients with dilated cardiomyopathy: relation of insulin-like growth factor-1 and its alterations during growth hormone therapy to cardiac function. *Clin Endocrinol (Oxf)* 53 (1):61–68
- RALES_study_group (1996) Effectiveness of spironolactone added to an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a loop diuretic for severe chronic congestive heart failure (the Randomized Aldactone Evaluation Study [RALES]). *Am J Cardiol* 78 (8):902–907
- Reiss K, Cheng W et al. (1996) Overexpression of insulin-like growth factor-1 in the heart is coupled with myocyte proliferation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (16):8630–8635
- Ren J, Samson WK et al. (1999) Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 31 (11):2049–2061
- Ryoke T, Gu Y et al. (1999) Progressive cardiac dysfunction and fibrosis in the cardiomyopathic hamster and effects of growth hormone and angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation* 100 (16):1734–1743
- Sakamoto A, Ono K et al. (1997) Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, delta-sarcoglycan, in hamster: an animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (25):13873–1388
- Samarel AM (2002) IGF-1 Overexpression rescues the failing heart. *Circ Res* 90 (6):631–633
- Schulze PC, Gielen S et al. (2003) Muscular levels of proinflammatory cytokines correlate with a reduced expression of insulinlike growth factor-I in chronic heart failure. *Basic Res Cardiol* 98 (4):267–274
- Shin I, Yakes FM et al. (2002) PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 8 (10):1145–1152

28. Takahashi T, Ishida K et al. (2003) IGF-I gene transfer by electroporation promotes regeneration in a muscle injury model. *Gene Ther* 10 (8):612–620
29. Vasan RS, Sullivan LM et al. (2003) Serum insulin-like growth factor I and risk for heart failure in elderly individuals without a previous myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Ann Intern Med* 139 (8):642–648
30. Vetter U, Kupferschmid C et al. (1988) Insulin-like growth factors and insulin increase the contractility of neonatal rat cardiocytes in vitro. *Basic Res Cardiol* 83 (6):647–654
31. Wang PH (2001) Roads to survival: insulin-like growth factor-1 signaling pathways in cardiac muscle. *Circ Res* 88 (6):552–554

C-Annexe 3 : Article 2

Serose A, Salmon A, Fiszman MY, Fromes Y. Short-term treatment using Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) improves life expectancy of the delta-sarcoglycan deficient hamster. *J Gene Med*, 2006. **8**(8): 1048-55.

Short-term treatment using insulin-like growth factor-1 (IGF-1) improves life expectancy of the delta-sarcoglycan deficient hamster

Armelle Serose¹
André Salmon¹
Marc Y. Fiszman¹
Yves Fromes^{1,2*}

¹*Institut de Myologie, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U582, Université Pierre et Marie Curie, AP HP, CHU Pitié-Salpêtrière, IFR 14, Paris, France*

²*Saint Joseph Hospital, Department of Cardiac Surgery, Paris, France*

*Correspondence to: Yves Fromes, Institut de Myologie – INSERM U582, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, 47 Boulevard de L'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France.
E-mail: y.fromes@myologie.chups.jussieu.fr

Abstract

Background The hamster strain CHF147 presents a progressive dilated cardiomyopathy (DCM) due to a large deletion of the delta-sarcoglycan gene that leads to heart failure. This cardiomyopathy induces premature death. We have previously shown that a short-term treatment using IGF-1 preserves cardiac structure and improves function of the CHF147 hamster.

Methods In the current study, we measured long-term effects of short-term treatment with recombinant human IGF-1 (rhIGF-1) in CHF147 hamsters. CHF147 hamsters (7–8 months old) were implanted under the skin with an osmotic pump filled either with saline or with recombinant human IGF-1 at a total dose of 25 µg. The osmotic pump allowed a continuous delivery of the protein for a mean duration of 19 days.

Results We observed a significant increase in overall survival, as well as preservation of cardiac function, in the rhIGF-1-treated group. At the time of death, hearts of treated animals did not present any macroscopical or histological differences compared to those of sham hamsters. These results show that rhIGF-1 treatment slows down the evolution of the DCM in the CHF147 hamster. Moreover, the low dose treatment did not increase IGF-1 serum levels.

Conclusions This study is the first one reporting beneficial effects of IGF-1 treatment on survival of an animal model presenting DCM. Our results raise hopes for a new therapeutic approach of this pathology. Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords cardiomyopathy; pathology; heart failure; growth factor; IGF-1; survival

Introduction

Cardiomyopathies evolve through a multiple step process. Dilated cardiomyopathies (DCM), which are characterized by a dilatation of the left ventricle and/or the right ventricle, associated with functional alterations, always end in heart failure. Functional alterations can be stratified according to the NYHA classification and vital prognosis of the patients is directly related to their NYHA functional class [1].

So far, the aim of drug therapy in DCM is to attenuate symptoms due to the failing heart; however, no curative treatments are available. Thus, developing novel therapeutic strategies aimed at improving the vital prognosis of patients have been a challenge over the last years.



Received: 15 December 2005
Revised: 31 March 2006
Accepted: 10 April 2006

In this context, we are using a model of inherited cardiomyopathy, the CHF147 hamster, described by Hunter *et al.* [2]. These hamsters present a large deletion of the delta-sarcoglycan gene leading to a total lack of transcripts and, therefore, the delta-sarcoglycan protein, a structural component of all muscle cell membranes [3]. This animal model displays both morphological and functional alterations of the cardiac muscle. As for patients, the CHF147 hamsters' myopathy is responsible for premature death due to the cardiac symptoms.

Researchers have been working on a new concept for the treatment of heart failure [4–10]: Growth factor induced myocardial preservation, in order to maintain an improved functional status of the myocardium, as opposed to changing the hemodynamic environment. A number of studies have shown that insulin-like growth factor-1 (IGF-1), which partly mediates the effects of the growth hormone (GH), could be of particular interest in the treatment of heart diseases such as heart failure [11–13]. Improvements in congestive heart failure patients with DCM raised hopes for patients with genetically determined myopathies, with associated heart disease.

We have previously shown that a short-term treatment using a low dose of recombinant human IGF-1 (rhIGF-1) protein induces cardiac structural and functional improvements in the CHF147 hamster and may delay the progression of DCM [14].

Long-term studies measuring the effects of GH on survival have been realized. Jin *et al.* observed a trend toward improved survival in rats with acute myocardial infarction receiving early GH treatment for 14 days [15]. A longer GH treatment (28 days) induced a significant improvement in overall survival [6]. IGF-1 is known to improve cardiomyocyte survival by inhibiting apoptosis but there are no data available on the effects of IGF-1 on mean survival in animal models of heart failure [16].

In the current study, we wondered if the beneficial effects observed in our hamster model of DCM after a short-term treatment using rhIGF-1 could induce an improvement of overall life expectancy. In order to answer that question, we have treated CHF147 hamsters with rhIGF-1 at low dose during a short period of time and realized a survival study. The mean survival of the CHF147 hamster strain is 350 days [2]. Here, we show that mean survival of CHF147 hamsters can be lengthened by short-term IGF-1 treatment. Thus, this work presents the first results on the effects of IGF-1 treatment on overall survival of an animal model of DCM.

Materials and methods

Animals and experimental protocols

Male Syrian hamsters (wild type and CHF147) were used for the experiments. Wild-type (healthy group) Syrian hamsters (strain Rj: AURA) were purchased from Elevage Janvier, France. CHF147 hamsters were bred at the

local animal facility of the Institut de Myologie. Care of the animals was performed as previously described [14]. Wild-type Syrian hamsters and non-treated CHF147 hamsters were used to establish reference groups. CHF147 hamsters (7–8 months old) were randomized into two groups: a control group was sham operated receiving an osmotic pump filled with saline (sham group, $n = 5$) and a group in which animals were treated with recombinant human IGF-1 (rhIGF-1; Chemicon International, Inc., CA, USA) at a total dose of 25 μg (rhIGF-1 treated group, $n = 7$) which was delivered by an osmotic pump (model 2002, Alzet, CA, USA) implanted under the skin. The Alzet model 2002 osmotic pump allows a continuous delivery of the protein during 19 days.

Echocardiography

Transthoracic echocardiography was performed in the hamsters using an Acuson 128XP/10 cardiac ultrasound machine with an Acuson 10 MHz linear probe (Mountain View, CA, USA). Hamsters were slightly anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (75 mg/kg), xylazine (15 mg/kg) and midazolam (0.75 mg/kg) and maintained at room temperature. Left ventricular (LV) parameters were obtained from M-mode recordings in a modified short axis view. Interventricular septal wall thickness in diastole (IVSd), posterior wall thickness in diastole (PWd), LV end-diastolic (LVEDD) and LV end-systolic (LVESD) diameters were calculated from the mean of at least three separate cardiac cycles. Based on the results of each diameter, the percentage of LV fractional shortening (FS) was calculated as follows: $(LVEDD - LVESD) / LVEDD \times 100$.

Electrocardiogram

Long-term telemetric ambulatory ECG was recorded in hamsters by means of implantable transmitters (TA10-ETA-F20, Data Sciences International, MN, USA). Instrumentation of all animals was performed under anesthesia delivered by intraperitoneal injection of ketamine (75 mg/kg), xylazine (15 mg/kg) and midazolam (0.75 mg/kg). Antibio prophylaxis was obtained by subcutaneous injection of ampicillin (100 mg/kg). Briefly, wire electrodes were placed in order to emulate standard lead II. Implantable ECG electrodes were sutured on the intercostals muscles, avoiding the high impedance of the skin. Transmitters were inserted subcutaneously in the dorsal region. The animals were placed in cages on top of a receiver (RPC-1, Data Sciences International, MN, USA) for transmission of ECG signals connected to a computer for display and analysis by Dataquest™ A.R.T.™ software (Data Sciences International, MN, USA). Telemetric ECG tracings were obtained in conscious and unrestrained animals during rest periods at daytime and the RR intervals. Single records were performed for 1 min and repeated every 10 min. Specific data analysis was performed with

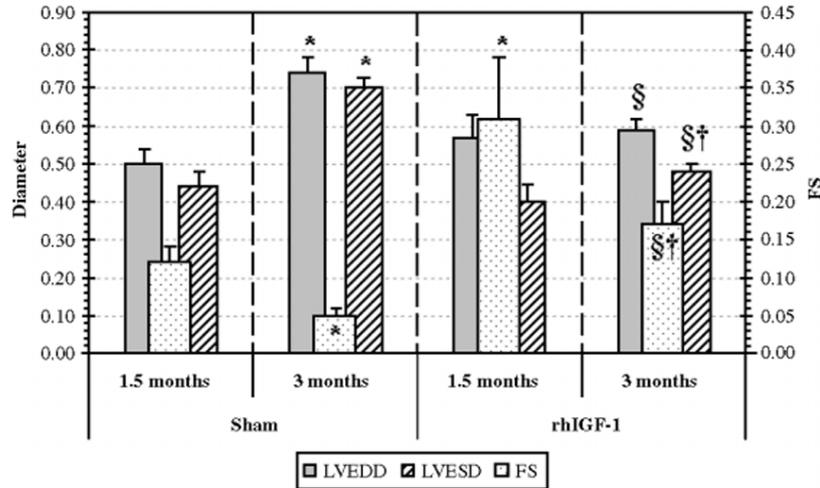


Figure 2. Cardiac functional preservation in CHF147 hamsters after rhIGF-1 treatment. Echocardiography of treated hamsters' hearts exhibited greater fractional shortening (FS) and decreased end-systolic diameters indicating enhanced cardiac contractility. Over time, increase of LV diameters during diastole and systole was larger in sham-treated animals. IGF-1 treatment induced significant preservation of FS. 1.5 months and 3 months, respectively, mean 1.5 months and 3 months after implantation of the osmotic pumps. Diameters are given in cm; grey bars represent LVEDD; lined bars represent LVESD; and dotted bars represent FS; * $p < 0.05$ vs. sham group at 1.5 months, $^{\$}p < 0.05$ vs. sham group at 3 months, and $^{\dagger}p < 0.05$ vs. rhIGF-1 group at 1.5 months

0.70 ± 0.03 at 1.5 and 3 months, respectively, $p < 0.001$), demonstrating an enlargement of cardiac dilation. These increases came with statistical decrease of FS (0.12 ± 0.02 and 0.05 ± 0.01 at 1.5 and 3 months, respectively, $p < 0.001$), revealing a deterioration of the cardiac function. The treated hamster also displayed an increase in LVEDD (0.57 ± 0.06 and 0.59 ± 0.03 at 1.5 and 3 months, respectively, p non-significant) and LVESD (0.40 ± 0.05 and 0.48 ± 0.02 at 1.5 and 3 months, respectively, $p = 0.007$). However, these increases were lower when compared to those of the sham hamster. These results demonstrate that cardiac dilation was slowed down in the rhIGF-1-treated hamster. At 1.5 months after the implantation of the osmotic pumps, FS of the rhIGF-1 hamster was 2.5 times higher than FS of the sham hamster (0.31 ± 0.08 and 0.12 ± 0.02 , respectively, $p < 0.001$). At 3 months after the implantation, FS was significantly reduced in the treated group (0.31 ± 0.08 and 0.17 ± 0.03 , respectively, $p = 0.005$). However, FS of the rhIGF-1 hamster at 3 months after implantation was still higher than FS of the sham hamster at 1.5 months (0.17 ± 0.03 and 0.12 ± 0.02 , respectively, $p < 0.001$) and was about 3 times higher than FS of the sham hamster at 3 months (0.17 ± 0.03 and 0.05 ± 0.01 , respectively, $p = 0.002$). Hence, slowing down cardiac dilation induced preservation of cardiac function in the rhIGF-1-treated hamster. A high degree of heart rate (HR) variability is found in hamsters with normal hearts (data not shown), whereas low HR variability can be found in animals with a cardiomyopathy. We performed short-term recordings of heart rate variability (HRV) in CHF147 hamsters based on 1-min segments recorded every 10 min, 24 h a day. RR intervals were analyzed per segment. Figure 3 shows a Poincaré's diagram comparing

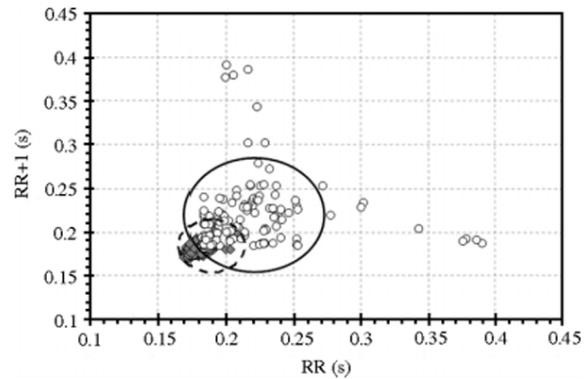


Figure 3. Heart rate variability (HRV) in sham and rhIGF-1-treated hamsters. Characteristic Poincaré diagrams indicate the variability of the RR intervals with reference to the following (RR + 1) intervals in sham and rhIGF-1-treated hamsters. Grey diamonds represent distribution of sham hamsters and white circles represent distribution of the rhIGF-1-treated hamsters. Dotted circle circumscribes HRV envelope of sham hamster and plain circle circumscribes heart rate variability envelope of rhIGF-1-treated hamster

treated versus non-treated hamsters. RR variability was substantially higher in treated subjects than in control animals.

Final issues are similar but time course is different in sham and rhIGF-1 groups

The evolution curves of mean BW of each group are reported in Figure 4. Sham and rhIGF-1 groups displayed similar evolution of their mean BW from implantation of osmotic pumps until death. Moreover, both groups

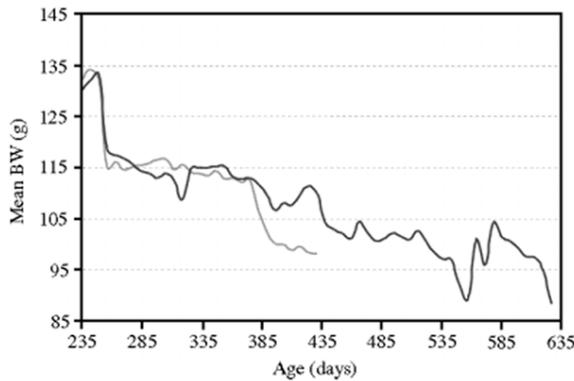


Figure 4. Evolution of mean body weights in sham and rhIGF-1 treated groups. Grey curve represents mean body weight evolution of sham group and black curve represents mean body weight evolution of rhIGF-1-treated group

showed similar BW at the beginning of the study, after the implantation of the osmotic pumps (134.22 ± 9.75 g and 132.10 ± 15.17 g, respectively, p non-significant) as well as at the end of the study (104.04 ± 15.09 g and 90.55 ± 21.53 g, respectively, p non-significant). CHF147 cardiac pathology induced an important weight loss in both groups (22.49% in the sham group and 31.45% in the rhIGF-1 group, p non-significant). Hence, even if hamsters in both groups are dying of the same pathology, time of death is delayed in rhIGF-1-treated hamsters when compared to sham hamsters.

Cardiac morphology and structure are progressively altered during life of CHF147 hamsters

Measures of weights, cardiac diameters and wall thicknesses at the time of death in healthy, sham and rhIGF-1 groups are reported in Table 1. Ventricle weight-to-body weight (VW/BW) ratios were significantly increased in the sham and rhIGF-1 groups compared to the healthy group, due to a statistical reduction of the BW of these two groups. Moreover, cardiac diameters were

Table 1. Macroscopical analysis. Healthy = wild-type Syrian group; Sham = sham group; rhIGF-1 = rhIGF-1-treated group; VW = ventricle weight, in mg; BW = body weight, in g; VW/BW = VW-to-BW ratio, in mg/g; D = cardiac diameter, in mm; PW = posterior wall thickness, in mm; IVS = inter-ventricular septum thickness, in mm; PW/IVS = PW-to-IVS ratio; cardiac diameter and thickness measurements were done on cryostat heart sections; * $p < 0.05$ vs. healthy group

| n = | Healthy 19 | Sham 5 | rhIGF-1 7 |
|--------------|------------------|--------------------|-------------------|
| VW (mg) | 529.0 ± 93.1 | 565.1 ± 10.9 | 576.3 ± 142.7 |
| BW (g) | 155.5 ± 17.5 | $104.0 \pm 15.1^*$ | $90.6 \pm 21.5^*$ |
| VW/BW (mg/g) | 3.41 ± 0.56 | $5.77 \pm 0.78^*$ | $6.58 \pm 1.15^*$ |
| D (mm) | 8.38 ± 0.36 | $9.64 \pm 0.66^*$ | $9.30 \pm 0.79^*$ |
| PW (mm) | 1.92 ± 0.15 | 2.03 ± 0.74 | 2.03 ± 0.48 |
| IVS (mm) | 1.38 ± 0.32 | 1.72 ± 0.32 | 1.40 ± 0.21 |
| PW/IVS | 1.44 ± 0.27 | 1.16 ± 0.32 | 1.46 ± 0.34 |

significantly enhanced in both sham and rhIGF-1 groups. Posterior wall (PW) and inter-ventricular septum (IVS) thickness and PW-to-IVS ratios remained unchanged in both CHF147 groups compared to the healthy group.

Histological staining of non-treated CHF147 hamsters' heart sections at different ages are presented in Figure 5. Hematoxylin-eosin (H&E) staining allows visualization of nuclei, in purple, and cytoplasm, in pink. Sirius red (SR) stains both collagens of type I and of type III in red and then reveals interstitial fibrosis. At young age (4 months old), small cardiac lesions containing little dense collagens I and III were already found on heart sections of non-treated CHF147 hamsters. Cardiac tissue surrounding lesions presented a normal structure. At adult age (8 months old), histological lesions spread out and were replaced by interstitial fibrosis. Cardiac tissue surrounding lesions was still preserved. At old age (11 months old), non-treated CHF147 hamsters exhibited important cardiac lesions corresponding to interstitial fibrosis. Moreover, cardiac tissue surrounding lesions was disorganized. Thus, non-treated CHF147 hamsters displayed a progressive evolution of cardiac histological scars through their life, corresponding to the progressive evolution of their DCM.

Histological staining of sham and rhIGF-1-treated heart sections at the time of death is shown in Figure 6. H&E staining revealed extended cardiac lesions surrounded by more preserved areas in both sham and rhIGF-1-treated groups. The cardiac lesions were replaced by important interstitial fibrosis as shown by SR staining. Histological staining of heart sections at the time of death did not allow us to differentiate sham and rhIGF-1-treated groups.

Discussion

IGF-1 has been shown to be of therapeutic interest in animal models of heart failure as well as in human cardiac pathologies. IGF-1 improves cardiac function in a canine model of pacing-induced cardiomyopathy, probably in part because of its anti-apoptotic effects [17]. Recombinant human IGF-1 (rhIGF-1) treatment of experimental heart failure in rats induces an hypertrophy that produced a beneficial physiological effect [5]. IGF-1 overexpression also induces morphological and functional cardiac improvements in tropomodulin over-expressing transgenic mice [7]. The acute administration of IGF-1 in patients with chronic heart failure improves cardiac performance [8]. Hence, IGF-1 displays important cardioprotective effects, acting both in an autocrine and a paracrine manner, and appears to have an attractive therapeutic profile in the context of cardiac diseases such as heart failure. However, all of these beneficial effects were shown shortly after treatment. It has been shown that long-lasting treatments using either GH or IGF-1 induce side effects [18–20]. Nevertheless, persistence of beneficial effects of short-term treatment using IGF-1 is still unknown.

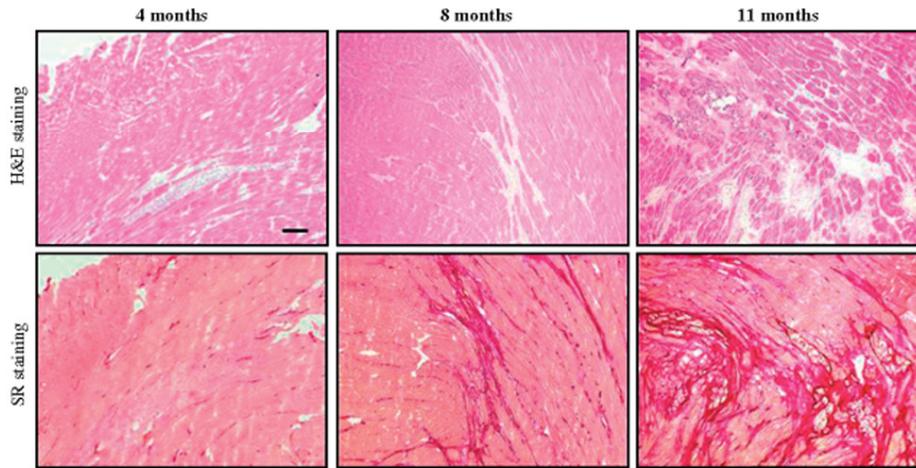


Figure 5. Evolution of cardiac scars of non-treated CHF147 hamsters during life. Upper panels correspond to hematoxylin-eosin (H&E) staining and lower panels correspond to Sirius red (SR) staining counterpart of non-treated CHF147 hamsters' heart sections. H&E staining provides an overview of cardiac structure and SR staining allows visualization of interstitial fibrosis extent; magnification: 10 \times , scale bar: 100 μ m

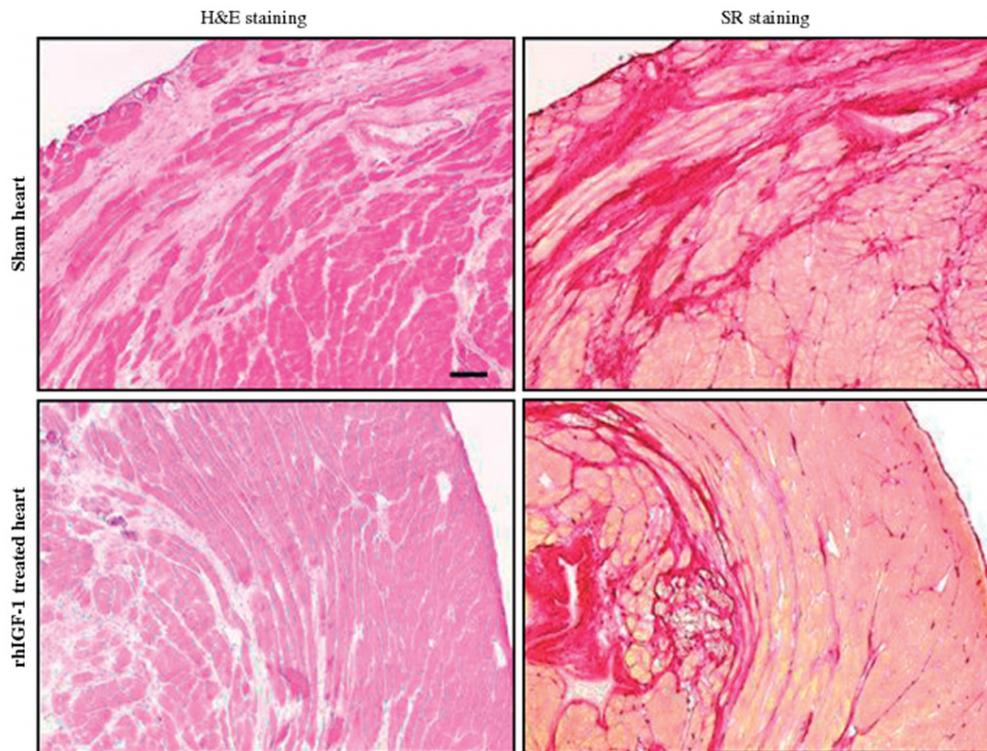


Figure 6. Histological staining of heart sections in sham and rhIGF-1-treated hamsters. Upper panels correspond to sham heart sections and lower panels to rhIGF-1-treated heart sections; left panels show H&E and right panels show SR staining counterpart; magnification: 10 \times , scale bar: 100 μ m

In this study, we have investigated the long-term effects of short-term treatment with the rhIGF-1 protein in a model of DCM, the CHF147 hamster strain. Hunter *et al.* showed that this model exhibits a mean survival of approximately 350 days in population studies [2]. The population of CHF147 hamsters available in our

laboratory displays a mean survival of 370 days, which is not different from Hunter's data. In this study, the sham group shows a mean survival of 405 days. This difference can be due to improved housing conditions of individuals in our study. Short-term systemic administration of rhIGF-1 induces significant beneficial effects on overall

survival of CHF147 hamsters. In our study, the treated hamsters present a significant increase of 20% of the overall survival compared to the sham group. Moreover, half of the rhIGF-1-treated hamsters were still alive by the time that all of the sham hamsters were dead. Thus, short term rhIGF-1 treatment lengthens the mean lifespan of CHF147 hamsters.

The increase in overall survival in the rhIGF-1-treated group can be explained by a delay of the cardiac dilatation coupled with functional preservation of the heart. Deterioration of the sham hamsters' cardiac dilatation is evidenced by the increase of both left ventricular end diastolic and systolic diameters. In the rhIGF-1 treated hamsters, this cardiac dilatation is delayed, as shown by the lower increase of left ventricular end diastolic and systolic diameters. Ventricular performance was evaluated by measure of fractional shortening (FS). The sham hamsters present a decrease of FS, which characterizes cardiac function of the CHF147 hamsters. This decrease indicates impairment of ventricular performance. The rhIGF-1-treated group displays a better preservation of the FS compared to the sham group, which implies a better conservation of ventricular performance. Hence, short-term rhIGF-1 treatment delays cardiac dilatation and upholds cardiac function, inducing a lengthening of the lifespan of the CHF147 hamsters.

Furthermore, electrophysiological data support this point. Heart rate variability (HRV) reveals information on the functional state of the autonomic nervous system (ANS). During severe illness, HRV is impaired [21]. The ANS plays a major role in affecting the cardiac milieu and promoting malignant ventricular activity. The high mortality of heart failure is associated with hemodynamic abnormalities, reduced exercise capacity, and depressed cardiac function [22]. More specifically, heart failure is associated with altered HRV. Our data demonstrate that HRV can be preserved to some extent by low-dose short-term IGF-1 treatment.

The results of our histological study on the evolution of the pathology through the lives of CHF147 hamsters are in concordance with the observations made by Hunter *et al.* [2]. Histological staining of heart sections of CHF147 hamsters showed a progressive deterioration of myocardial structure. At the time of death, heart sections of rhIGF-1-treated hamsters did not display any structural differences when compared to heart sections from sham hamsters. However, treated CHF147 hamsters demonstrated a transient but rather persistent modification after treatment, which led to increased survival. As expected, DCM is still the cause of death of the CHF147 hamsters but IGF-1 treatment prolonged survival.

The morphological study, realized by weekly measurement of hamsters' body weight, did not show any effect of rhIGF-1 on this parameter. This could be explained by the use of a low dose of rhIGF-1 without any increase in IGF-1 serum levels. Therefore, muscle mass was not expected to change significantly. Cachexia, which is characterized

by loss of weight, muscle wasting, fatigue, weakness and decrease of appetite, is often associated with heart failure. Here, we show that sham and rhIGF-1-treated hamsters lose weight in a similar proportion. However, at the time of death, hamsters from the treated group were leaner than the sham hamsters because of their prolonged life expectancy. It is difficult, in this study, to distinguish among function related to heart failure or myopathy-associated cachexia.

In our study, measurements of IGF-1 serum levels do not display any difference between Syrian and CHF147 hamsters. Moreover, we did not detect any difference after systemic delivery of rhIGF-1 in CHF147 hamsters, neither shortly after treatment, nor at the time of death. This is probably due to the method of administration and the use of a low dose of rhIGF-1 (25 µg). Data in the literature are difficult to compare because of the use of variable doses and animal models. At moderate or high dose, IGF-1 level in the serum is significantly elevated [5,8,17,23]. However, it appears that a low dose of IGF-1 might be able to induce muscle hypertrophy without increasing circulating serum levels. Therefore, our results are in accordance with Adams and McCue [24]. The IGF-1 endocrine pathway is important in human heart failure because it has been shown that IGF-1 serum level is inversely related to the risk of congestive heart failure [25,26]. A strategic approach in human heart failure treatment could be normalizing the IGF-1 serum level. Here we show that, in hamsters, a normal level of IGF-1 supplied with a low dose of rhIGF-1 can induce phenotypic improvements in DCM. This could be explained by the activation of molecular and cellular pathways and has still to be determined.

Even though mechanisms are still unknown, our study shows that a short-term treatment using rhIGF-1 can induce long-term beneficial effects on the evolution of DCM in the CHF147 hamsters.

Acknowledgement

We acknowledge Association Française contre les Myopathies (AFM) for their financial support.

References

1. The Criteria Committee of the NYHA. Revision to Classification of Functional Capacity and Objective Assessment of Patients with Disease of the Heart. In *Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of the Heart and Great Vessels* (9th edn). Brown & Co Ltd.: Boston, 1994; 253–256.
2. Hunter EG, Hughes V, White J. Cardiomyopathic hamsters, CHF 146 and CHF 147: a preliminary study. *Can J Physiol Pharmacol* 1984; **62**: 1423–1428.
3. Sakamoto A, Ono K, Abe M, *et al.* Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, delta-sarcoglycan, in hamster: an animal model of disrupted dystrophin associated glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 13873–13878.
4. Fazio S, Sabatini D, Capaldo B, *et al.* A preliminary study of growth hormone in the treatment of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1996; **334**: 809–814.

5. Duerr RL, Huang S, Miraliakbar HR, *et al.* Insulin-like growth factor-1 enhances ventricular hypertrophy and function during the onset of experimental cardiac failure. *J Clin Invest* 1995; **95**: 619–627.
6. Cittadini A, Isgaard J, Monti MG, *et al.* Growth hormone prolongs survival in experimental postinfarction heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2003; **41**: 2154–2163.
7. Welch S, Plank D, Witt S, *et al.* Cardiac-specific IGF-1 expression attenuates dilated cardiomyopathy in tropomodulin-overexpressing transgenic mice. *Circ Res* 2002; **90**: 641–648.
8. Donath MY, Sutsch G, Yan XW, *et al.* Acute cardiovascular effects of insulin-like growth factor I in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; **83**: 3177–3183.
9. Donath MY, Froesch ER, Zapf J. Insulin-like growth factor I and cardiac performance in heart failure. *Growth Horm IGF Res* 1998; **8**(Suppl B): 167–170.
10. McElhinney DB, Colan SD, Moran AM, *et al.* Recombinant human growth hormone treatment for dilated cardiomyopathy in children. *Pediatrics* 2004; **114**: e452–458.
11. Anwar A, Gaspoz JM, Pampallona S, *et al.* Effect of congestive heart failure on the insulin-like growth factor-1 system. *Am J Cardiol* 2002; **90**: 1402–1405.
12. Osterziel KJ, Strohm O, Schuler J, *et al.* Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of human recombinant growth hormone in patients with chronic heart failure due to dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1998; **351**: 1233–1237.
13. Ren J, Samson WK, Sowers JR. Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 1999; **31**: 2049–2061.
14. Serosé A, Prud'homme B, Salmou A, *et al.* Administration of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) improves both structure and function of delta-sarcoglycan deficient cardiac muscle in the hamster. *Basic Res Cardiol* 2005; **100**: 161–170.
15. Jin H, Yang R, Lu H, *et al.* Effects of early treatment with growth hormone on infarct size, survival, and cardiac gene expression after acute myocardial infarction. *Growth Horm IGF Res* 2002; **12**: 208–215.
16. Chao W, Matsui T, Novikov MS, *et al.* Strategic advantages of insulin-like growth factor-I expression for cardioprotection. *J Gene Med* 2003; **5**: 277–286.
17. Lee WL, Chen JW, Ting CT, *et al.* Insulin like growth factor I improves cardiovascular function and suppresses apoptosis of cardiomyocytes in dilated cardiomyopathy. *Endocrinology* 1999; **140**: 4831–4840.
18. Anker SD, Volterrani M, Pflaum CD, *et al.* Acquired growth hormone resistance in patients with chronic heart failure: implications for therapy with growth hormone. *J Am Coll Cardiol* 2001; **38**: 443–452.
19. Delaughter MC, Taffet GE, Fiorotto ML, *et al.* Local insulin-like growth factor I expression induces physiologic, then pathologic, cardiac hypertrophy in transgenic mice. *FASEB J* 1999; **13**: 1923–1929.
20. Marleau S, Lapointe N, Massicotte J, *et al.* Effect of chronic treatment with bovine recombinant growth hormone on cardiac dysfunction and lesion progression in UM-X7.1 cardiomyopathic hamsters. *Endocrinology* 2002; **143**: 4846–4855.
21. Giudice PL, Gagnol JP, Bellucci A, *et al.* Autonomic nervous system activity imbalance in cardiomyopathic hamster. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; **36**: 369–375.
22. Adamson PB, Smith AL, Abraham WI, *et al.* Continuous autonomic assessment in patients with symptomatic heart failure: prognostic value of heart rate variability measured by an implanted cardiac resynchronization device. *Circulation* 2004; **110**: 2389–2394.
23. Ren J. Short-term administration of insulin-like growth factor I (IGF-1) does not induce myocardial IGF-1 resistance. *Growth Horm IGF Res* 2002; **12**: 162–168.
24. Adams GR, McCue SA. Localized infusion of IGF I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. *J Appl Physiol* 1998; **84**: 1716–1722.
25. Rouberioff R, Parise H, Payette HA, *et al.* Cytokines, insulin-like growth factor 1, sarcopenia, and mortality in very old community-dwelling men and women: the Framingham Heart Study. *Am J Med* 2003; **115**: 429–435.
26. Vasan RS, Sullivan LM, D'Agostino RB, *et al.* Serum insulin-like growth factor I and risk for heart failure in elderly individuals without a previous myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Ann Intern Med* 2003; **139**: 642–648.