



HAL
open science

Modifications post-traductionnelles des protéines contractiles cardiaques : nouveaux biomarqueurs du remodelage ventriculaire post-infarctus

Emilie Dubois

► **To cite this version:**

Emilie Dubois. Modifications post-traductionnelles des protéines contractiles cardiaques : nouveaux biomarqueurs du remodelage ventriculaire post-infarctus. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2010. Français. NNT : 2010LIL2S023 . tel-00580405

HAL Id: tel-00580405

<https://theses.hal.science/tel-00580405>

Submitted on 28 Mar 2011

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.

UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA SANTÉ LILLE 2

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ

en Sciences de la Vie et de la Santé

**Modifications post-traductionnelles des protéines
contractiles cardiaques : nouveaux biomarqueurs du
remodelage ventriculaire post-infarctus**

Soutenue publiquement le 18 octobre 2010 par

Emilie DUBOIS

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Luc Hittinger

Rapporteur

Monsieur le Docteur Philippe Rouet

Rapporteur

Monsieur le Docteur Vincent Richard

Examineur

Madame le Docteur Florence Pinet

Examineur

Monsieur le Professeur Christophe Bauters

Directeur de thèse

Monsieur le Professeur Philippe Amouyel

Directeur du laboratoire

*À Emeric,
À mes parents,
À ma famille,*

Et bien sûr à mon grand-père.

Mes remerciements vont en particulier à :

Monsieur le Professeur Philippe Amouyel, vous m'avez donné l'opportunité de travailler au sein de votre laboratoire et vous avez suivi avec attention ce travail en m'accordant quelques moments précieux pour l'enrichir, veuillez trouver ici l'expression de mes plus sincères remerciements.

Monsieur le Professeur Christophe Bauters, je vous remercie d'avoir accepté de diriger ce travail. Je vous suis très reconnaissante pour l'aide que vous m'avez apportée tout au long de cette thèse ainsi que pour les discussions scientifiques et médicales que nous avons pu avoir à propos de ce travail et des protocoles qui s'y rattachent. Je vous suis également très reconnaissante d'avoir attaché tant d'importance à la relecture de ce manuscrit ainsi qu'à la préparation de la soutenance. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Madame le Docteur Florence Pinet, qui a dirigé scientifiquement cette thèse, je vous remercie pour tout le dynamisme et l'efficacité dont vous avez fait preuve au quotidien et qui m'ont aidé à mener à bien ce travail. Je tiens à vous adresser mes plus sincères remerciements pour la confiance que vous m'avez accordé pour mener à bien ce projet en me poussant à aller toujours plus loin dans la réflexion et dans la qualité de mon travail tout au long de ces quatre années. Votre aide et votre soutien m'ont permis de donner le meilleur de moi-même chaque jour. Je vous remercie aussi pour votre disponibilité et vos conseils toujours précieux et judicieux. J'ai beaucoup apprécié de travailler avec vous et j'espère qu'à l'avenir nous aurons encore de nombreuses occasions de travailler ensemble.

Monsieur le Docteur Vincent Richard, je vous suis très reconnaissante pour toute l'aide que vous m'avez apporté au long de cette thèse. Je vous remercie pour les nombreuses corrections et le savoir apporté à ce travail. Je vous remercie également de m'avoir accueillie dans votre laboratoire afin de mener à bien ce projet au sein d'une collaboration très fructueuse.

Monsieur le Professeur Luc Hittinger, je suis très sensible à l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail et très honorée que vous ayez accepté d'en être rapporteur. Veuillez y trouver l'expression de ma très haute estime et mes remerciements les plus sincères.

Monsieur le Docteur Philippe Rouet, je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et vous prie de croire en mon plus profond respect. J'apprécie beaucoup l'intérêt que vous portez à ce travail.

Je tiens à remercier particulièrement tous les membres de l'équipe protéomique :

Olivia Beseme, pour l'aide précieuse dans la réalisation de ces quelques centaines de western blot et pour le soutien que tu m'as apporté avec beaucoup de gentillesse tout au long de ce travail.

Maggy Chwastyniak-Huygens, pour ton soutien au cours de ma thèse ainsi que pour ton aide précieuse dans l'apprentissage des techniques de protéomique.

Adelina Acosta-Martin, pour ta bonne humeur et ton aide précieuse en spectrométrie de masse ainsi que pour toutes les discussions que nous avons pu avoir sur ce projet. Je te souhaite que des bonnes choses pour ton post-doctorat en Australie.

Marie Fertin, pour tous les conseils et les nombreuses discussions tant scientifiques que médicales que nous avons pu avoir au cours de cette thèse. Je te souhaite bon courage pour la suite de ta thèse.

Ludovic Boytard, pour ton aide sur les techniques d'immunohistochimie et la mise en page des figures. J'apprécie beaucoup ta bonne humeur quotidienne. Je souhaite que ta thèse se passe pour le mieux.

Justine Burdese, pour avoir accepté de lire avec tant d'attention et de patience ce manuscrit. J'ai beaucoup apprécié tous les conseils médicaux que tu m'as fournis. Je tiens à te remercier également pour tous ces bons moments passer ensemble et te souhaite bon courage pour la suite.

Je remercie également tous les stagiaires de l'équipe protéomique qui ont à leur manière contribué à ce travail : Julie Tisserand, Emilie Desruelles, Julie Dehon, Florian Gillet et Hélène Herdier.

Je tiens à exprimer aussi mes plus sincères remerciements à tous les membres de l'unité 744 qui m'ont soutenu et encouragé tout au long de cette thèse. En particulier, les chercheurs et médecins de l'unité, pour les connaissances scientifiques qu'ils ont bien voulu m'apporter, et l'intérêt qu'ils ont manifesté pour ce travail.

Je remercie également Chantal Steclebout et Anne-Sophie Delbart pour m'avoir apporté toujours avec le sourire une aide logistique précieuse ainsi que Nadine Marecaux qui a toujours fait son possible pour m'aider en matière d'informatique.

Je remercie également Frank Hansmannel et Louisa Goumidi pour leur bonne humeur et leurs conseils avisés dans la mise en place de mon monitorat.

Anne-Marie Ayrat, je te remercie d'avoir été une collègue de bureau si compréhensive et tes conseils très avisés.

Enfin, je remercie la relève qui fait régner une si bonne ambiance au sein du laboratoire avec une pensée spéciale pour mes camarades de pauses café – goûter : Ludo (merci pour toutes ces « bonnes » blagues et pour les DVD de Dexter...), Anais (merci de m'avoir forcé à me remettre au sport pour évacuer tous ces biscuits...), So (merci pour tes cassages si drôle, je compte sur toi pour la relève de l'ancienne...), Flo (merci pour toutes ces discussions jeux-videoïstiques et rendez-vous au MGS2010...) et Justine (merci pour ta bonne humeur toujours partagée....). Je vous souhaite à tous bon courage pour la suite.

Je tiens également à remercier toute l'unité U644 de Rouen pour leur accueil chaleureux lors de mes nombreux déplacements, avec une mention spéciale pour :

Monsieur le Professeur Christian Thuillez, vous avez suivi avec attention ce travail depuis le début et vous m'avez donné l'opportunité de l'enrichir en m'accordant quelques moments précieux ainsi que l'opportunité de travailler au sein de votre laboratoire, veuillez trouver ici l'expression de ma plus sincère reconnaissance.

Monsieur le Docteur Paul Mulder, je te remercie pour l'aide que tu m'as apporté sur les modèles expérimentaux ainsi que sur l'apprentissage de la technique de cœur perfusé isolé. Merci de m'avoir accordé un peu de ton temps pour répondre à mes nombreuses questions et pour m'aider à résoudre tous les petits soucis techniques lors de mes nombreux passages à Rouen.

Je tiens également à remercier Cathy, Sébastien, Aurélia et Emmanuelle pour leur accueil chaleureux, leur bonne humeur, leurs cafés ainsi que pour m'avoir fait découvrir les bons petits restos de la ville. Merci supplémentaire à Cathy pour son aide sur la manipulation des rats.

Un grand merci aussi :

A Caroline Cieniewski-Bernard, pour m'avoir si bien encadrée et formée au cours de mon master.

A Hervé Drobecq, pour m'avoir ouvert les voies de la spectrométrie de masse avec beaucoup de sympathie, de disponibilité et de conseils avisés.

Aux médecins et internes des services de cardiologie du CHRU de Lille et des hôpitaux du Nord-Pas de Calais, qui ont bien voulu contribuer à l'inclusion des patients dans les protocoles cliniques, et aux patients eux-mêmes qui ont accepté de participer aux protocoles.

Aux membres de l'association BioAddoct pour leurs bonnes humeurs et leurs disponibilités lors de la mise en place de cette association et la création de tous nos projets.

Enfin, je profite de l'occasion pour exprimer ma plus sincère gratitude au Docteur Frédéric Chirat, qui a guidé mes tous premiers pas dans la recherche au moment où j'en ai eu le plus besoin.

Pour finir, je remercie du fond du cœur :

Mes parents qui m'ont toujours soutenu, encouragé et aidé tout au long de ces années. Ils ont su me donner toutes les chances pour réussir. Je vous remercie pour tout votre amour et votre soutien.

Mes frères et sœurs, ma famille et belle-famille, pour leurs nombreux encouragements et leur soutien quotidien.

Mes amis proches, Nico, Elisa, Gaylord et Anne-Laure pour toutes ces soirées à l'Alchimiste à refaire le monde. Je vous souhaite bon courage pour vos thèses respectives car je ne suis que la première de la liste.

Enfin et surtout, mes pensées se tournent vers Emeric. Merci pour ton amour et ton soutien sans faille depuis cinq ans qui sont pour moi essentiels. Je te souhaite toute la réussite possible pour ta thèse et serait là à mon tour pour te soutenir.

Ce travail de thèse a donné lieu aux publications et communications suivantes :

Publications originales dans des revues à comité de lecture:

Cieniewski-Bernard C, Acosta A, Dubois E, Lamblin N, Beseme O, Chwastyniak M, Amouyel P, Bauters C, Pinet F. Proteomic analysis in cardiovascular diseases, *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2008) 35, 362-6, review.

Cieniewski-Bernard C, Mulder P, Henry J.P, Drobecq H, Dubois E, Pottiez G, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F. Proteomic analysis of left ventricular remodeling in an experimental model of heart failure, *Proteome Res* (2008) 7(11), 5004-16.

Dubois E, Richard V, Mulder P, Lamblin N, Drobecq H, Henry J. P, Amouyel P, Thuillez C, Bauters C, Pinet F. Decreased Serine207-phosphorylation of troponin T as a biomarker for left ventricular remodelling after myocardial infarction, *Eur Heart J* (2010) [Epub ahead of print].

Dubois E, Mulder P, Cieniewski-Bernard C, Henry J. P, Drobecq H, Flahaut C, Thuillez C, Amouyel P, Richard D V, Pinet F; Phosphorylation and O-GlcNAcylation modulation of contractile proteins in heart failure, soumis.

Dubois E, Fertin M, Burdese J, Amouyel P, Bauters C, Pinet F. Cardiovascular proteomics: Translational studies to develop novel biomarkers in heart failure and left ventricular remodeling, *Proteomics clinical applications* (en révision), review.

Brevet:

Brevet déposé le 22 Mai 2009 par Inserm Transfert et le cabinet Plasseraud : Post-translational modified cardiac troponin T as a biomarker of a risk for heart failure. N° de dépôt: EPO9305471.6 (European patent office)

Revue générale:

Pinet F, Cieniewski-Bernard C, Dubois E, Lamblin N, Beseme O, Chwastyniak M, Amouyel P, Bauters C. Protéomique et marqueurs cardiaques, *Médecine nucléaire* (2007) 31 :580-6.

Communications dans des congrès:

Dubois E, Cieniewski-Bernard C, Mulder P, Drobecq H, Flahaut C, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F. Étude de la phosphorylation des protéines lors du remodelage ventriculaire gauche post-infarctus dans un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque. XXV^{ème} Congrès du GRRC, Mai 2008, Montpellier. *Prix du meilleur poster*.

Dubois E, Cieniewski-Bernard C, Mulder P, Drobecq H, Flahaut C, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F. Phosphoproteome analysis of left ventricular remodeling in an experimental model of heart failure. XI^{ème} Congrès de l'ECCR, Octobre 2008, La Colle sur Loup.

Dubois E, Cieniewski-Bernard C, Mulder P, Drobecq H, Flahaut C, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F. Étude du phosphoprotéome lors du remodelage ventriculaire post-infarctus dans un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque. XXVI^{ème} Congrès du GRRC, Avril 2009, Nancy. *Sélection pour une communication orale*.

Dubois E, Cieniewski-Bernard C, Mulder P, Drobecq H, Flahaut C, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F. Étude du phosphoprotéome lors du remodelage ventriculaire post-infarctus dans un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque. *IX^{ème} Colloque annuel des doctorants (Journée André Verbert)*, Septembre 2009, Lille.

Dubois E, Cieniewski-Bernard C, Mulder P, Drobecq H, Flahaut C, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F. Study of post-translational modifications of contractile proteins in left ventricular remodeling. *XII^{ème} Congrès de l'European Council for Cardiovascular Research (ECCR)*, Octobre 2009, La Colle sur Loup.

Dubois E, Richard V, Mulder P, Lamblin N, Drobecq H., Henry J. P, Amouyel P, Thuillez C, Bauters C, Pinet F. Modifications post-traductionnelles de la troponine T : un biomarqueur potentiel du remodelage ventriculaire gauche post-infarctus. *XXVII Congrès du Groupe de Réflexion sur la recherche cardiovasculaire (GRRC)*, Avril 2010, Nantes. *Prix du meilleur poster*.

Sommaire

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
I) Aspect cliniques et moléculaires des pathologies cardiovasculaires étudiées.....	1
1 Anatomie du cœur sain.....	1
2. Infarctus du myocarde.....	3
2.1 Définition.....	3
2.2 Épidémiologie.....	5
2.3 Facteurs de risque.....	7
2.3.1 <u>Facteurs de risque irréversibles</u>	8
2.3.2 <u>Facteurs de risque réversibles</u>	11
2.4 Biomarqueurs et dépistage.....	13
2.5 Traitements.....	17
3. Remodelage ventriculaire gauche.....	18
3.1 Définition.....	18
3.2 Épidémiologie.....	21
3.3 Dépistage.....	22
3.4 Mécanismes physiopathologiques.....	24
3.4.1 <u>Réexpression du programme foetal</u>	24
3.4.2 <u>Principales voies de signalisation</u>	24
3.4.3 <u>Métabolisme énergétique</u>	27
3.4.4 <u>Apoptose et stress oxydant</u>	30
3.4.5 <u>Protéines contractiles</u>	33
4. Insuffisance cardiaque	39
4.1 Définition.....	39
4.2 Épidémiologie.....	41
4.3 Biomarqueurs.....	42
II) Recherche de biomarqueurs par analyse protéomique.....	47
1 Choix de l'analyse protéomique.....	48
1.1 Définition.....	48
1.2 Intérêt.....	48
1.3 Outils.....	49
1.3.1 <u>Électrophorèse bidimensionnelle</u>	49
1.3.2 <u>Spectrométrie de masse</u>	53
1.3.3 <u>SELDI-TOF</u>	56
1.4 Applications en pathologie cardiovasculaire.....	58

2 Limites de l'analyse protéomique.....	61
2.1 Choix des échantillons.....	61
2.2 Difficulté de l'analyse chez l'homme.....	62
2.3 Choix du modèle expérimental.....	62
III) Modifications post-traductionnelles.....	64
1 Généralités.....	64
2 Intérêt.....	65
3 Phosphorylation.....	66
3.1 Généralités.....	66
3.2 Mécanisme.....	66
3.3 Enzymes impliquées.....	67
3.4 Rôles en pathologies cardiovasculaire.....	68
4 O-N-acétyl-glucosaminylation.....	69
4.1 Généralités.....	69
4.2 Mécanisme.....	69
4.3 Enzymes impliquées.....	71
4.4 Rôles en pathologies cardiovasculaire.....	72
OBJECTIFS.....	73
RÉSULTATS.....	77
<i>Partie 1 : Analyse du protéome du ventricule gauche dans un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque.....</i>	<i>77</i>
I) Objectifs de l'étude.....	77
II) Résultats.....	77
III) Résultats complémentaires.....	78
IV) Discussion.....	78
<i>Partie 2 : Analyse du phosphoprotéome du ventricule gauche dans un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque.....</i>	<i>82</i>
I) Objectifs de l'étude.....	82
II) Résultats.....	82
III) Discussion.....	89
<i>Partie 3 : Rôle de la balance phosphorylation / O-GlcNAcylation dans l'insuffisance cardiaque.....</i>	<i>90</i>
I) Objectifs de l'étude.....	90

II) Résultats.....	90
III) Résultats complémentaires.....	91
IV) Discussion.....	98
<i>Partie 4 : Diminution de la troponine T phosphorylée, un nouveau biomarqueur du remodelage ventriculaire gauche.....</i>	<i>100</i>
I) Objectif de l'étude.....	100
II) Résultats.....	100
III) Discussion.....	101
<i>Partie 5 : Voies de signalisation impliquées dans la diminution de la troponine T phosphorylée.....</i>	<i>102</i>
I) Objectifs de l'étude.....	102
II) Résultats.....	102
III) Résultats complémentaires.....	103
IV) Discussion.....	113
<i>Partie 6 : Utilisation clinique de la troponine T phosphorylée comme biomarqueur potentiel du remodelage ventriculaire gauche.....</i>	<i>115</i>
I) Objectifs de l'étude.....	115
II) Pertinence de l'utilisation de la troponine T phosphorylée comme biomarqueur du remodelage ventriculaire gauche.....	115
III) Développement et caractérisation des anticorps monoclonaux.....	117
IV) Perspectives.....	119
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	121
I) Le modèle expérimental d'insuffisance cardiaque	121
II) Analyse du protéome et du phosphoprotéome du ventricule gauche.....	122
III) Intérêt de la troponine T phosphorylée comme biomarqueur potentiel du remodelage ventriculaire gauche.....	124
IV) Conclusion générale.....	127
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	128

Abréviations

ABRÉVIATIONS

- 2D:** bidimensionnel
- %vol:** Pourcentage volume normalisé
- AA:** Acide aminé
- ACE:** *Angiotensin converting enzyme*
- ACG:** Artère coronaire gauche
- ADN:** Acide déoxyribonucléique
- ADP:** Adénosine diphosphate
- ANP:** Peptide natriurétique de type A
- APP:** Précurseur du peptide amyloïde
- ARN:** Acide ribonucléique
- ATP:** Adénosine triphosphate
- Bande A:** Bande anisotropique
- Bande I:** Bande isotropique
- BNP:** Peptide natriurétique de type B
- CDK:** *Cyclin-dependant kinase*
- CHF:** *Chronic heart failure*
- CK-MB :** Fraction myocardique de la créatine kinase
- Co:** Coenzyme
- CRP:** *C-reactive protein*
- Cyt:** Cytochrome
- Da:** Dalton
- DC:** Débit cardiaque
- DDVG:** Diamètre diastolique du VG
- DEP:** *Density-enhanced protein-tyrosine phosphatase*
- DIGE:** *Differential in-gel electrophoresis*
- DMSO:** Diméthylsulfoxyde
- DSVG:** Diamètre systolique du VG
- ECG:** Électrocardiogramme
- EDTA:** Acide éthylène diamine
- EGFR:** *Epidermal growth factor receptor*
- ELISA:** *Enzyme-linked immunosorbent assay*
- FAD:** Flavine adénine dinucléotide
- FEVG:** Fraction d'éjection du ventricule gauche
- FRET:** *Fluorescence resonance energy transfer*
- FS:** Fraction de raccourcissement
- GAPDH:** Glycéraldéhyde 3-phosphate désydrégénase

Gpx: Glutathion peroxydase
GR: Globules rouges
GRP: *Glucose-regulated protein*
H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène
HDL: *High density lipoprotein*
HNF: *Hepatocyte nuclear factor*
HFPEF: *Heart Failure with Preserved Ejection Fraction*
HSC: *Heat shock cognate*
HSP: *Heat shock protein*
HTA: Hypertension artérielle
IC: Insuffisance cardiaque
IDM: Infarctus du myocarde
IEF: Isoélectrofocalisation
IGF: *Insulin-like growth factor*
IL: Interleukine
INCA: INsuffisance CARdique
IRM: Imagerie par résonance magnétique
JAK: *Janus kinase*
LDL: *Light density lipoprotein*
Ligne M: Ligne *Mittlemembran*
Ligne Z: Ligne *Zwischenscheibe*
MALDI: *Matrix assisted laser desorption/ionization*
MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*
MHC: Chaîne lourde de myosine
MLC: Chaîne légère de myosine
mmHg: Millimètre de mercure
MMP: *Matrix metalloproteinase*
MONICA: *Multinational mOnitoring of treNds and determInants of CARdiovascular diseases*
Mr: Poids moléculaire
MS: *Mass spectrometry*
MT: *Membrane type*
m/z: masse/charge
NAD: Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
NFκB: *Nuclear factor κ B*
NO: *Nitric oxyde*

NT-proBNP: Extrémité N-terminale du BNP

NYHA: *New York Heart Association*

O₂: Oxygène

O₂⁻: Anion superoxyde

O₂[•]: Radical hydroxyle

OD: Oreillette droite

OG: Oreillette gauche

O-GlcNAcase: β-O-N-Acétyleglucosaminidase

O-GlcNAcylation: β-O-N-acétyleglucosaminylation

OGT: β-O-N-Acétyleglucosaminyltransférase

O-P: Phosphorylation

PAGE: *Polyacrylamide gel electrophoresis*

PDGF: *Platelet-derived growth factor*

Pi: Phosphate inorganique

pI: Point isoélectrique

PK: Protéine kinase

PP: Protéine phosphatase

PPAR: *Peroxisomal proliferator-activator receptor*

PTHF: *ProTeomic in Heart Failure*

PTP: *Protein tyrosine phosphatase*

PUGNAc: *O-(2-acétamido-2-déoxy-d-glucopyranosylidène)-amino-N-phénylcarbamate*

REVE: Remodelage VEntriculaire

ROCK: *Rho-associated protein kinase*

ROS: Espèces réactives de l'oxygène

RVG: Remodelage ventriculaire gauche

SDH: Succinate déshydrogénase

SDS: Sodium dodécyl sulfate

SELDI: *Surface enhanced laser desorption/ionization*

sem: Déviation standard

Ser: Sérine

SHP: *SH₂-domain-containing protein tyrosine phosphatase*

SOD: Superoxyde dismutase

T: Témoin

TGF: *Transforming growth factor*

Thr: Thréonine

TIMP: *Tissue inhibitor of metalloproteinase*

TOF: *Time of flight*

TNF: *Tumor necrosis factor*

TnC: Troponine C

TnI: Troponine I

TnT: Troponine T

Tyr: Tyrosine

UDP: Uridine di-phosphate

UV: Ultraviolet

VD: Ventricule droit

VEGFR: *Vascular endothelial growth factor receptor*

VES: Volume d'éjection systolique

VG: Ventricule gauche

Introduction

D) Aspects cliniques et moléculaires des pathologies cardiovasculaires étudiées

1 Anatomie du cœur sain

Le cœur est un organe musculaire creux qui assure la circulation sanguine de l'organisme en éjectant le sang vers les vaisseaux sanguins. Cette fonction de pompe cardiaque permet de maintenir en adéquation l'apport et les besoins en oxygène de l'organisme. La fonction cardiaque est assurée par l'intermédiaire de contractions rythmiques régulées par le système nerveux autonome.

Sur un plan anatomique, le cœur est divisé en quatre cavités appelées respectivement oreillettes et ventricules droits et gauches, possédant chacune leur fonction propre (Figure 1).

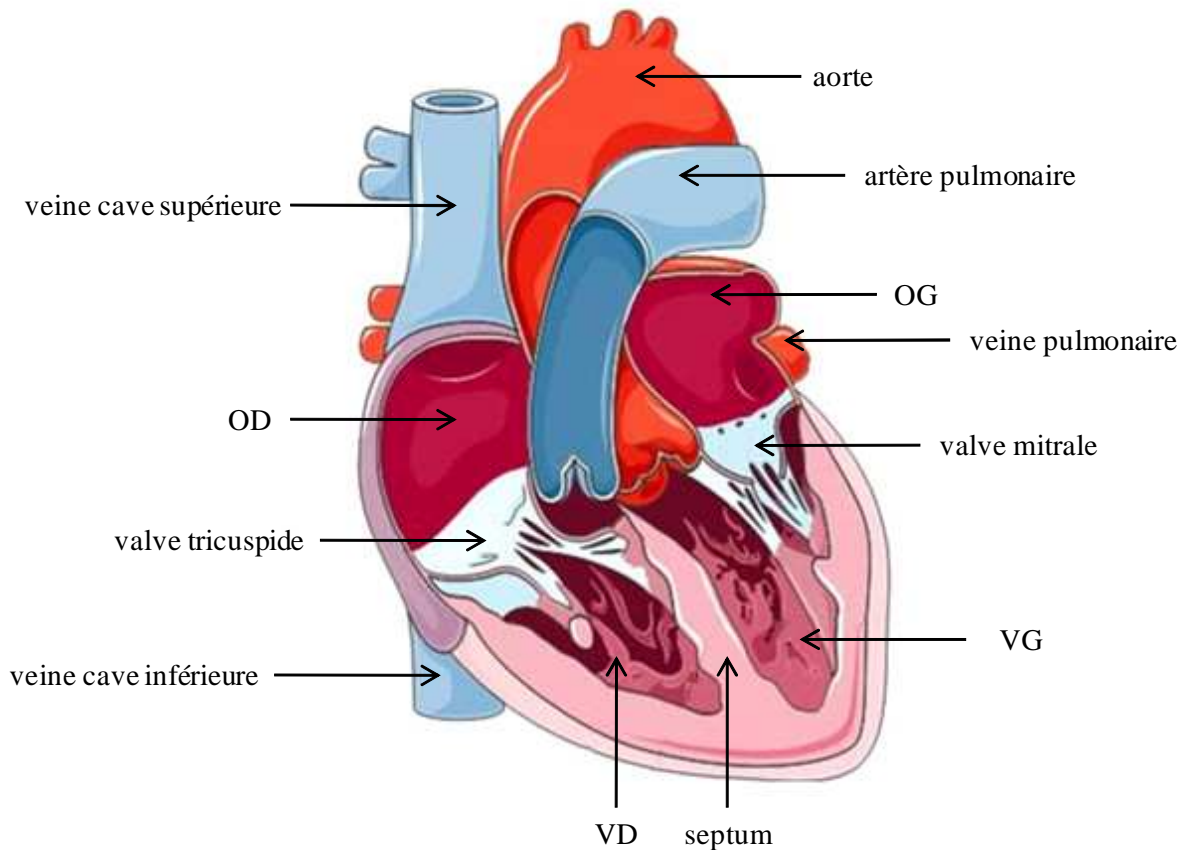


Figure 1 : Représentation schématique de l'anatomie du cœur. OG : oreillette gauche, VG : ventricule gauche, OD : oreillette droite, VD : ventricule droit.

Le sang, appauvri en oxygène par son passage à travers les différents tissus de l'organisme, est récolté dans l'oreillette droite (OD) par l'intermédiaire des veines caves supérieure et inférieure. L'OD oriente alors le sang vers le ventricule droit (VD), qui permet à celui-ci d'atteindre les poumons à travers les artères pulmonaires. Le sang, oxygéné par son passage dans les poumons, rejoint l'oreillette gauche (OG) par les veines pulmonaires puis est conduit vers le ventricule gauche (VG), qui éjecte alors le sang oxygéné dans tout l'organisme.

en passant par l'aorte. Les différentes phases de la contraction cardiaque sont nommées systoles auriculaire et ventriculaire, correspondant respectivement à la contraction des oreillettes et des ventricules. Chaque phase de contraction est suivie d'une phase de relaxation cardiaque appelée diastole.

Afin de séparer le sang oxygéné du sang non oxygéné, les parties droite et gauche du cœur sont délimitées par un septum inter-auriculaire, au niveau des oreillettes, et inter-ventriculaire, au niveau des ventricules. Les oreillettes sont également séparées des ventricules par la valve mitrale à gauche et tricuspide à droite, permettant de maintenir un flux sanguin unidirectionnel à travers le cœur (Figure 1).

Au niveau tissulaire, le muscle cardiaque se compose de trois tuniques possédant chacune une fonction propre et dont l'agencement est schématisé en Figure 2.

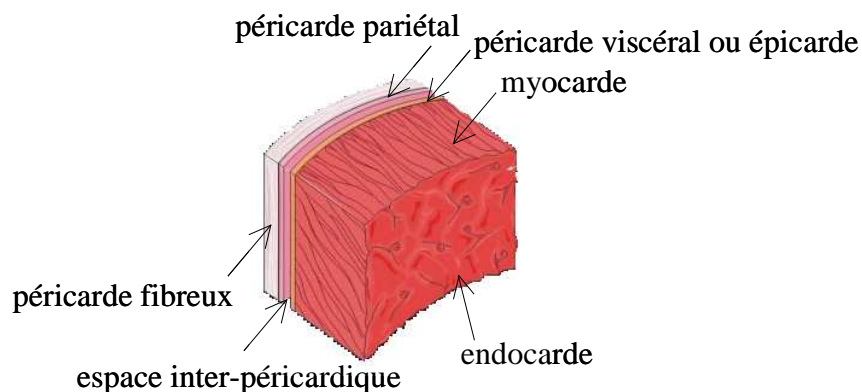


Figure 2 : Représentation schématique des trois tuniques cardiaques.

L'*endocarde* est composé essentiellement de cellules endothéliales qui tapissent la paroi interne du cœur et des vaisseaux, appelée intima à ce niveau, et participent à la régulation de la contraction cardiaque par une activation hormonale endocrine des cellules contractiles du myocarde appelées cardiomyocytes [Brutsaert 2003]. Cette membrane interne se trouve directement au contact de l'intima de l'aorte et des veines caves supérieure et inférieure.

Le *myocarde* est la partie musculaire du cœur. Il s'agit d'un muscle strié particulier puisqu'il est capable d'une contraction régulière et autonome, sensible aux stimulations hormonales et neuronales [Brutsaert 2003]. Ce muscle est composé de 30 à 40% de cardiomyocytes mais ceux-ci représentent 75% du volume du myocarde. Par ailleurs, le myocarde est également composé de cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses et de fibroblastes [Brutsaert 2003].

Le *péricarde* est un tissu fibreux constitué de deux couches : une couche fibreuse externe qui relie le cœur aux organes avoisinants tels que les poumons et une couche séreuse interne qui maintient la structure du cœur et des vaisseaux situés à proximité tels que l'aorte et

les veines caves. Le péricarde interne comprend lui-même deux feuillets : le *péricarde viscéral*, plus couramment appelé *épicarde* qui adhère directement au myocarde et le *péricarde pariétal*. Ces feuillets sont séparés par l'*espace inter-péricardique*. Il s'agit d'une cavité virtuelle contenant physiologiquement 50 à 75 millilitres de liquide péricardique lui permettant d'assurer une meilleure fluidité des mouvements cardiaques.

2 Infarctus du myocarde

2.1 Définition

Sur le plan physiopathologique, l'infarctus du myocarde (IDM) se définit comme une nécrose d'une partie plus ou moins importante du myocarde induite par une ischémie prolongée, c'est-à-dire une diminution de l'apport sanguin en oxygène par les artères coronaires qui irriguent le cœur [Thygesen *et al.* 2007].

Dans la majorité des cas, l'IDM est une complication aiguë de l'athérosclérose coronaire. L'athérosclérose désigne l'ensemble des remaniements de la paroi des artères de gros calibre, telles que l'aorte, et de moyen calibre, telles que les artères des membres, les artères carotides ou les artères coronaires. La plaque d'athérome constitue l'élément caractéristique de l'athérosclérose et sa rupture est à l'origine de l'IDM. Cette plaque athéromateuse correspond à une accumulation focale de lipides, de glucides, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires. Sur le plan physiopathologique, l'étape initiale du développement de l'athérosclérose est la pénétration et l'accumulation de lipides particuliers, appelés LDL, dans l'intima des artères. Après leur pénétration, les LDL vont s'oxyder et ne pourront plus être dégradés. Les macrophages vont alors accumuler ces LDL oxydés, se transformer en cellules spumeuses et induire une réaction inflammatoire chronique. Enfin, les cellules musculaires lisses vont migrer dans l'intima des artères et constituer la chape fibreuse dont l'épaisseur est déterminante dans le phénomène de rupture de la plaque d'athérome à l'origine de l'IDM.

La rupture de la plaque d'athérome met en contact le sang circulant avec le sous-endothélium. En effet, l'intima des artères est composée d'un endothélium et d'un sous-endothélium. Ce dernier est pro-thrombogène et principalement composé de macromolécules synthétisées par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses de l'endothélium vasculaire. Ces macromolécules, connues pour favoriser la coagulation sanguine, sont principalement du collagène, des microfibrilles, de la fibronectine, de la thrombospondine, du facteur de Von Willebrand et des glycosaminoglycanes.

La mise en contact du sang circulant avec ce sous-endothélium pro-thrombogène aboutit à la constitution d'un thrombus occlusif, accompagné d'une réponse inflammatoire, provoquant l'ischémie myocardique et la nécrose des cardiomyocytes. Les différentes étapes du mécanisme physiopathologique de l'IDM sont présentées en Figure 3.

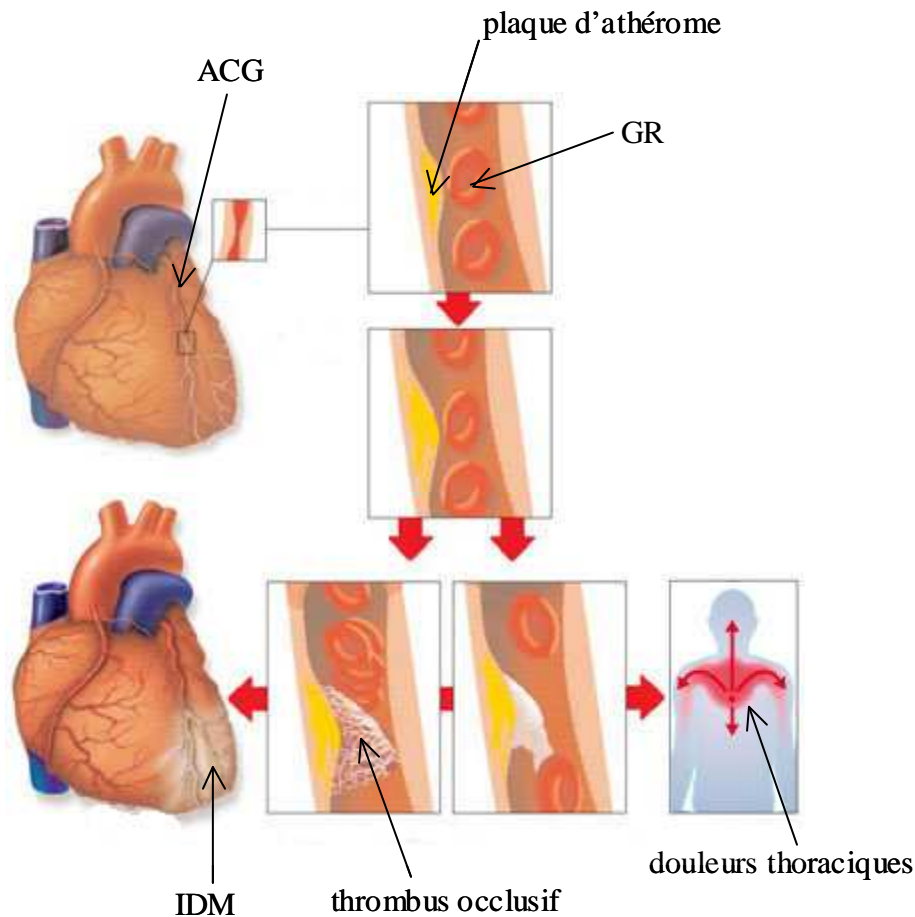


Figure 3 : Représentation schématique du mécanisme physiopathologique de l'IDM. ACG : artère coronaire gauche, GR : globules rouges.

Selon les nouveaux critères de la Société Européenne de Cardiologie et du Collège Américain de Cardiologie, le diagnostic définitif d'IDM est posé lorsque le patient présente au moins 2 des 3 critères suivants :

- des **symptômes d'ischémie** tels que des douleurs thoraciques angineuses rétrosternales en barres oppressantes irradiant dans le bras gauche et la mâchoire accompagnées de sueurs [Achar *et al.* 2005] (Figure 3). Ces symptômes typiques doivent être observés au repos, de manière prolongée et être résistants à la trinitrine qui est un puissant vasodilatateur.

- des **troubles de l'électrocardiogramme** (ECG) qui permet de mettre en évidence des troubles de la repolarisation, de type sus-décalage du segment ST, systématisé à un territoire artériel.

- une **augmentation du niveau plasmatique des biomarqueurs** de l'IDM, de préférence les troponines T (TnT) ou I (TnI) qui présentent à la fois une meilleure spécificité et une meilleure sensibilité que les autres biomarqueurs connus de l'IDM tels que la fraction myocardique de la créatine kinase (CK-MB) [Arruda-Olson *et al.* 2008].

Pour finir, les IDM peuvent être classés en fonction de leur taille [Thygesen *et al.* 2007]

- **microscopique**, lorsque la nécrose est focalisée en un point.
- **petit**, lorsque la nécrose concerne moins de 10% du myocarde.
- **modéré**, lorsque la nécrose concerne 10 à 30% du myocarde.
- **important**, lorsque la nécrose concerne plus de 30% du myocarde.

Par ailleurs, les conséquences d'un IDM seront variables tant sur le plan hémodynamique que sur le plan anatomique en fonction de sa taille et de sa localisation. En effet, plus les IDM sont importants, plus les conséquences seront délétères pour le patient. Ainsi, les IDM classés importants peuvent induire un phénomène adaptatif appelé remodelage ventriculaire gauche, conduisant progressivement à l'insuffisance cardiaque. Cependant, le cœur n'est pas le seul organe atteint lors d'un IDM important, puisque la diminution du débit cardiaque induit par cette pathologie peut avoir des conséquences néfastes sur les poumons en entraînant une congestion pulmonaire, sur les reins en induisant une insuffisance rénale ou sur le pancréas en inhibant la sécrétion d'insuline.

2.2 Épidémiologie

Actuellement, les pathologies cardiovasculaires et principalement l'IDM restent une des principales causes de morbi-mortalité dans le monde, principalement dans les pays industrialisés [Thygesen *et al.* 2007] (Figure 4).

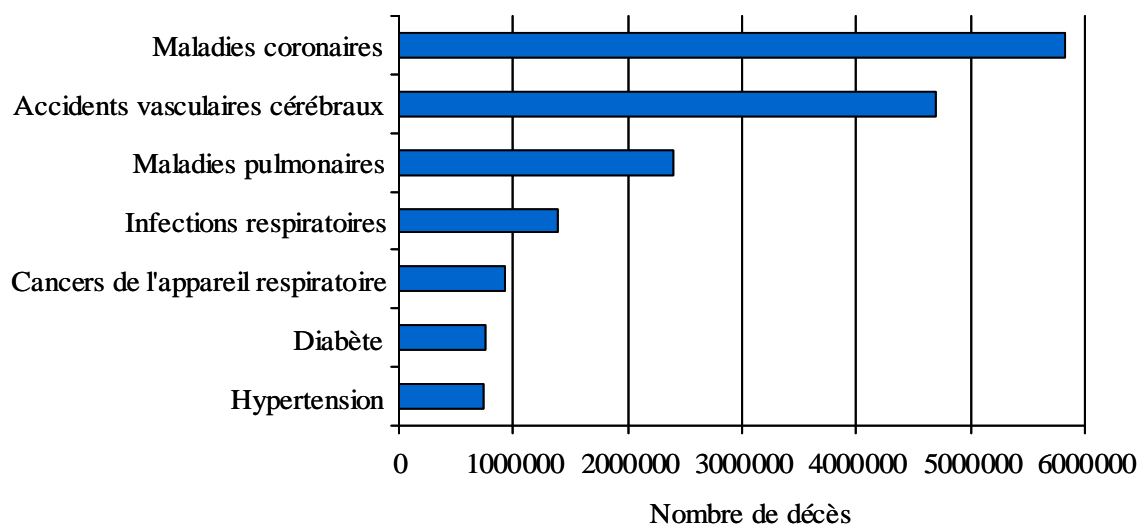


Figure 4 : Répartition des principales causes de décès dans la population mondiale âgée de plus de 60 ans en 2002.

Le dernier rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé datant de septembre 2009 estime à 17,1 millions le nombre de décès attribuables aux pathologies cardiovasculaires dont 7.2 millions concernaient une cardiopathie ischémique, soit 29% de l'ensemble des décès dans le monde en 2004. Il faut préciser que les pathologies cardiovasculaires sont la première cause de décès chez les femmes mais la seconde chez les hommes après les cancers. Cependant, la mortalité cardiovasculaire a diminué d'environ 10% en 4 ans dans la population générale [Cambou 2008], confirmant les données obtenues par le registre MONICA (Multinational mOnitoring of treNds and determInants of Cardiovascular diseases). Il s'agit d'une grande étude internationale débutée au début des années 1980 pour un suivi des pathologies cardiovasculaires dans 37 populations réparties dans 21 pays et qui a mis en évidence une diminution de la mortalité par IDM supérieure à 20% sur un suivi de 10 ans, avec une baisse annuelle globale de 2 à 3% [Tunstall-Pedoe *et al.* 1999], (Figure 5).

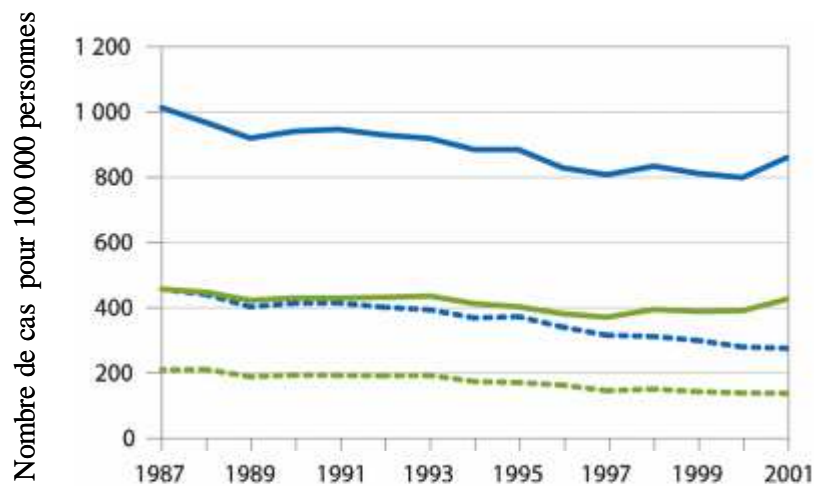


Figure 5 : Incidence et mortalité mondiale de l'IDM entre 1987 et 2001. En bleu, incidence (trait continu) et mortalité (trait discontinu) par IDM chez les hommes, en vert, incidence (trait continu) et mortalité (trait discontinu) par IDM chez les femmes.

Cette diminution de la mortalité est principalement attribuable à une meilleure prise en charge des patients qui permet d'améliorer le pronostic des patients, ainsi qu'à une meilleure prévention des facteurs de risque cardiovasculaire. D'autre part, si une diminution de la mortalité cardiovasculaire est observée dans les pays développés, cette dernière, tout en restant inférieure, tend à augmenter dans les pays en développement, établissant à la fois un gradient Nord-Sud et Est-Ouest de la mortalité cardiovasculaire [Yusuf *et al.* 2004] (Figure 6).

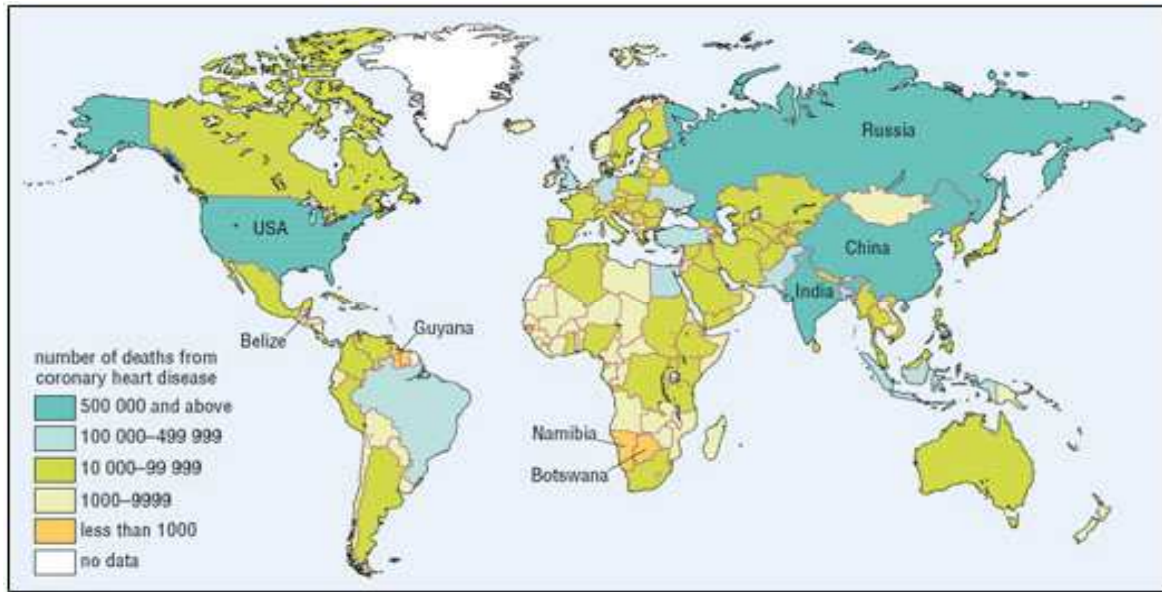


Figure 6 : Répartition géographique de la mortalité par IDM en 2002.

En effet, les pays du Nord ont un risque accru de maladies cardiovasculaires par rapport aux pays du Sud. De plus, la mortalité cardiovasculaire diminue considérablement dans les pays de l’Ouest, comme les Etats-Unis ou le Canada, mais cette diminution est plus progressive en Europe. Une augmentation de la mortalité est même observée dans certains pays de l’Est tels que la Pologne ou la Roumanie.

2.3 Facteurs de risque

L’IDM, comme la majorité des pathologies cardiovasculaires, est une pathologie dite multifactorielle pour laquelle il existe de nombreux facteurs de risque tant génétiques qu’environnementaux agissant le plus souvent en synergie. Ces facteurs de risque sont communs aux principales pathologies cardiovasculaires liées à l’athérosclérose, dont l’IDM ou les accidents vasculaires cérébraux, et sont regroupés sous le terme de facteurs de risque cardiovasculaire.

À ce jour, plus de 300 facteurs de risque cardiovasculaire sont évoqués avec un impact plus ou moins conséquent sur la physiopathologie [Poulter 2003]. De façon générale, il faut distinguer les facteurs de risque irréversibles, principalement génétiques, des facteurs de risque réversibles. Ces derniers représentent 80% du risque de développer une pathologie cardiovasculaire, c’est pourquoi il existe des campagnes de prévention visant à réduire leur impact sur la pathologie [Poulter 2003].

2.3.1 Facteurs de risque irréversibles

L'un des principaux facteurs de risque irréversibles de l'IDM est l'*âge*. En effet, la dégénérescence de la paroi artérielle avec l'âge a un impact direct sur la survenue d'IDM, avec une augmentation du risque à partir de 50 ans et un risque maximum à 65 ans [Cambou 2008] (Figure 7).

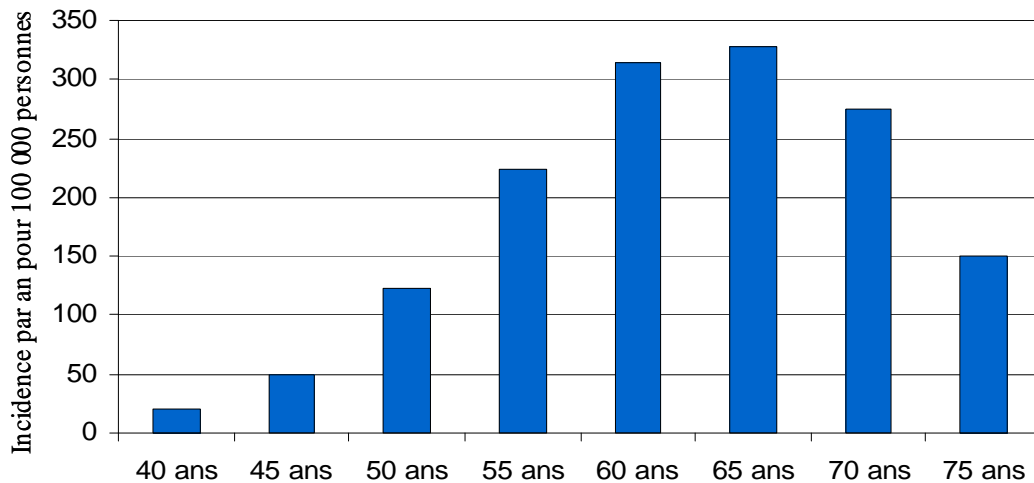


Figure 7 : Incidence de l'IDM en fonction de l'âge en 2002. Les données sont exprimées en nombre de cas pour 100 000 personnes.

L'incidence de l'IDM varie également en fonction du *sexe* avec une augmentation du risque dans la population masculine ou en cas de ménopause précoce chez la femme [Cambou 2008]. Cette différence est particulièrement marquée jusqu'à 65 ans (Figure 8).

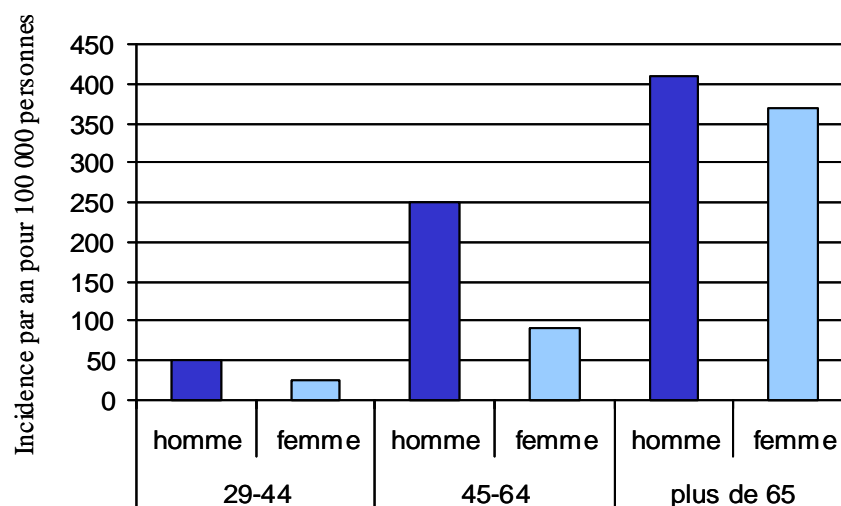


Figure 8 : Incidence de l'IDM en fonction du sexe en 2002. Les données sont exprimées en nombre de cas pour 100 000 personnes.

Il est également connu que les *antécédents familiaux* d'IDM augmentent le risque dans la descendance, ce qui peut être en partie imputable aux nombreux *facteurs génétiques* de l'IDM qui ont cependant un impact relativement restreint [Poulter 2003]. En effet, l'ensemble des facteurs irréversibles représente 20% du risque de développer une pathologie cardiovasculaire [Poulter 2003]. Dans le but d'illustrer cette hétérogénéité, une liste non exhaustive de ces facteurs et de leur impact est présentée en Table I.

Table I : Facteurs génétiques impliqués dans l'IDM.

Nom	Gène	Fonction	Référence	Impact	Odds ratio	p	n
P-sélectine	<i>SELP</i>	Inflammation	Herrmann <i>et al</i> , 1998		0,63	< 0,005	121 témoins, 150 cas
Thrombospondine-2	<i>THBS2</i>	Liaison au fibrinogène, interactions cellulaires	Boekholdt <i>et al</i> , 2002		0,38	< 0,0001	386 témoins, 351 cas
Facteur XIII	<i>F13A1</i>	Coagulation	Reiner <i>et al</i> , 2003		0,44	0,012	1071 témoins, 503 cas
Cyclo-oxygénase 2	<i>COX2</i>	Inflammation	Cipollone <i>et al</i> , 2004	Diminution risque IDM	0,7	0,03	721 témoins, 234 cas
Uncoupling protein 2	<i>UCP2</i>	Production d'ATP par la chaîne respiratoire mitochondriale	Cheurfa <i>et al</i> , 2008		0,48	< 0,001	1728 témoins, 864 cas
IL-18	<i>IL18</i>	Inflammation	Bis <i>et al</i> , 2008		0,88	0,006	2658 témoins, 464 cas
Récepteur LDL	<i>LDLR</i>	Endocytose des LDL	Anand <i>et al</i> , 2009		0,47	0,02	161 témoins, 174 cas
Apolipoprotéine E allèle ε 2	<i>APOEε2</i>	Internalisation des LDL	Anand <i>et al</i> , 2009		0,74	0,022	2688 témoins, 856 cas
Prothrombine	<i>F2</i>	Convertit le fibrinogène en fibrine	Rosendaal <i>et al</i> , 1997		0,86	0,002	4017 témoins, 4017 cas
ACE 1	<i>ACE1/D</i>	Vasoconstriction	Psaty <i>et al</i> , 2001		0,8	< 0,0001	51484 témoins, 25348 cas
NO synthase	<i>NOS</i>	Production de NO	Gardemann <i>et al</i> , 1998		4	0,038	381 témoins, 19 cas
Apolipoprotéine E allèle ε 4	<i>APOEε4</i>	Internalisation des LDL	Hingorani <i>et al</i> , 1999		7,02	0,008	387 témoins, 108 cas
Apolipoprotéine B	<i>APOB</i>	Internalisation des LDL	Anand <i>et al</i> , 2009		10,5	< 0,02	1201 témoins, 1066 cas
PPAR alpha	<i>PPARA</i>	Facteur de transcription, métabolisme lipidique	Lambert <i>et al</i> , 2000		2,5	< 0,02	183 témoins, 249 cas
IGF-1	<i>IGF1</i>	Facteur de croissance	Yazdanpanah <i>et al</i> , 2006	Augmentation risque IDM	1,07	0,03	51484 témoins, 25348 cas
Fibrinogène	<i>FGG</i>	Aggrégation plaquettaire	Chiodini <i>et al</i> , 2003		1,35	< 0,008	727 témoins, 587 cas
Arginase 1	<i>ARG1</i>	Cycle de l'urée	Doney <i>et al</i> , 2005		2,77	0,006	1698 témoins, 108 cas
Récepteur œstrogène 2	<i>ESR2</i>	Facteur de transcription, prolifération et différenciation cellulaire	Dumont <i>et al</i> , 2007		2,7	0,02	438 témoins, 38 cas
Récepteurs glucocorticoïdes	<i>GR</i>	Facteur de transcription, inflammation, prolifération et différenciation cellulaire	Mannila <i>et al</i> , 2007		3,33	< 0,001	387 témoins, 387 cas
Apolipoprotéine E récepteur 2	<i>APOER2</i>	Internalisation des LDL	Domingues-Montanari <i>et al</i> , 2008		2,2	0,005	585 témoins, 350 cas
			Van den Akker <i>et al</i> , 2008		1,65	0,003	2379 témoins, 710 cas
			Martinelli <i>et al</i> , 2009		2,1	0,03	4658 témoins, 220 cas
					3,88	0,007	287 témoins, 394 cas

2.3.2 Facteurs de risque réversibles

Les principaux facteurs de risque réversibles ont été mis en évidence par l'étude de Framingham. Cette enquête porte sur une cohorte de 5200 habitants suivis depuis 1949 et a notamment permis de mettre en évidence le lien entre la morbi-mortalité cardiovasculaire et le tabagisme, la dyslipidémie et l'hypertension artérielle.

Parmi les facteurs de risque réversibles, le **tabagisme** est le plus fortement corrélé avec le risque d'IDM [Yusuf *et al.* 2004]. Cette corrélation est d'autant plus importante que le sujet est jeune puisque 58% des IDM chez les hommes de moins de 40 ans sont imputables au tabagisme [Cambou 2008]. Le tabagisme passif augmente également le risque cardiovasculaire [Giannuzzi *et al.* 2005]. Sur le plan physiopathologique, la consommation de cigarettes va entraîner une augmentation du taux de LDL, ce qui induit une réponse inflammatoire qui augmente le risque de rupture de la plaque d'athérome, qui peut conduire à la thrombose [Ambrose *et al.* 2004]. Par ailleurs, le tabagisme induit une dysfonction endothéliale qui a pour conséquence une diminution du flux sanguin en augmentant la résistance des artères à ce flux mais également en diminuant la vasodilatation induite par le NO [Ambrose *et al.* 2004]. L'accumulation de ces différents facteurs va augmenter le risque d'IDM (Figure 9).

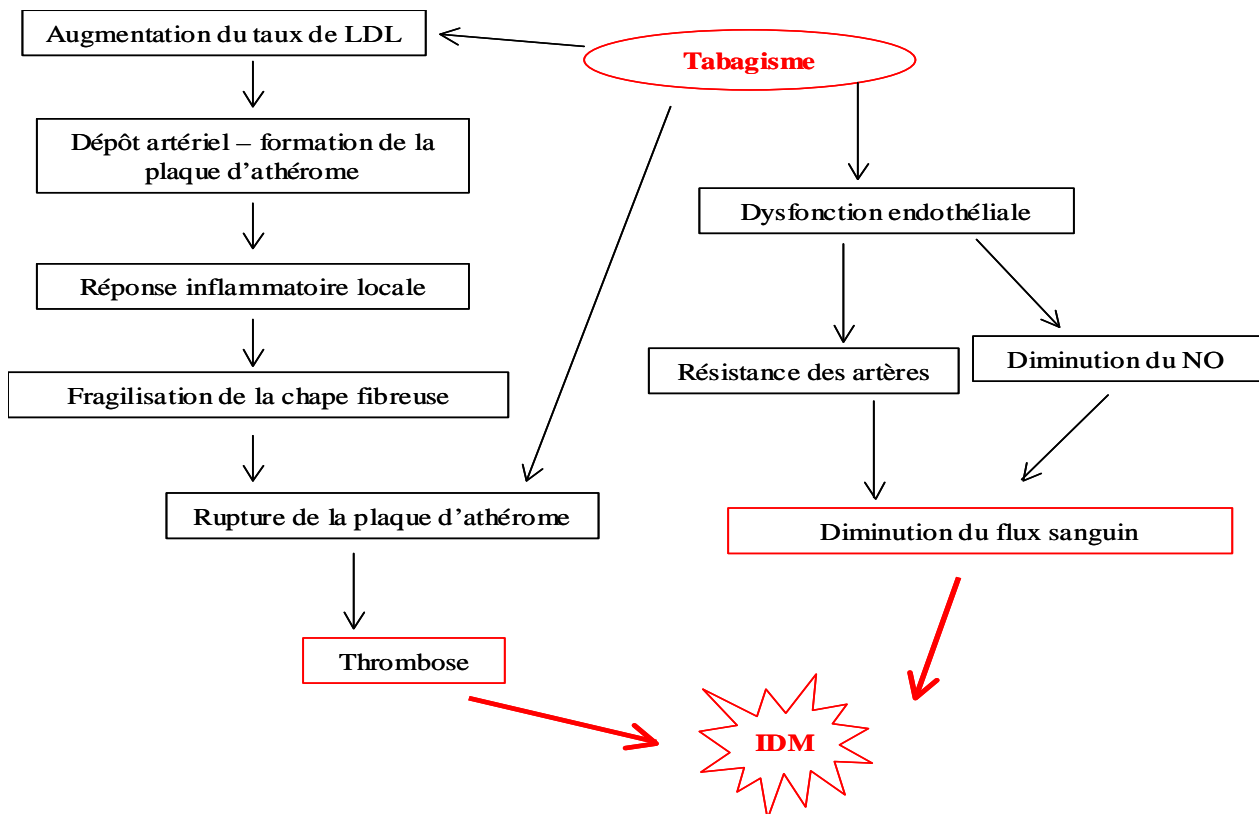


Figure 9 : Mécanisme d'action du tabagisme sur le risque d'IDM.

La **dyslipidémie**, qui se définit par une augmentation du taux de LDL-cholestérol (supérieure à 4,13 mmol/L pour les hommes et 3,87 mmol/L pour les femmes) ou une diminution du taux de HDL-cholestérol (inférieure à 0,45 g/L chez les hommes et à 0,55 g/L chez les femmes), est également un facteur de risque important de l'IDM [Schlitt *et al.* 2005]. En effet, une étude portant sur une population japonaise à forte consommation de tabac mais à faible taux d'IDM a mis en évidence un effet protecteur d'un faible taux en LDL-cholestérol dans cette population comparée aux populations de fumeurs classiques qui présentent un taux élevé de LDL-cholestérol [Poulter 2003]. L'effet néfaste d'un taux élevé de LDL-cholestérol peut s'expliquer par l'augmentation du risque de formation d'une plaque d'athérome, à l'inverse d'un taux élevé de HDL-cholestérol [Schlitt *et al.* 2005].

L'**hypertension artérielle** (HTA) se définit par une pression artérielle systolique supérieure à 140 mmHg ou une pression artérielle diastolique supérieure à 90 mmHg. Les patients présentant une HTA ont un risque 4 fois supérieur à la normale de développer un IDM [Franjic *et al.* 2009]. Sur le plan physiopathologique, l'HTA cause un remodelage vasculaire conduisant à une perte des capacités vasodilatatrices des vaisseaux et à une dysfonction endothéliale [Franjic *et al.* 2009]. Elle est également fortement corrélée au diabète de type 2 [Franjic *et al.* 2009] ainsi qu'à une augmentation de la fréquence cardiaque associée à une augmentation de la mortalité cardiovasculaire [Perret-Guillaume *et al.* 2009].

Le **diabète de type 2**, qui se définit par une hyperglycémie chronique, c'est-à-dire une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L, est également un facteur de risque indépendant de l'IDM [Franjic *et al.* 2009]. En effet, une augmentation de la mortalité cardiovasculaire a été mise en évidence chez les patients diabétiques [Bianchi *et al.* 2008]. Sur le plan physiopathologique, les patients diabétiques présentent des altérations de la microcirculation conduisant là-encore à une dysfonction endothéliale [Franjic *et al.* 2009].

L'**obésité abdominale**, définie par un indice de masse corporelle supérieur à 30 ou un tour de taille supérieur à 102 centimètres chez les hommes et 88 centimètres chez la femme, doublerait le risque de développer un IDM par rapport à la population générale [Yusuf *et al.* 2004]. Une corrélation entre l'obésité abdominale et la mortalité cardiovasculaire a également été mise en évidence [Schneider *et al.* 2010]. D'autre part, le manque d'activité sportive directement lié à l'obésité abdominale favorise également le risque d'IDM [Chow *et al.* 2009].

Outre ces facteurs de risque cardiovasculaire majeurs, de nombreuses études mettent en évidence des facteurs de risque secondaires. Les effets néfastes de la **pollution atmosphérique** sur la mortalité cardiovasculaire ont notamment été rapportés [Cambou 2008]. Par ailleurs de

nombreuses études se sont intéressées au lien entre la **consommation modérée ou excessive d'alcool** et le risque cardiovasculaire. Ces études ont mis en évidence qu'une consommation modérée d'alcool (un verre par jour pour les femmes et deux verres par jour pour les hommes) avait un effet protecteur contrairement à une consommation excessive d'alcool qui accroît le risque d'IDM [Djousse *et al.* 2008]. La **dépression sévère** et le **stress** peuvent également intervenir sur le risque d'IDM par une augmentation de l'inflammation pouvant conduire à la rupture de la plaque d'athérome [Kendler *et al.* 2009]. Enfin, la **consommation de fruits et légumes** aurait quant à elle un effet bénéfique sur le risque cardiovasculaire par une action antioxydante sur les LDL oxydés à l'origine de l'IDM [Chow *et al.* 2009].

En conclusion, il existe de nombreux facteurs de risque environnementaux qui représentent environ 80% du risque de développer une pathologie cardiovasculaire [Poulter 2003]. Afin de limiter l'impact de ces facteurs sur la pathologie, de nombreuses campagnes de prévention ont été mises en place [Poulter 2003]. Malgré tout, si une meilleure prise en charge des principaux facteurs de risque cardiovasculaire tels que l'HTA, le tabagisme ou l'hypercholestérolémie a été observée dans de nombreux pays ces dernières années, la prévalence de l'obésité abdominale et du diabète de type 2 ne cesse quant à elle d'augmenter [Cambou 2008].

2.4 Biomarqueurs et dépistage

Le diagnostic d'IDM se base dans un premier temps sur les **douleurs thoraciques** angineuses de repos, de durée prolongée et résistantes à la trinitrine [Achar *et al.* 2005].

L'**ECG** joue alors un rôle essentiel dans le diagnostic de l'IDM puisqu'il s'agit de l'examen réalisé dès l'apparition de ces symptômes [Thygesen *et al.* 2007]. Celui-ci permet de poser un diagnostic préliminaire et ainsi de débiter de façon précoce la prise en charge thérapeutique du patient [Reichlin *et al.* 2009]. En effet, cet examen permet de mettre en évidence un trouble de la repolarisation de type sus-décalage du segment ST, systématisé à un territoire artériel en mesurant une différence de potentiel extra-cellulaire entre les différentes régions du myocarde (Figure 10).

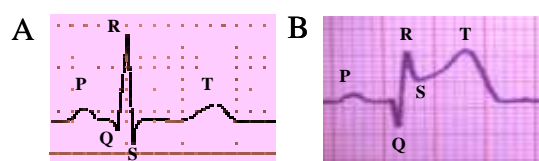


Figure 10 : Troubles de l'ECG observés lors d'un IDM. A : ECG normal, B : ECG présentant un sus-décalage du segment ST.

L'ECG présente donc l'avantage de pouvoir détecter de façon précoce l'IDM mais également de mettre en évidence, par l'analyse des dix-huit dérivations, l'artère impliquée dans l'IDM et permet ainsi de prendre en charge de manière rapide et efficace le patient (Table II).

Table II : Relation entre ECG et localisation de l'IDM.

Topographie de l'IDM	Dérivation de l'ECG	Artère occluse
Antérieure	V1 à V6	Interventriculaire antérieure
Inférieure	D2 - D3 - AVF	Coronaire droite
Postérieure	V7 à V9	Circonflexe

Cependant, l'ECG reste insuffisant dans le cadre d'une utilisation seule puisque de nombreuses pathologies cardiovasculaires, telles que les péricardites ou les myocardites, peuvent induire des troubles de repolarisation type sus-décalage du segment ST [Reichlin *et al.* 2009]. Afin d'établir un diagnostic final, l'utilisation de techniques modernes d'imagerie ainsi que des biomarqueurs disponibles est indispensable [Thygesen *et al.* 2007].

De nombreuses techniques d'imagerie non invasives existent afin d'étudier la fonction cardiaque et de confirmer le diagnostic d'IDM. Dans le cadre de l'urgence, l'**échocardiographie** Doppler se révèle être la méthode de choix pour mettre en évidence une nécrose plus ou moins importante du myocarde [Thygesen *et al.* 2007]. En effet, il s'agit d'une technique simple et rapidement disponible au lit du patient. De plus, l'échocardiographie permet d'évaluer la fraction d'éjection du VG ainsi que la cinétique cardiaque permettant de visualiser la taille de la zone nécrosée [Rasoul *et al.* 2010]. Cependant, certains patients s'avérant peu échogènes et la détection de l'IDM n'étant pas toujours optimale, l'utilisation des biomarqueurs plasmatiques est nécessaire pour aider au diagnostic d'IDM [Thygesen *et al.* 2007].

Les principaux **biomarqueurs plasmatiques** de l'IDM sont générés lors de la nécrose des cardiomyocytes. C'est notamment le cas des troponines cardiaques, de la CK-MB et de la myoglobine [Thygesen *et al.* 2007].

Parmi ces biomarqueurs, le dosage plasmatique des troponines cardiaques est privilégié dans le diagnostic de l'IDM [Arruda-Olson *et al.* 2008]. En effet, elles ont récemment été décrites pour être plus sensibles et plus spécifiques que les autres biomarqueurs plasmatiques, en particulier avec l'arrivée des dosages ultrasensibles des troponines [Moe *et al.* 2010]. De plus, l'estimation de la taille de l'IDM peut être approchée par le dosage de ces dernières puisque la quantité de troponines libérée dans le plasma semble proportionnelle à la taille de la zone infarctée [Pruvot *et al.* 2006]. Il ne s'agit cependant pas d'un biomarqueur parfait

puisque le taux de troponine plasmatique n'est pas détectable de manière précoce [Moe *et al.* 2010]. De plus, l'élévation de ce taux reflète une souffrance myocardique non spécifique à l'ischémie. En effet, une augmentation du taux de troponine peut par exemple être retrouvée lors d'une myocardite.

Lorsque l'utilisation des troponines cardiaques n'est pas disponible, la CK-MB peut être utilisée [Arruda-Olson *et al.* 2008]. Cependant, comme les troponines, il ne s'agit pas d'un biomarqueur précoce [Moe *et al.* 2010] et en dépit d'une sensibilité satisfaisante, la CK-MB ne présente pas une bonne spécificité puisqu'elle peut être détectée lors de toute souffrance musculaire [Moe *et al.* 2010].

Enfin, le dosage des myoglobines a l'avantage d'être plus précoce mais souffre également d'un manque de spécificité myocardique puisque la myoglobine est également libérée dans le plasma lors de toute atteinte musculaire [Melanson *et al.* 2004] (Figure 11).

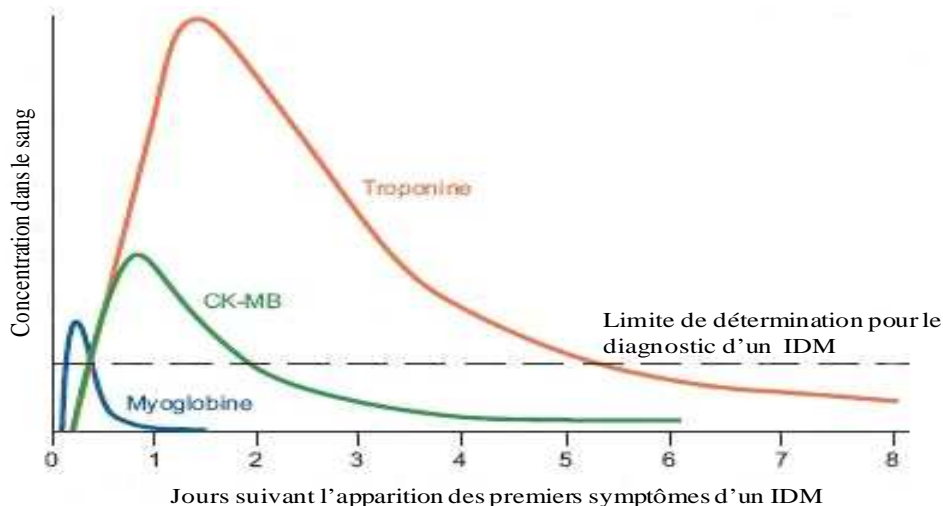


Figure 11 : Concentration et détection des principaux biomarqueurs de l'IDM. CK-MB : fraction myocardique de la créatine kinase.

De nombreuses études ont été menées afin de mettre en évidence des biomarqueurs précoces de l'IDM. Ainsi, des biomarqueurs libérés lors de l'ischémie myocardique, tels que la choline, les acides gras libres ou l'albumine modifiée ont été décrits [Thygesen *et al.* 2007]. Cependant, si ces facteurs s'avèrent être de bons biomarqueurs pronostiques, il n'existe actuellement pas de dosage applicable au quotidien pour ces protéines [Collinson 2009]. Certains facteurs libérés lors de la réponse inflammatoire mise en jeu en réponse à la nécrose myocardique tels que la protéine C-réactive (CRP) ou l'interleukine 18 (IL-18) ont également été décrits [Moe *et al.* 2010]. Cependant, ces biomarqueurs présentent une sensibilité et une spécificité toujours inférieures à celles des troponines, suggérant de prendre en compte plusieurs biomarqueurs pour un même diagnostic. Les différentes caractéristiques des principaux biomarqueurs de l'IDM sont présentées en Table III.

Table III : Caractéristiques des principaux biomarqueurs de l'IDM.

Nom	Sensibilité	Spécificité	Pathologie	Avantages	Inconvénients	Références
Nécrose myocardique						
<i>Troponine s cardiaque</i>	100%	99%	> 0,04 ng/mL	Spécifique du cœur Meilleur biomarqueur Analyse automatique ultrasensible Estimation de la taille de l'IDM	Durée de vie longue > 20h Détection lors de toute souffrance myocardique Variabilité importante entre les kits Analyse tardive (4h post-IDM)	Moe et al, 2010 Setiadi et al, 2009 Reichlin et al, 2009 Keller et al, 2009
<i>CK-MB</i>	85%	67%	> 5 µg/L	Estimation de la taille de l'IDM Prédiction d'un second IDM	Ubiquitaire Libérée lors de souffrance musculaire Analyse tardive (4h post-IDM)	Moe et al, 2010 Galan et al, 2002 Innes et al, 2002
<i>Myoglobine</i>	73%	75%	> 200 ng/mL	Analyse précoce (2h post-IDM)	Non spécifique du cœur Libérée lors de souffrance musculaire ou d'insuffisance rénale	Melanson et al, 2004 Innes et al, 2002
Ischémie						
<i>Choline</i>	86%	86%	> 18,5 µmol/L	Bon biomarqueur pronostique Analyse précoce (2h post-IDM)	Mauvais biomarqueur diagnostique Non utilisable en routine	Collinson et al, 2008 Danne et al, 2010
<i>Acides gras libres</i>	83%	93%	> 5 nmol/L	Analyse précoce Bon biomarqueur pronostique	Non utilisable en routine	Collinson et al, 2008 Azzazy et al, 2006
<i>Albumine modifiée</i>	71%	65%	> 91 U/mL	Distinction ischémie / non ischémie Analyse précoce (2h post-IDM)	Mécanisme inexpliqué Non utilisable si taux d'albumine trop faible Même résultat lors d'une acidose lactique Nécessité d'une analyse rapide	Collinson et al, 2009 Hjortshoj et al, 2010
Inflammation						
<i>CRP</i>	62,50%	66%	3,3 mg/L	Estimation de la taille de l'IDM	Association avec les facteurs de risque cardiovasculaires Mauvais biomarqueur pronostique	Balciunas et al, 2009 Delhayé et al, 2009
<i>IL-18</i>	72%	84%	450 pg/mL	Bon biomarqueur pronostique à moyen terme	Mauvais biomarqueur pronostique à long terme	Gao et al, 2010

Actuellement, même si les troponines cardiaques s'avèrent être le biomarqueur de choix, il n'existe pas de solution idéale. C'est pourquoi il est recommandé de prendre en compte au moins deux des trois critères que sont les douleurs thoraciques, les troubles de l'ECG et le dosage de biomarqueurs afin d'établir le diagnostic d'IDM et d'instaurer la meilleure thérapeutique pour le patient [Arruda-Olson *et al.* 2008].

2.5 Traitements

Les principaux traitements de l'IDM consistent à rétablir le flux sanguin, à réduire les complications et les récives et à prendre en charge les facteurs de risque cardiovasculaire.

Dans un premier temps, une **revascularisation** en urgence de l'artère en cause dans l'IDM est mise en place [Gajos 2008]. Cette revascularisation s'effectue :

- soit par *coronarographie* avec réouverture de l'artère occluse et mise en place d'un stent au niveau de la lésion initiale.

- soit par *fibrinolyse*, si la revascularisation endovasculaire ne peut être mise en œuvre dans les deux heures suivant le début de la douleur et en l'absence de contre-indication.

Cette revascularisation est accompagnée d'un **traitement médical d'urgence** à visée anti-thrombotique avec deux antiagrégants plaquettaires (acide acétylsalicylique et clopidogrel) associés à une anti-coagulation efficace [Gajos 2008].

Par la suite, un **traitement médical** visant à diminuer la morbi-mortalité cardiovasculaire en diminuant le risque de récive et en stabilisant la plaque d'athérome, est mis en place. Il s'agit, classiquement, de l'association de bêta-bloquants, d'acide acétylsalicylique associé au clopidogrel pendant une durée dépendante du type de stent implanté, de statine, d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et de la prise en charge des facteurs de risque par des mesures hygiéno-diététiques telles que la reprise d'une activité physique, l'arrêt de la consommation de tabac et un changement dans les habitudes alimentaires afin de favoriser une alimentation pauvre en lipides et en glucides [Gajos 2008]. En cas de dysfonction systolique ventriculaire gauche avec une fraction d'éjection du VG < 40%, un traitement par antagonistes de l'aldostérone est également mis en place dans les 15 jours suivant l'IDM. Les principaux traitement de l'IDM sont détaillés dans la Table IV.

Table IV : Principaux traitements de l'IDM.

<i>Classe thérapeutique</i>	Spécialités	Dose
<i>Antiagrégants plaquettaire</i>	Acide acétylsalicylique	75 mg / jour
	Clopidogrel	75 mg / jour
<i>Statine</i>	Simvastatine	20 mg / jour
<i>Béta-bloquants</i>	Bisoprolol	10 mg / jour
	Carvedilol	25-50 mg / jour
	Metoprolol succinate	200 mg / jour
	Nebivolol	10 mg / jour
<i>Inhibiteur de l'ACE</i>	Captopril	50-100 mg / jour
	Enalapril	10-20 mg / jour
	Lisinopril	20-35 mg / jour
	Ramipril	5 mg / jour
	Trandolapril	4 mg / jour
<i>Antagoniste du récepteur à l'angiotensine</i>	Candesartan	32 mg / jour
	Valsartan	160 mg-jour
<i>Antagoniste de l'aldostérone</i>	Eplérénone	50 mg / jour

3 Remodelage ventriculaire gauche

3.1 Définition

Le terme de remodelage désigne un mécanisme biologique à visée principalement adaptative qui peut conduire à terme à la dégradation de la fonction de l'organe ou du tissu impliqué [Gaertner *et al.* 2004]. Ce mécanisme existe dans des situations physiologiques, notamment chez les sportifs de haut niveau et dans ce cas, il est réversible et sans fibrose cicatricielle [Barry *et al.* 2008]. Ce processus peut être également pathologique lorsqu'il survient en réponse à une augmentation de la charge de travail du VG par surcharge volumique comme lors d'insuffisance aortique ou de fistule artério-veineuse, ou dans des situations de surcharge de pression telles que l'HTA ou la sténose aortique [Barry *et al.* 2008].

L'IDM est une situation complexe associant surcharge volumique et pressive. Dans ce cas, le remodelage ventriculaire gauche (RVG) se définit comme l'ensemble des modifications géométriques et structurales conduisant entre autres à l'hypertrophie du VG en réponse à l'amputation d'une partie des capacités contractiles induite par l'IDM [Willenheimer 2000]. Cette hypertrophie vise à normaliser les contraintes pariétales en

suivant la loi de Laplace (pression pariétale = $k \times \pi \times \text{diamètre} / \text{épaisseur}$) qui montre que le niveau des contraintes pariétales est proportionnel au diamètre du VG et inversement proportionnel à l'épaisseur de la paroi. L'hypertrophie du VG est souvent associée à une dilatation de celui-ci ce qui permet d'augmenter initialement le volume d'éjection systolique et d'assurer ainsi le maintien du débit cardiaque malgré la baisse de contractilité [Tiyyagura *et al.* 2006]. Sur le long terme, cette dilatation est délétère car elle est à l'origine d'une augmentation des contraintes pariétales créant un cercle vicieux à l'origine d'une dysfonction diastolique en induisant une IC pouvant conduire au décès du patient.

Dans le cadre de ma thèse, nous nous intéresserons principalement au RVG post-IDM qui débute très précocement suivant la phase aiguë de l'IDM [Tiyyagura *et al.* 2006]. Il s'agit d'un phénomène continu et évolutif que l'on peut diviser schématiquement en deux phases (Figure 12).

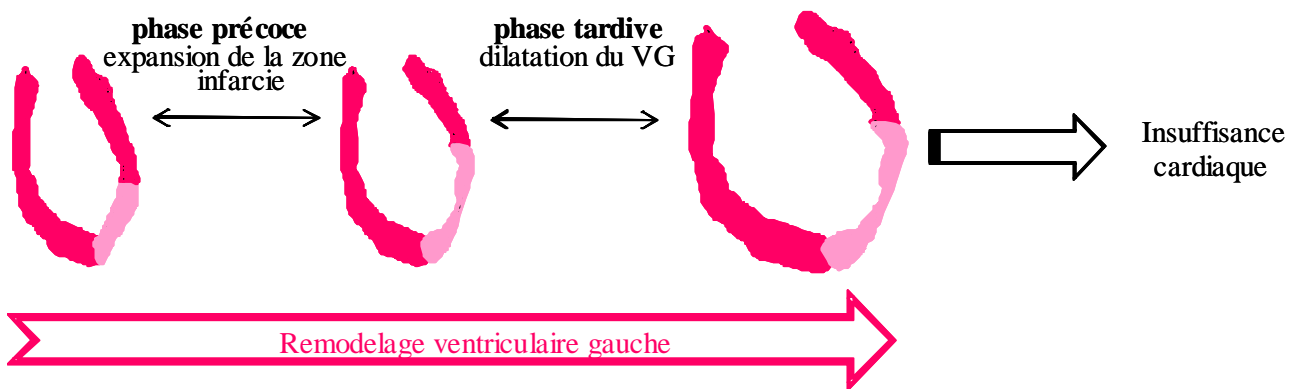


Figure 12 : Représentation schématique des différentes phases du RVG. La zone infarctée est représentée en rose clair.

La **phase précoce** du RVG consiste en une expansion et un amincissement de la zone infarctée [Tiyyagura *et al.* 2006] et conduit au remplacement du tissu contractile par un tissu fibreux cicatriciel [Gaertner *et al.* 2004]. En effet, une réponse inflammatoire impliquant l'infiltration de la zone infarctée par des leucocytes et des macrophages, se met en place rapidement suite à un IDM [Gaertner *et al.* 2004]. Cette réponse inflammatoire, visant à éliminer les cardiomyocytes nécrosés, entraîne la dégradation de la matrice extracellulaire par les macrophages [Sun 2009]. Les cardiomyocytes nécrosés seront par la suite phagocytés par des macrophages et remplacés par des myofibroblastes qui seront responsables d'une synthèse importante de collagène constituant la cicatrice fibreuse [Sutton *et al.* 2000] (Figure 13).

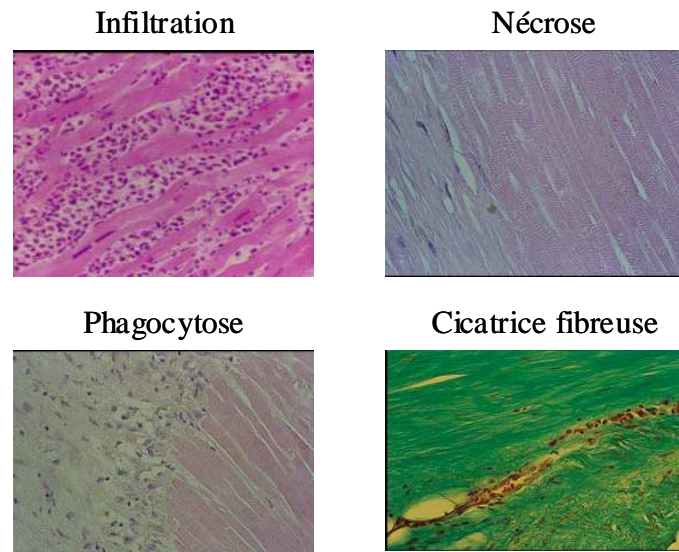


Figure 13 : Les différentes étapes de la phase précoce du RVG (issu de [Baroldi *et al.* 2005]). Infiltration : Infiltration des leucocytes de la zone périphérique vers la zone infarctie 6 à 8 heures après l'IDM. Nécrose : Nécrose des cardiomyocytes. Phagocytose : Digestion des cardiomyocytes nécrosés par les macrophages infiltrés. Cicatrice fibreuse : Remplacement des cardiomyocytes par des myofibroblastes et synthèse de collagène.

Les myofibroblastes sont issus de la différenciation cellulaire des fibroblastes qui sont le type cellulaire prédominant dans le cœur, des péricytes ou des monocytes, à proximité de la zone infarctie [Sun 2009]. Cette différenciation est induite par certains facteurs comme le TGF- β 1, qui est libéré par les macrophages lors de la réponse inflammatoire [Sun 2009]. Ces myofibroblastes ont une capacité contractile inférieure aux cardiomyocytes, ce qui rend la contraction du VG moins efficace [Gaertner *et al.* 2004].

La **phase tardive** du RVG apparaît dans l'année qui suit l'IDM. Suite à la perte de la capacité contractile entraînée par la cicatrice fibreuse, les cardiomyocytes de la zone non infarctie vont subir une augmentation de leur volume de 70% en moyenne. Cette hypertrophie du volume des cardiomyocytes associée à une prolifération cellulaire importante contribue à la dilatation et à la reformation du VG, conduisant à une altération de ses propriétés contractiles [Sutton *et al.* 2000] (Figure 14).

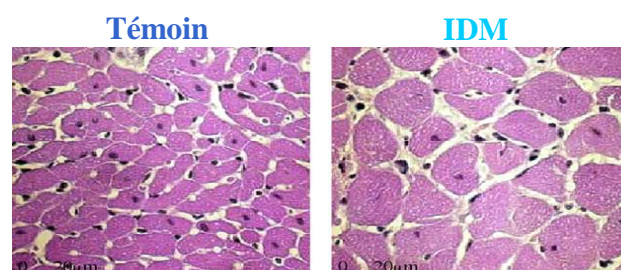


Figure 14 : Hypertrophie des cardiomyocytes dans la zone proche de l'IDM chez des rats témoins et à 2 mois post-IDM (issu de [Lal *et al.* 2005]). Dans cette étude, l'IDM est induit par ligature de l'artère coronaire gauche chez des rats.

3.2 Épidémiologie

Suite à un IDM, 30% des patients vont développer un RVG en dépit des meilleurs traitements connus actuellement [Savoie *et al.* 2006]. Ce RVG est un facteur important de mortalité post-IDM, puisque les patients qui développent un RVG ont un taux de survie plus faible que les patients ne développant pas de RVG après un IDM [Bolognese *et al.* 2002] (Figure 15).

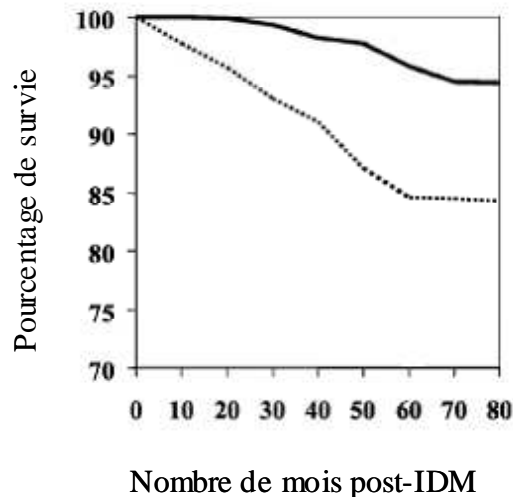


Figure 15 : Pourcentage de survie post-IDM chez des patients avec ou sans RVG (issu de [Bolognese *et al.* 2002]). Le trait plein représente les patients ne développant pas de RVG et le trait en pointillé représente les patients développant un RVG. Dans cette étude, le RVG est défini comme une augmentation supérieure ou égale à 20% du volume télédiastolique entre l'échocardiographie à l'inclusion et à 6 mois post-IDM.

La prévalence ainsi que l'intensité du RVG sont influencés par de nombreux facteurs (Table V) dont les principaux sont :

- **la taille et la localisation de l'IDM.** En effet, plus la taille de l'IDM est importante, plus le pourcentage de tissu remodelé sera élevé, ce qui est un facteur de mauvais pronostic [Zornoff *et al.* 2007].
- **l'épaisseur de la zone infarctée.** Les RVG les plus importants interviennent le plus souvent après un IDM transmural, c'est-à-dire un IDM atteignant les cellules de l'endocarde à l'épicarde [Tiyagura *et al.* 2006].
- **la composition en collagène de la cicatrice fibreuse.** En effet, le collagène dit de type III, principal constituant de la cicatrice fibreuse, est moins résistant aux déformations induites lors de la contraction cardiaque que le collagène de type I qui est prédominant dans le cœur [Zornoff *et al.* 2007].

Table V : Déterminants du RVG.

RVG sévère	RVG modéré
IDM de taille importante	IDM de petite taille
IDM transmural	IDM sous-endocardique
Antécédent d'IDM	IDM d'intensité faible
Diminution de la fraction d'éjection	Fraction d'éjection préservée
Pas de reperfusion	Reperfusion efficace
Réocclusion rapide	Maintien de la perméabilité
Microcirculation atteinte	Microcirculation normale
Pas de circulation collatérale	Circulation collatérale
Présence de facteurs de risque cardiovasculaire	Pas de facteurs de risque

Par ailleurs, les patients ayant des antécédents personnels d'IDM ont un risque accru de développer un RVG important [Zornoff *et al.* 2007]. L'efficacité de la reperfusion myocardique est également impliquée dans le développement d'un RVG, ainsi que l'atteinte de la microcirculation. Le développement d'une circulation collatérale pour suppléer la vascularisation du territoire de l'artère obstruée, a des conséquences bénéfiques sur le RVG. Enfin, la diminution de la fraction d'éjection ainsi que la présence de différents facteurs de risque cardiovasculaire sont des facteurs aggravant le RVG [Zornoff *et al.* 2007].

3.3 Dépistage

Les principales techniques d'imagerie utilisées pour la détection précoce du RVG sont l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et l'échocardiographie.

L'**IRM** est actuellement en pleine expansion car elle permet de déterminer précisément les volumes télédiastolique et télésystolique du VG qui sont un déterminant majeur du développement du RVG [Chan *et al.* 2008]. Cette technique apprécie également l'étendue et la localisation de l'IDM permettant de prédire un risque de RVG plus important [Chan *et al.* 2008]. En effet, une étude a mis en évidence que la détection par IRM d'un IDM, recouvrant au minimum 24% du myocarde, permet de prédire le RVG huit mois après l'IDM initial avec une sensibilité de 92% et une spécificité de 93% [Lund *et al.* 2003]. Par ailleurs, il existe une corrélation très importante entre la fraction d'éjection du VG et la taille de l'IDM puisque plus l'IDM est étendu, plus la fraction d'éjection résiduelle du VG est basse. L'IRM permet de calculer la fraction d'éjection du VG afin de d'évaluer l'importance du RVG [Lund *et al.* 2003]. Enfin, cette technique analyse la microcirculation dont l'atteinte est également impliquée dans le développement d'un RVG sévère [Lund *et al.* 2003].

L'*échocardiographie* est également une technique de choix du fait de sa disponibilité, de son faible coût et de sa simplicité d'utilisation. Elle permet de mesurer les volumes ventriculaires télédiastolique et télésystolique ainsi que l'épaisseur pariétale du VG, ce qui permet d'évaluer l'importance du RVG (Figure 16).

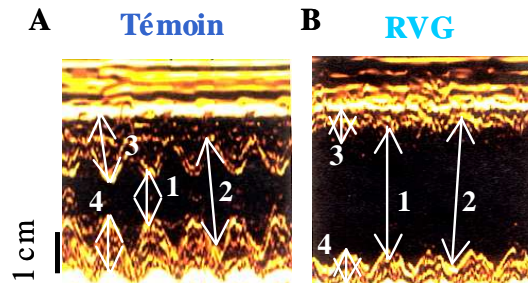


Figure 16 : Représentation de la mesure des diamètres et de l'épaisseur du VG chez des animaux témoins (A) et à 2 mois post-IDM (B). La flèche 1 représente le diamètre diastolique du VG (DDVG), la flèche 2 représente le diamètre systolique du VG (DSVG), la flèche 3 représente l'épaisseur de la paroi antérieure et la flèche 4 l'épaisseur de la paroi postérieure du VG d'un rat témoin (A) et présentant un RVG (B). Ces paramètres sont mesurés par échocardiographie en mode M.

A partir des diamètres et de l'épaisseur du VG, différents paramètres de la fonction du VG peuvent être déterminés. En effet, la fraction de raccourcissement (FS), qui représente le raccourcissement des fibres musculaires lors de la contraction cardiaque, est obtenu par la formule $FS = (DDVG - DSVG) / DDVG$. Cependant, ce paramètre n'est plus utilisé en pratique clinique mais reste utile dans l'évaluation du RVG chez le petit animal. Le volume d'éjection systolique (VES) se définit comme le produit de l'index vitesse temps et de la surface de la section transverse de l'aorte et permet d'obtenir le débit cardiaque (DC) par la formule $DC = VES \times \text{fréquence cardiaque}$. Enfin, les volumes télédiastolique et télésystolique du VG sont déterminés par la formule $\text{volume} = [(\pi/6) \times (\text{petit diamètre})^2 \times (\text{grand diamètre} - 0.55 \times \text{épaisseur})] / 1000$. Ces volumes permettent de déduire la fraction d'éjection du VG (FEVG) qui est égale au $(\text{volume télédiastolique} - \text{volume télésystolique}) / \text{volume télédiastolique}$.

Le Doppler cardiaque permet également d'apprécier la fonction ventriculaire diastolique par la mesure sur le flux mitral antérograde du quotient E/A, qui représente le ratio entre le pic de vitesse de l'onde E pour la phase précoce de remplissage et le pic de vitesse de l'onde A pour la phase tardive de remplissage (Figure 17).

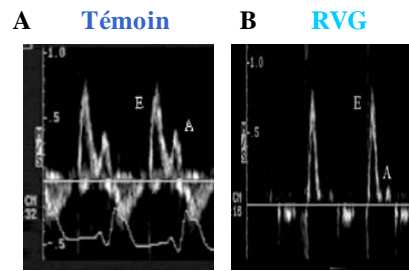


Figure 17 : Représentation de la mesure du quotient E/A chez des animaux témoins (A) et à 2 mois post-IDM (B). Ces paramètres sont mesurés par Doppler cardiaque.

3.4 Mécanismes physiopathologiques

3.4.1 Réexpression du programme fœtal

Lors du RVG, un des changements initiaux observés est la réexpression du programme fœtal par les cardiomyocytes, c'est-à-dire l'expression de gènes initialement impliqués dans le développement cardiaque embryonnaire [Barry *et al.* 2008].

Des modulations de l'expression de certaines *protéines contractiles* ont été décrites. Dans le VG hypertrophié, une augmentation de l'isoforme β et une diminution de l'isoforme α de la chaîne lourde de myosine sont observées [Barry *et al.* 2008]. La myosine étant directement impliquée dans la contraction cardiaque, ce changement d'isoforme peut conduire à une diminution de la vitesse de contraction du VG [Barry *et al.* 2008]. Par ailleurs, une augmentation du ratio N2BA/N2B de la titine, une protéine du cytosquelette, est observée lors du RVG ce qui entraîne une perte de la rigidité cellulaire puisque les cellules qui expriment majoritairement l'isoforme N2BA sont plus souples que celles qui expriment l'isoforme N2B [Taegtmeier *et al.* 2010]. Enfin, l'expression de l'isoforme squelettique de l' α -actine à la place de l'isoforme cardiaque de cette protéine pourrait également avoir un effet délétère sur la contraction cardiaque [Taegtmeier *et al.* 2010].

Les *peptides natriurétiques*, dont la fonction principale au niveau du cœur est d'inhiber l'hypertrophie, voient leurs expressions considérablement augmentées lors du RVG [Barry *et al.* 2008]. De plus, les peptides natriurétiques de type A et B (ANP / BNP) ont également une action vasodilatatrice en inhibant le système rénine-angiotensine-aldostérone et contribuent donc à maintenir le débit cardiaque en réduisant la post-charge donc le travail cardiaque [Kasama *et al.* 2008].

3.4.2 Principales voies de signalisation

Lors du RVG, de nombreuses voies de signalisation contribuent à la dilation du VG ainsi qu'à la perte des propriétés contractiles cardiaques.

Parmi ces voies, la **dégradation de la matrice extra-cellulaire** joue un rôle important dans le développement du RVG car elle contribue à l'expansion de la zone infarctée [Spinale 2002]. De plus, la dégradation de la matrice extra-cellulaire induit un glissement des cardiomyocytes les uns par rapport aux autres favorisant ainsi la dilatation du VG [Spinale 2002]. Cette dégradation est principalement effectuée par les métalloprotéases de la matrice (MMP) [Dinh *et al.* 2009]. A l'heure actuelle, vingt-cinq MMP différentes partageant des propriétés identiques ont été identifiées. En effet, toutes les MMP dégradent des éléments de la matrice extra-cellulaire, sont sécrétées sous forme latente et nécessitent une activation pour favoriser leur activité protéolytique par l'intermédiaire de la fixation d'un ion zinc dans leur site actif [Dinh *et al.* 2009]. Cependant, seules certaines de ces MMP ont été mises en évidence dans le cœur avec des localisations cellulaires et des conséquences multiples [Vanhoutte *et al.* 2010] (Table VI).

Table VI : Localisation et fonction des MMP et des TIMP dans le cœur (d'après [Vanhoutte *et al.* 2010]).

Nom	Localisation cellulaire	Phénotype observé dans les souris KO
<i>Collagénases</i>		
MMP-1	fibroblastes, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses	développement d'un RVG au bout de 6 mois
MMP-8	neutrophiles, cellules musculaires lisses	pas de conséquence
MMP-13	fibroblastes	pas de donnée
<i>Gélatinases</i>		
MMP-2	macrophages, lymphocytes, fibroblastes, cellules musculaires lisses, cardiomyocytes	diminution de la réponse inflammatoire, de la dilatation du VG et de la cicatrice fibreuse
MMP-9	neutrophiles, macrophages, lymphocytes, fibroblastes, cellules musculaires lisses, cardiomyocytes	diminution de la réponse inflammatoire, de la synthèse de collagène, de la dilatation du VG et augmentation de l'angiogénèse
<i>Stromélysines</i>		
MMP-3	fibroblastes, cellules musculaires lisses, cardiomyocytes	pas de conséquence
MMP-7	macrophages, cardiomyocytes	augmentation de la survie
<i>MMP membranaires</i>		
MT1-MMP	fibroblastes, cellules musculaires lisses, cardiomyocytes	pas de donnée
<i>TIMP</i>		
TIMP-1	fibroblastes, macrophages, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, cardiomyocytes	augmentation de l'hypertrophie du VG
TIMP-2	fibroblastes, macrophages, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, cardiomyocytes	pas de donnée
TIMP-3	fibroblastes, cellules musculaires lisses, cardiomyocytes	augmentation de l'hypertrophie du VG et de la mortalité
TIMP-4	fibroblastes, cellules musculaires lisses, cardiomyocytes	pas de donnée

Physiologiquement, l'activité de ces MMP est inhibée par les inhibiteurs des métalloprotéases (TIMP) [Dinh *et al.* 2009]. Dans les conditions physiologiques, l'expression des MMP est basse, mais elle augmente, lors du RVG, sous l'action de certains facteurs libérés au cours de la réponse inflammatoire mise en jeu dans la phase précoce du RVG, tels

que le $TNF\alpha$, certains facteurs de croissance ou l'aldostérone [Spinale 2002]. Le dérèglement de la balance entre les MMP et les TIMP joue un rôle primordial dans le développement du RVG puisque les TIMP peuvent induire la prolifération des fibroblastes ainsi que leur différenciation en myofibroblastes, responsables de la synthèse importante de collagène qui constitue la cicatrice fibreuse [Vanhoutte *et al.* 2010].

Le *système rénine-angiotensine-aldostérone* est également impliqué dans le développement du RVG puisqu'il est activé par une surcharge de pression. Ce système est actuellement au cœur de la thérapeutique post-IDM [Dickstein *et al.* 2008] (Figure 18).

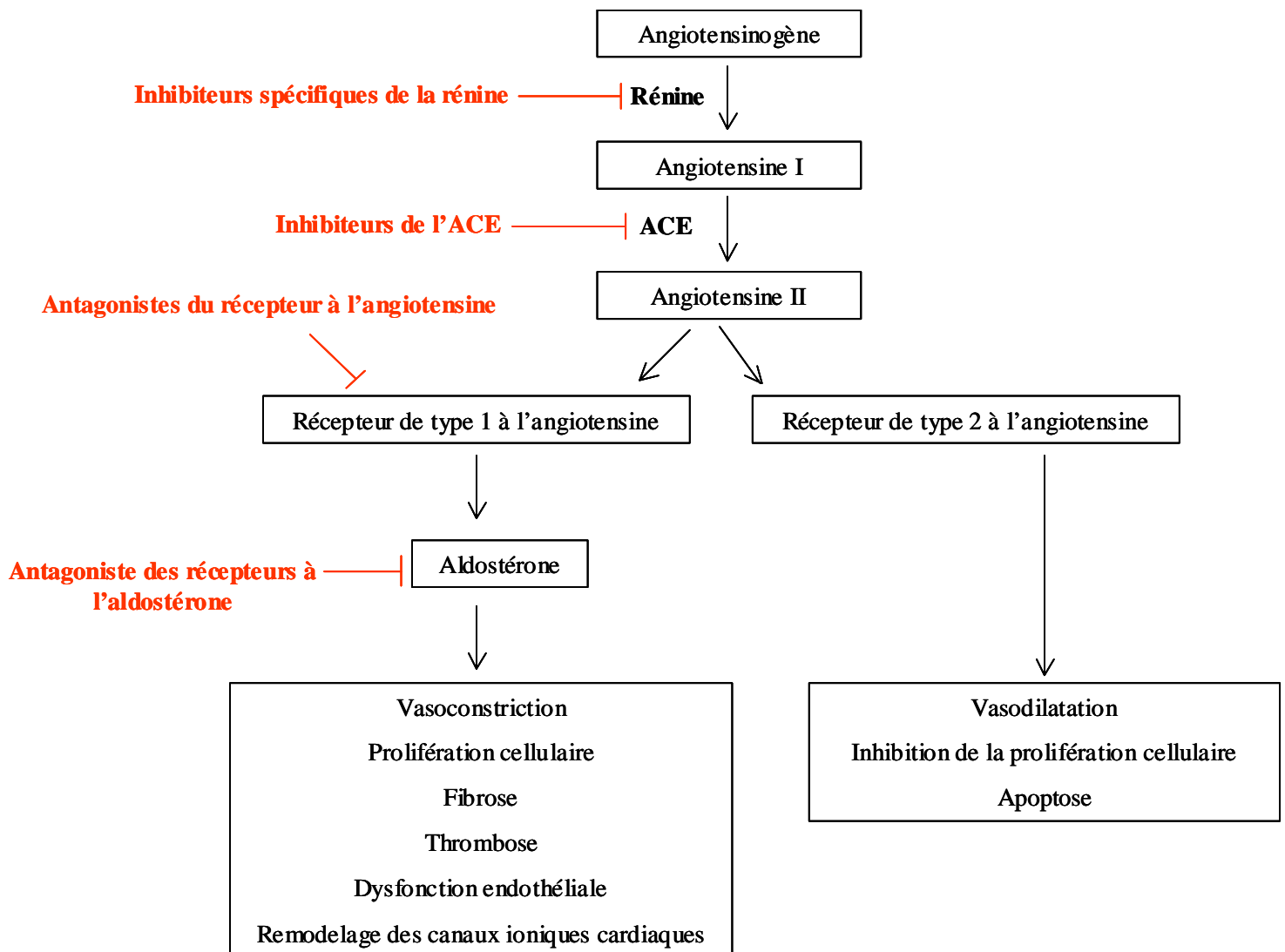


Figure 18 : Le système rénine-angiotensine-aldostérone. ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine. Les stratégies thérapeutiques actuelles sont représentées en rouge avec une flèche symbolisant l'inhibition.

L'angiotensinogène, précurseur de cette voie, est clivé par la rénine en angiotensine de type I inactive. L'ACE clivera alors cette protéine en angiotensine de type 2 qui possède deux récepteurs aux actions antagonistes. Le récepteur de type 1 à l'angiotensine conduit à la

production d'aldostérone et induit une vasoconstriction ainsi qu'une augmentation de la prolifération cellulaire, de la fibrose et de la thrombose [Ertl *et al.* 2005]. Cette voie est la cible des thérapies actuelles. Le récepteur de type 2 à l'angiotensine induit quant à lui une vasodilatation, une apoptose ainsi qu'une inhibition de la prolifération cellulaire [Ertl *et al.* 2005].

3.4.3 Métabolisme énergétique

Dans les conditions physiologiques, les besoins énergétiques des cardiomyocytes, nécessaires à la contraction cardiaque, sont principalement assurés par la β -oxydation des acides gras et par la glycolyse (Figure 19).

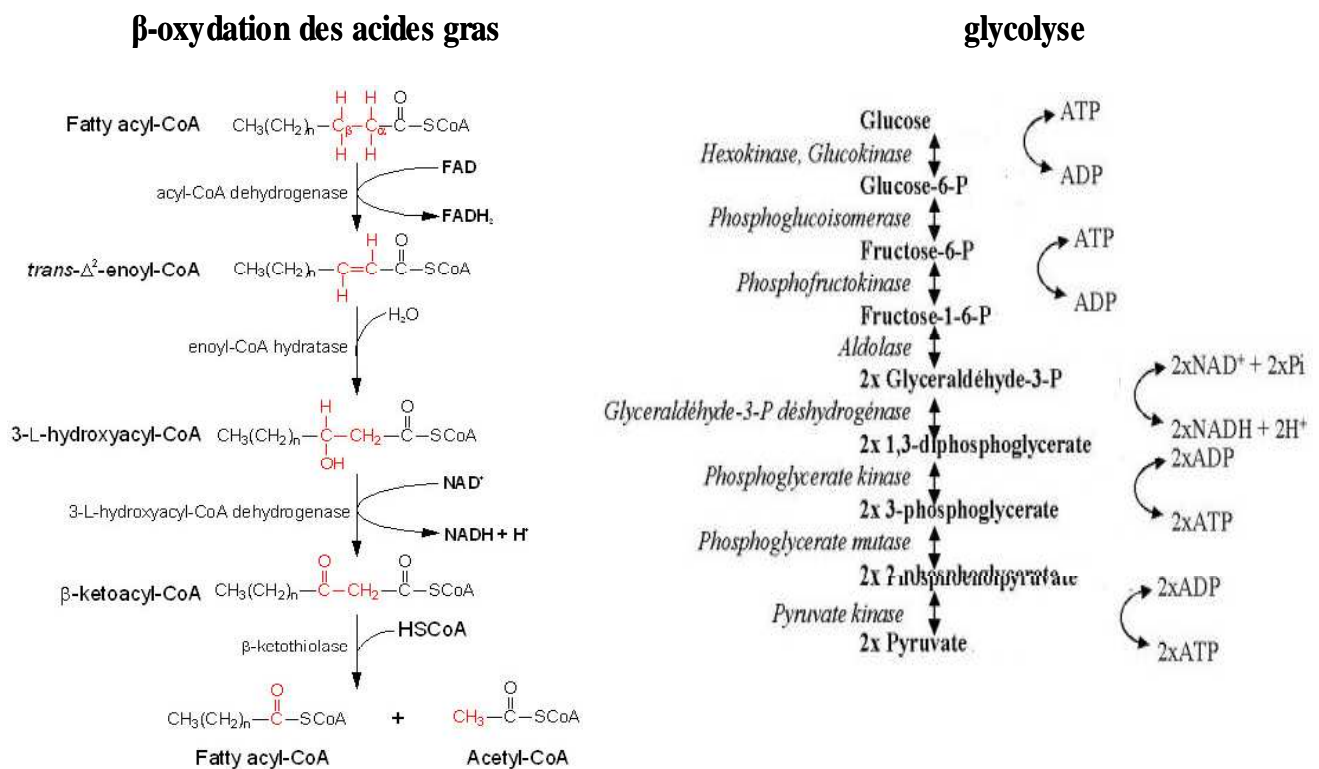


Figure 19 : La voie de β -oxydation des acides gras et de la glycolyse. FAD : flavine adénine dinucléotide, NAD : nicotinamide adénine dinucléotide, coA : coenzyme A, Pi : phosphate inorganique.

Ces deux voies conduisent à la production de plus de 90% des besoins énergétiques des cardiomyocytes [Ventura-Clapier *et al.* 2002]. En effet, le produit final de la β -oxydation des acides gras et de la glycolyse est la formation d'acétyl-coenzyme A, qui est à l'origine du cycle de Krebs (Figure 20).

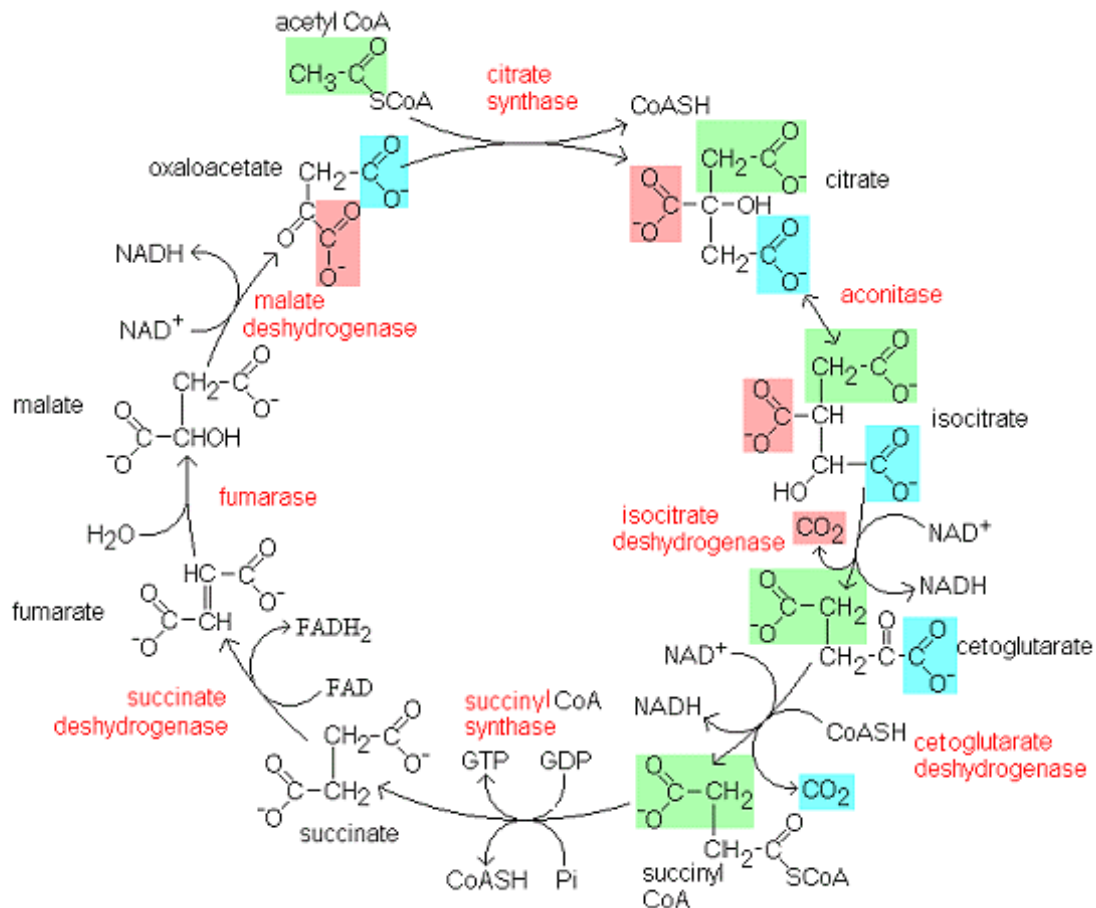


Figure 20 : La voie du cycle de Krebs. FAD : flavine adénine dinucléotide, NAD : nicotinamide adénine dinucléotide, coA : coenzyme A.

La production de NADH lors du cycle de Krebs conduit enfin à la synthèse d'ATP, source principale d'énergie pour la contraction des cardiomyocytes, par la phosphorylation oxydative de la chaîne respiratoire mitochondriale [White *et al.* 2008]. En effet, les mitochondries représentent 35% du volume des cardiomyocytes sains [Willenheimer 2000]. La chaîne respiratoire mitochondriale est une chaîne de complexes protéiques localisée dans la membrane interne de la mitochondrie (Figure 21).

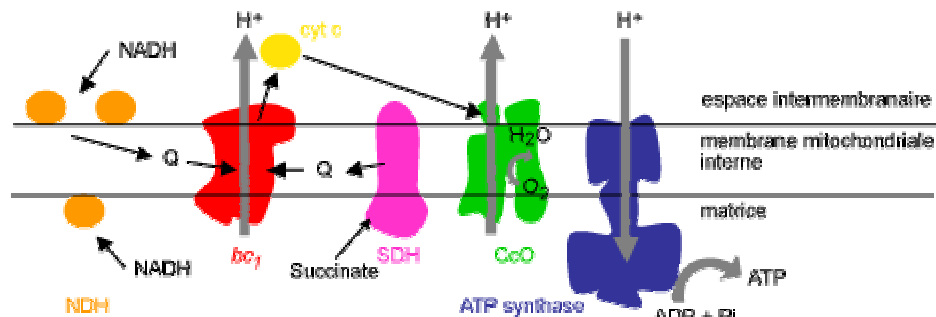


Figure 21 : Production d'ATP par phosphorylation oxydative. NAD : nicotinamide adénine dinucléotide, Cyt c : cytochrome c, SDH : succinate déshydrogénase.

La production d'énergie est permise par la formation d'un gradient électrochimique de protons situés dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie et transportés successivement dans les différents complexes. Le complexe I, correspond à la NADH désydrégénase, le complexe II à la succinate coenzyme Q réductase, le complexe III à la coenzyme Q cytochrome c réductase et le complexe IV à la cytochrome c oxydase. Suite à cette chaîne, les protons produits seront dirigés vers la matrice mitochondriale par les ATP synthases, ce qui conduira à la production d'ATP. Cet ATP est ensuite transféré dans les myofibrilles, responsables de la contraction des cellules par l'intermédiaire du système créatine kinase [Neubauer 2007]. En effet, l'ATP et la créatine vont s'associer pour donner de la phosphocréatine, qui est plus petite que l'ATP et diffuse donc rapidement de la mitochondrie aux myofibrilles où l'ATP se reformera (Figure 22).

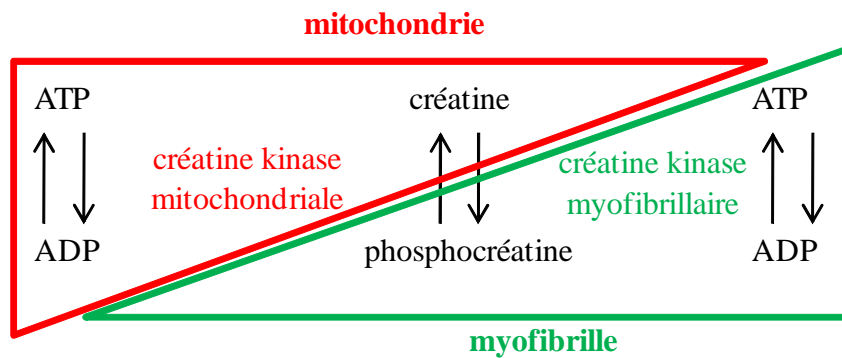


Figure 22 : Le système créatine kinase.

Lors du RVG, une diminution de l'utilisation de la β -oxydation des acides gras est associée à une augmentation de l'utilisation de la glycolyse pour la production d'énergie par les cardiomyocytes [Ventura-Clapier *et al.* 2002]. Par ailleurs, l'hypertrophie de ces cellules induit une diminution du nombre de mitochondries, qui conduit à une diminution de la production d'énergie par la phosphorylation oxydative de la chaîne respiratoire mitochondriale [Ventura-Clapier *et al.* 2002]. Enfin, le système créatine kinase est également perturbé lors de cette pathologie. En effet, l'activité de la créatine kinase mitochondriale diminue de près de 20% et celle de la créatine kinase myofibrillaire d'environ 50%, entraînant une perte de l'énergie transférée aux myofibrilles de plus de 70% [Neubauer 2007]. Les principales modifications du métabolisme observées lors du RVG sont regroupées dans la Table VII.

Table VII : Principales modifications du métabolisme énergétique observées lors du RVG (d'après [Neubauer 2007]).

Nom	Phase précoce	Phase tardive
Utilisation des acides gras	Diminution faible	Diminution importante
Glycolyse	Augmentation	Diminution
Complexes de la chaîne respiratoire	Diminution faible	Diminution importante
ATP synthase	Diminution faible	Diminution importante
Consommation en oxygène	Diminution faible	Diminution importante
ATP	Pas de variation	Diminution
Phosphocréatine	Diminution faible	Diminution importante
Créatine totale	Diminution faible	Diminution importante
Activité créatine kinase totale	Pas de variation	Diminution
Créatine kinase mitochondriale	Diminution faible	Diminution importante
Créatine kinase myofibrillaire	Pas de variation	Diminution
Transfert d'ATP	Diminution faible	Diminution importante

3.4.4 Apoptose et stress oxydant

3.4.4.1 Apoptose

Contrairement à la nécrose qui intervient lors de l'IDM, l'apoptose est une mort cellulaire programmée énergie-dépendante mettant un jeu un programme génétique qui intervient principalement lors de la phase précoce du RVG [van Empel *et al.* 2005]. En effet, l'apoptose myocardique présente un pic quatre à douze heures après un IDM et peut être détectée jusqu'à dix jours suite à cet IDM [Abbate *et al.* 2002]. Bien que l'hypertrophie et l'apoptose représentent deux phénotypes différents, les voies de signalisation impliquées dans ces deux mécanismes sont similaires, notamment la voie du système rénine-angiotensine-aldostérone [Ferrari *et al.* 2009]. De plus, l'apoptose est un mécanisme hautement régulé par la balance entre des signaux pro- et anti-apoptotiques [van Empel *et al.* 2005].

L'apoptose est mise en place selon deux voies, la voie extrinsèque qui met en jeu les récepteurs de mort et la voie intrinsèque qui passe par la mitochondrie. Ces deux voies conduisent à l'activation des caspases, protéases clivant un certain nombre de protéines nucléaires elle-même responsables du clivage de l'ADN en fragments évacués ensuite par les macrophages formant des corps apoptotiques caractéristiques de cette mort cellulaire. Dans les conditions physiologiques, les caspases sont sous une forme inactive dans le cytosol et peuvent être activées par clivage afin de cliver par la suite leurs substrats.

Au niveau cardiaque, les principaux substrats des caspases sont principalement des protéines contractiles telles que l' α -actine, l' α -actinine, les chaînes lourdes et légères de

myosine, l' α -tropomyosine et les troponines [van Empel *et al.* 2005]. Les mécanismes moléculaires conduisant à l'apoptose sont présentés dans la Figure 23.

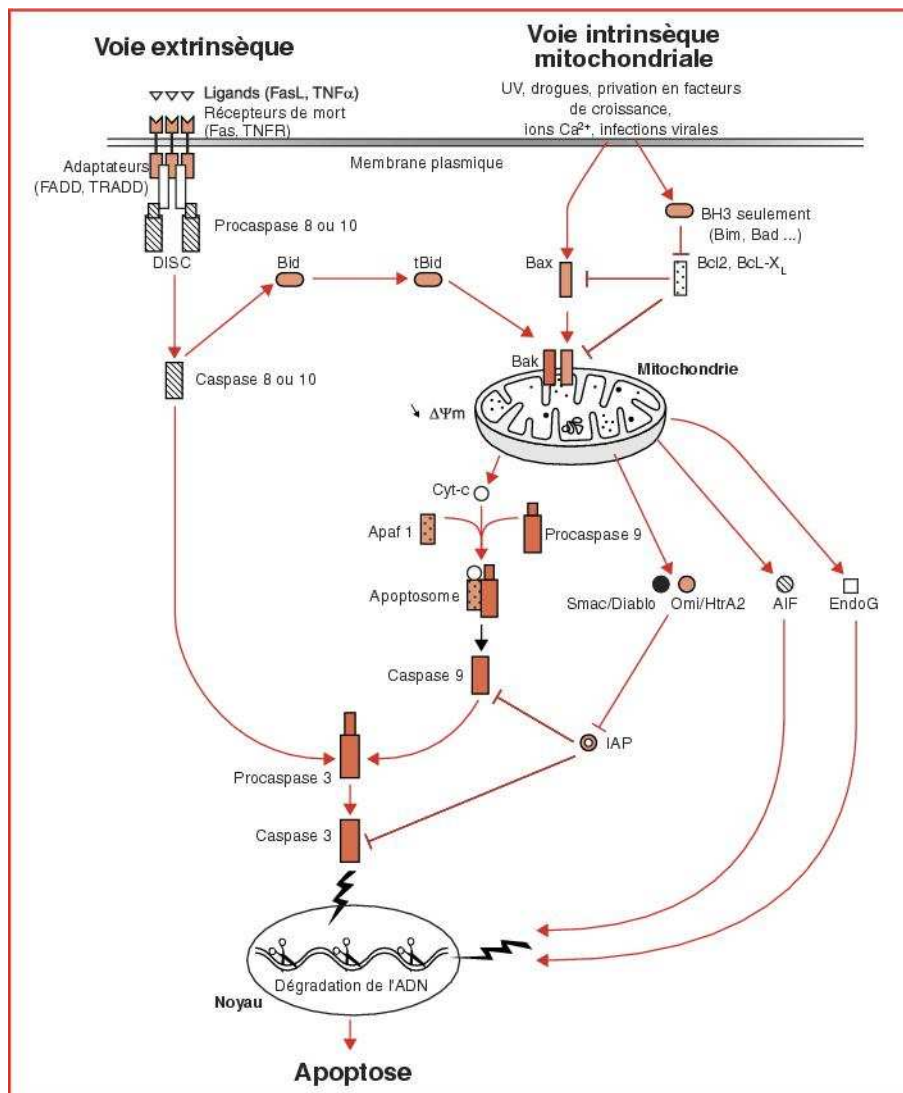


Figure 23 : Mécanismes moléculaires de l'apoptose. UV : Ultraviolet, Cyt C : Cytochrome c.

3.4.4.2 Stress oxydant

Dans les conditions physiologiques, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites naturellement par la chaîne respiratoire au niveau des cardiomyocytes mais également par la NADPH oxydase et la xanthine déshydrogénase / xanthine oxydase au niveau des cellules endothéliales [Tsutsui *et al.* 2009]. En effet, l'oxygène (O $_2$) peut donner naissance à l'anion superoxyde (O $_2^{\cdot-}$) qui conduira à la formation du radical hydroxyle (OH \cdot) responsable des effets toxiques. Les ROS peuvent notamment conduire à l'oxydation des lipides, des protéines ou de l'ADN. Ces effets toxiques sont généralement pris en charge par les molécules anti-oxydantes telles que les catalases, les superoxydes dismutases (SOD) ou la

glutathion peroxydase, mais lorsque la production de ROS est supérieure aux capacités anti-oxydantes, leurs effets toxiques entraînent une modification de la structure et de la fonction des tissus [Tsutsui *et al.* 2009]. En effet, l'anion superoxyde sera réduit par la superoxyde dismutase en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui pourra être sujet à la réaction de Fenton et conduire à nouveau à la formation du radical hydroxyle. Par ailleurs, ce peroxyde d'hydrogène pourra être réduit par les catalases ou la glutathion peroxydase (Figure 24).

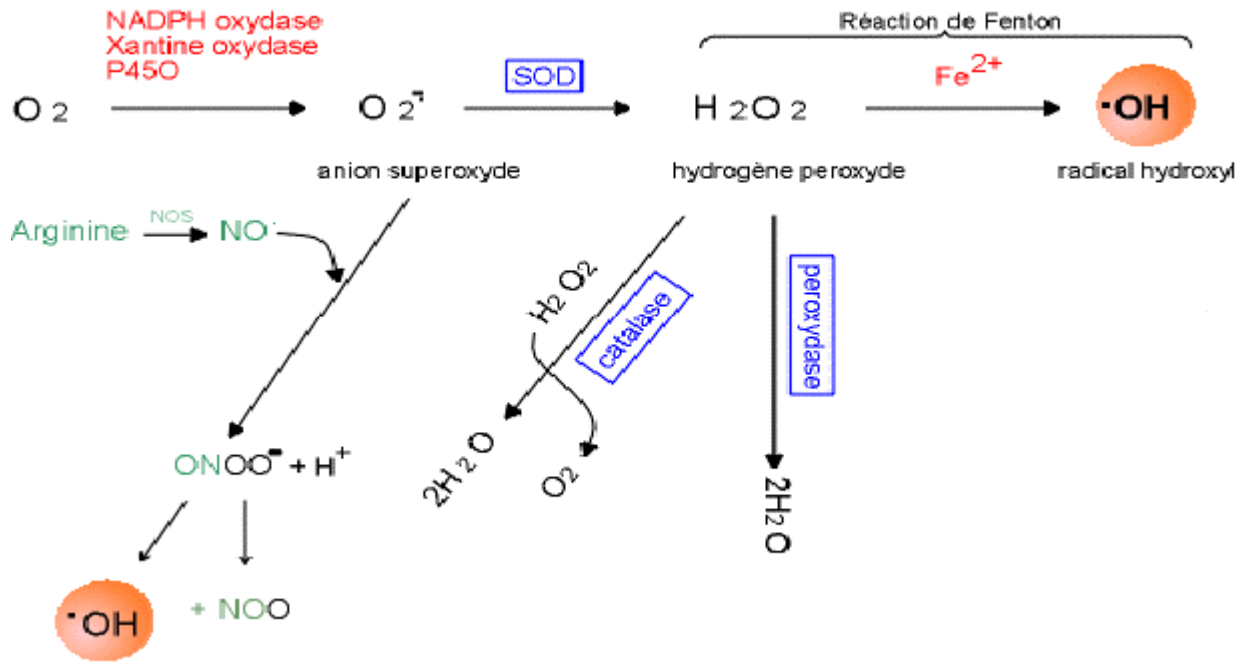


Figure 24 : Mécanismes de production et de réduction des ROS. NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, SOD : superoxyde dismutase, P450 : Cytochrome P450.

Lors du RVG, les ROS, produits par la reperfusion myocardique puis par la réponse inflammatoire après un IDM, induisent des dommages structuraux entraînant la perte des propriétés contractiles du myocarde [Tsutsui *et al.* 2009]. De plus, il est décrit une augmentation de la production de ROS par les cardiomyocytes, les cellules endothéliales et les neutrophiles corrélée à la gravité du RVG mais sans diminution des capacités anti-oxydantes [Tsutsui *et al.* 2009]. Par ailleurs, l'angiotensine de type 2 induit l'augmentation de la production mitochondriale de ROS conduisant à une diminution de la quantité de NO disponible, induisant non seulement les effets toxiques des ROS mais également une vasoconstriction importante [Tsutsui *et al.* 2009]. Enfin, les ROS peuvent augmenter l'activité des MMP, conduisant là-encore au développement du RVG [Tsutsui *et al.* 2009].

3.4.5 Protéines contractiles

3.4.5.1 Mécanisme de contraction cardiaque

La contraction cardiaque est à l'origine assurée par un couplage excitation-contraction associant un stimulus électrique à l'entrée de calcium dans les cardiomyocytes. La concentration intracellulaire en calcium passe alors de $0.1 \mu\text{M}$ à $1 \mu\text{M}$ en moins de 100 ms. Le calcium va entrer dans les cardiomyocytes grâce aux canaux calciques de type L. Cette entrée va induire la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique qui va interagir avec la troponine C et induire la formation des ponts actine-myosine à l'origine de la contraction [Fukuda *et al.* 2009]. Cette interaction entre l'actine et la myosine active l'ATPase de la myosine et l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP est rapidement convertie en énergie mécanique. La relaxation est assurée par le retour de la concentration intracellulaire en calcium à l'état initial grâce à quatre systèmes de transport :

- La séquestration du calcium dans le réticulum sarcoplasmique par la pompe calcium-ATPase.
- Le transport par un échangeur sodium / potassium.
- La sortie par la pompe calcium-ATPase.
- L'entrée dans la mitochondrie par le transporteur de calcium.

Les mécanismes de flux calcique sont présentés en Figure 25.

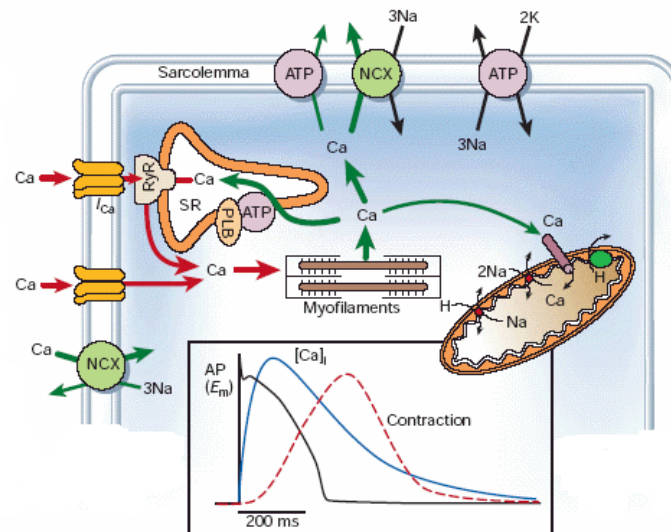


Figure 25 : Mécanismes du flux calcique conduisant à la contraction et à la relaxation des cardiomyocytes.

Les fibres musculaires formant la paroi des ventricules sont disposées en spirales selon des angles divers permettant lors de leur contraction la diminution du volume des cavités ventriculaires selon l'axe transversal et longitudinal. L'élément contractile cardiaque est appelé sarcomère. Il mesure au repos environ 1,8 μm et peut être étiré lors du remplissage cardiaque jusqu'à une longueur de 2,3 μm environ. Ce sarcomère, qui représente 50% du volume des cardiomyocytes, correspond à un assemblage spécifique des protéines contractiles, visualisable au microscope électronique (Figure 26).

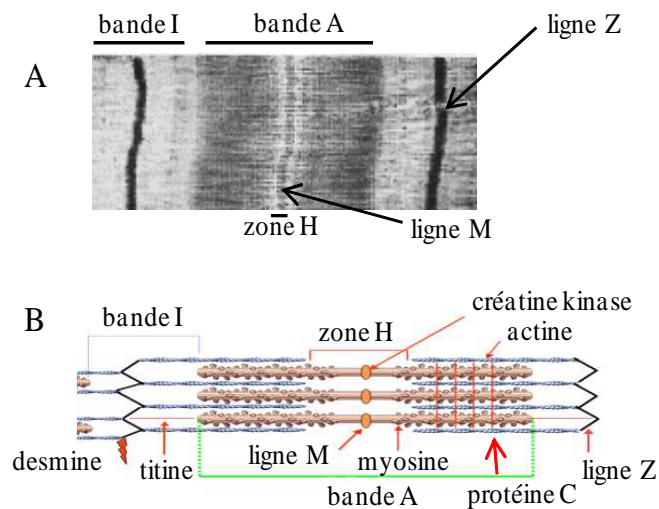


Figure 26 : Visualisation et représentation schématique du sarcomère cardiaque. (A) Visualisation par microscopie électronique du sarcomère cardiaque. (B) Représentation schématique du sarcomère cardiaque. A : Anisotropique, I : Isotropique, Z : *Zwischenscheibe*, H : *Hensen*, M : *Mittlemembran*.

La bande I est composée principalement de l' α -actinine, constituant majeur de la ligne Z, de la desmine, de la protéine C et de la titine.

L' α -actinine est une protéine de cytosquelette ubiquitaire, retrouvée dans tous les types cellulaires [Luther 2009]. Son rôle principal est de faire le lien entre la ligne Z et l'actine afin de maintenir la structure des cardiomyocytes lors de la contraction et de la relaxation cardiaque [Luther 2009]. Pour cela, cette protéine interagit avec la titine mais également avec deux protéines qui coiffent les extrémités des filaments, la tropomoduline et la protéine Cap Z [Pyle 2004].

La *desmine* appartient à la famille des filaments intermédiaires [Hein *et al.* 2000]. Cette protéine permet de maintenir l'intégrité fonctionnelle des myofibrilles mais joue également un rôle dans la survie des cardiomyocytes [Hein *et al.* 2000]. En effet, la desmine forme un lien entre les noyaux, les protéines contractiles, le sarcolemme et la matrice extracellulaire mais également avec certains organites intra-cellulaires tels que les mitochondries et

le réticulum sarcoplasmique [Calaghan *et al.* 2004].

La **protéine C** est une protéine du cytosquelette qui relie la myosine à la titine afin de maintenir l'intégrité de l'appareil contractile [Hein *et al.* 2000]. Il existe trois isoformes embryonnaires ainsi que trois isoformes définitives de cette protéine : une isoforme du muscle rapide, une isoforme du muscle lent et une isoforme cardiaque. Cette protéine intervient également dans la régulation de la contraction cardiaque par son interaction avec la myosine [Hein *et al.* 2000].

La **titine** est une protéine du cytosquelette de très haut poids moléculaire qui établit le lien entre l' α -actinine de la ligne Z et la ligne M du sarcomère [Sanger *et al.* 2000]. Elle est constituée d'une succession de domaines fibronectine et immunoglobuline lui assurant une flexibilité importante [Linke 2008]. Par ailleurs, il existe différentes isoformes de cette protéine dont les principales au niveau du cœur sont les isoformes N2B et N2BA [Linke 2008]. Cette protéine est principalement responsable de la rigidité cellulaire puisque les cellules qui expriment majoritairement l'isoforme N2BA sont plus souples que celles qui expriment l'isoforme N2B. Enfin, la titine possède de nombreux sites de phosphorylation ainsi qu'un domaine kinase, ce qui place cette protéine au cœur de la voie de signalisation de la contraction cardiaque [Pyle 2004].

La bande A est, quant à elle, composée principalement des ponts actine-myosine qui sont responsables de la contraction ainsi que de nombreuses protéines contractiles interagissant avec l'actine et la myosine pour permettre cette contraction, formant ainsi un appareil contractile complexe (Figure 27).

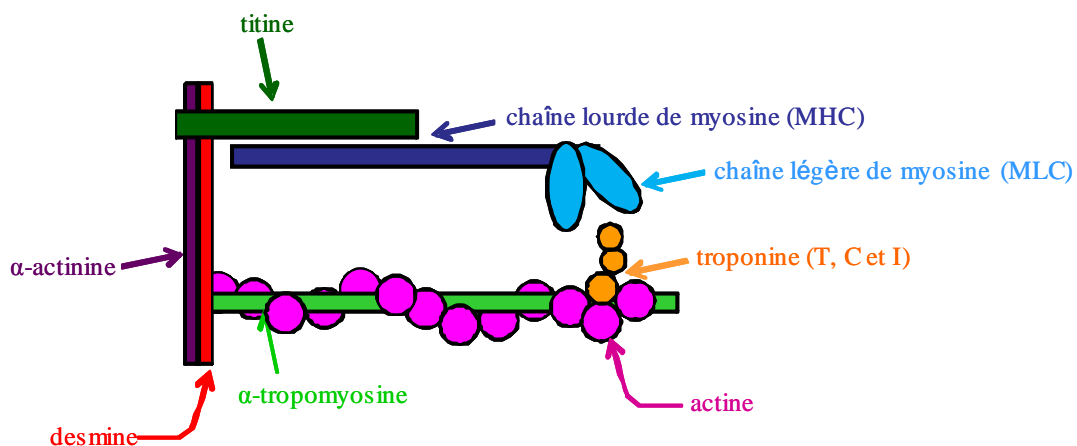


Figure 27 : Représentation schématique de l'appareil contractile cardiaque.

La contraction du muscle cardiaque est issue de l'entrée du calcium qui va se fixer à la troponine C (TnC), ce qui va entraîner un changement de conformation du complexe des troponines et de l' α -tropomyosine, libérant ainsi la myosine. Cette dernière pourra alors entrer en interaction avec l'actine et induire la contraction cardiaque grâce à l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP (Figure 28).

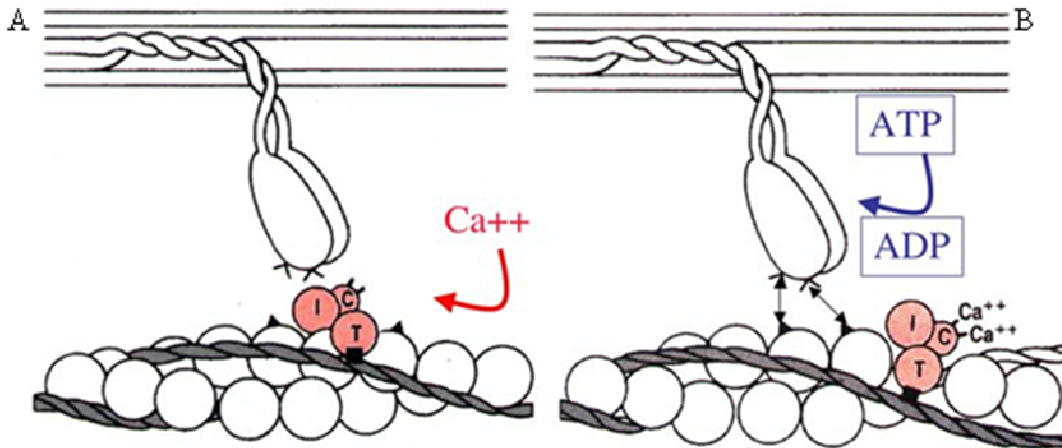


Figure 28 : Représentation schématique du mécanisme de contraction cardiaque. (A) Muscle au repos, (B) Contraction. I : troponine I, C : troponine C, T : troponine T.

Lors de la relaxation, le calcium va se détacher de la TnC et le complexe des troponines et de la tropomyosine va reprendre sa conformation d'origine où la troponine I est liée à l'actine. L'actine ainsi que le complexe des troponines et la tropomyosine constituent le filament fin alors que la myosine constitue le filament épais.

L'*actine* est une protéine ubiquitaire, hautement conservée et retrouvée dans tous les types cellulaires eucaryotes [Luther 2009]. Cette protéine est un filament appelé actine F qui est constitué de la polymérisation de monomères d'actine G, stabilisés par un ion calcique et une molécule d'ATP hydrolysée [Luther 2009]. Dans le sarcomère, l'actine est sous la forme d'une double hélice [Marston *et al.* 2003]. Il existe 6 isoformes de l'actine ; l' α -actine squelettique, l' α -actine cardiaque, l' α -actine vasculaire, l' α -actine entérique, la β -actine et la γ -actine [Calaghan *et al.* 2004]. Parmi ces isoformes, l' α -actine est principalement retrouvée au niveau des sarcomères alors que les isoformes β et γ sont principalement cytoplasmiques [Calaghan *et al.* 2004]. Dans le cœur, l' α -actine cardiaque représente environ 80% de l'actine totale [Marston *et al.* 2003].

La *myosine* permet de générer les mouvements cardiaques par hydrolyse de l'ATP [Gupta 2007]. La myosine est un hexamère constitué de deux chaînes lourdes et quatre chaînes légères (Figure 29) [Gupta 2007].



Figure 29 : Représentation schématique de la structure de la myosine. MHC : Chaîne lourde de myosine, MLC : Chaîne légère de myosine.

La complexité de la myosine est également due à ces différentes isoformes. En effet, il existe deux isoformes de la chaîne lourde (MHC α et β) et deux isoformes de la chaîne légère, la MLC-1/3 dite essentielle et la MLC-2 dite régulatrice, toutes codées par des gènes différents [Gupta 2007]. Bien que l'isoforme α de la MHC ait une activité ATPasique plus élevée, c'est l'isoforme β qui est prédominante chez l'homme [Gupta 2007]. Par ailleurs, la MLC-1/3 interagit avec l'actine et inhibe la formation des ponts actine-myosine. Concernant la MLC-2, la phosphorylation joue un rôle essentiel dans son mécanisme d'action. En effet, la phosphorylation de la MLC-2 induit un ralentissement de la cinétique de formation des ponts actine-myosine.

La *tropomyosine* se lie le long du filament d'actine, une molécule de tropomyosine s'étendant sur sept monomères d'actine [Marston *et al.* 2003]. Il existe trois isoformes de cette protéine qui sont l' α -tropomyosine, la β -tropomyosine et l' α -slow tropomyosine mais l' α -tropomyosine est l'isoforme prédominante au niveau du cœur [Marston *et al.* 2003]. La tropomyosine participe à la rigidité des myofilaments en bloquant l'interaction entre l'actine et la myosine par encombrement stérique.

Le complexe des *troponines* est formé de trois sous-unités et se lie à l'actine tous les 7 monomères [Marston *et al.* 2003].

La *tropoine I* (TnI) est la sous-unité inhibitrice qui se lie à l'actine pour prévenir la formation des ponts actine-myosine. Cette protéine peut être phosphorylée par les protéines kinases A et C, ce qui augmente la sensibilité de cette protéine au calcium [Marston *et al.* 2003]. L'interaction entre l'actine et la myosine semble se faire plus facilement lorsque la TnI n'est pas phosphorylée [Adamcova *et al.* 1999].

La *tropoine C* (TnC) possède trois sites de liaison au calcium. La liaison de la TnC au calcium induit un changement de conformation des trois sous-unités de la tropoine, ce qui lève l'inhibition de la TnI [Adamcova *et al.* 1999]. A la différence de la TnT et de la TnI, elle ne présente pas d'isoforme spécifiquement cardiaque [Marston *et al.* 2003].

La troponine T (TnT) est la sous-unité qui se lie à la fois à la TnC mais également à l' α -tropomyosine. Il existe différentes isoformes de cette protéine issues de l'épissage alternatif dont les plus communes sont la TnT1, la TnT2, la TnT3 et la TnT4 [Marston *et al.* 2003]. La TnT3 est la principale isoforme dans les cardiomyocytes [Marston *et al.* 2003]. Comme pour la TnI, l'activité de la TnT, en particulier l'interaction de la TnT avec la TnI, la TnC et l' α -tropomyosine, peut être modulée par la phosphorylation [Vahebi *et al.* 2005]. En effet, la phosphorylation de la TnT, comme de la TnI peut entraîner une diminution de l'activité ATPasique des ponts actine-myosine [Noland, Jr. *et al.* 1992].

3.4.5.2 Perte des propriétés contractiles lors du RVG

La contraction des cardiomyocytes est altérée au cours du RVG et ce à différentes étapes du processus de contraction. En effet, le premier niveau atteint est la libération de calcium puisqu'il est décrit une diminution de la quantité de calcium libéré lors du RVG. L'altération du métabolisme énergétique, décrit précédemment, conduit à une diminution de la quantité d'ATP produit [Neubauer 2007]. Ces deux mécanismes peuvent conduire à une altération des propriétés contractiles cardiaques.

Par ailleurs, lors du RVG, il a été mis en évidence des modulations de l'expression de certaines protéines contractiles dans le VG hypertrophié. Ces modulations correspondent à une augmentation de l'isoforme β , à une diminution de l'isoforme α de la chaîne lourde de myosine [Barry *et al.* 2008], à une augmentation du ratio N2BA/N2B de la titine [Taegtmeyer *et al.* 2010] à et une augmentation de l'expression de l'isoforme squelettique de l' α -actine à la place de l'isoforme cardiaque [Taegtmeyer *et al.* 2010]. De plus, il est observé une augmentation de l'expression de l'isoforme atriale de la MLC-1/3 dans le VG des patients présentant un RVG, conduisant à une diminution de la sensibilité au calcium des myofilaments [Ritter *et al.* 1999].

Enfin, une dégradation de la desmine et de l' α -actinine est observée lors du RVG [Marston *et al.* 2003]. La titine est également dégradée ce qui induit une diminution de la sensibilité au calcium des myofilaments ainsi que leur déstructuration [Pyle 2004].

4 Insuffisance cardiaque

4.1 Définition

L'insuffisance cardiaque (IC) se définit comme l'incapacité du cœur à fournir un débit sanguin adapté aux besoins métaboliques et fonctionnels de l'organisme [Mudd *et al.* 2008]. L'inadéquation entre la fonction de pompe cardiaque et les besoins de l'organisme se traduit par une augmentation des pressions ventriculaires et/ou une diminution du débit cardiaque (Figure 30).

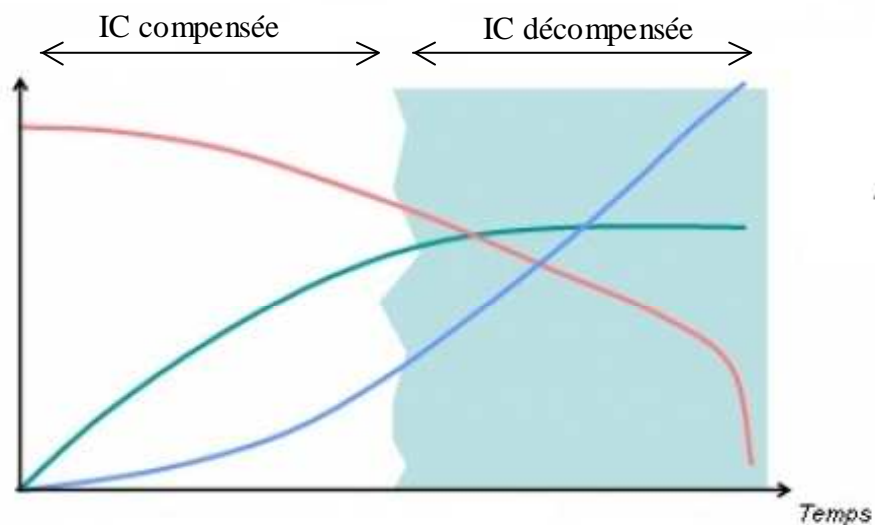


Figure 30 : Relation entre débit cardiaque, pressions ventriculaires et IC. La courbe rouge représente l'évolution du débit cardiaque en fonction du temps, la courbe bleue représente l'évolution des pressions ventriculaires en fonction du temps et la courbe verte représente l'évolution des mécanismes compensateurs en fonction du temps.

L'IC dite compensée est asymptomatique alors que l'IC dite décompensée voit apparaître les premiers symptômes cliniques. L'IC peut alors être classée en fonction de sa sévérité selon les critères de la *New York Heart Association* (NYHA) [Hess 2003]. Le stade NYHA I caractérise l'IC asymptomatique, le stade NYHA II caractérise une IC asymptomatique au repos et devenant manifeste après un effort physique important, le stade NYHA III caractérise une IC asymptomatique au repos et devenant manifeste au moindre effort physique et le stade NYHA IV caractérise une IC symptomatique au repos [Hess 2003] (Table VIII).

Table VIII : Classification de l'IC selon les critères de la NYHA.

Stade NYHA	Caractéristiques
Stade I	Cardiopathie compensée décelable à l'examen Asymptomatique Effort et travail normal possible
Stade II	Signes d'IC en cas d'exercice physique important Essoufflement et toux lors d'un effort physique important
Stade III	Signes d'IC en cas d'exercice physique modéré Intolérance à l'effort Toux et essoufflement au moindre effort ou la nuit Fatigue, dyspnée
Stade IV	Signes d'IC au repos Aucun effort physique possible Toux et dyspnée au repos Pouls faible, débit cardiaque bas

L'IC peut également être classée en fonction de sa localisation, on parlera alors d'insuffisance ventriculaire gauche lorsque la défaillance atteint le VG, d'insuffisance ventriculaire droite lorsque la défaillance atteint le VD et d'IC globale lorsque les deux ventricules sont atteints. Enfin, il est possible de distinguer schématiquement les IC avec altération de la fonction systolique et les IC avec fonction systolique normale. L'IC avec altération de la fonction systolique est la plus fréquente et peut être induite par une surcharge mécanique du VG ou un défaut de contractilité myocardique.

L'IC est une conséquence commune à de nombreuses pathologies cardiaques, telles que les atteintes myocardiques, péricardiques ou valvulaires. En effet, l'IC peut être induite par le RVG post-IDM, ce qui représente 60 à 70% des cas, mais également par une HTA représentant 20 à 30% des cas [Hess 2003]. Dans le cadre de ma thèse, nous nous intéresserons particulièrement à l'IC induite par le RVG post-IDM, schématisée en Figure 31.

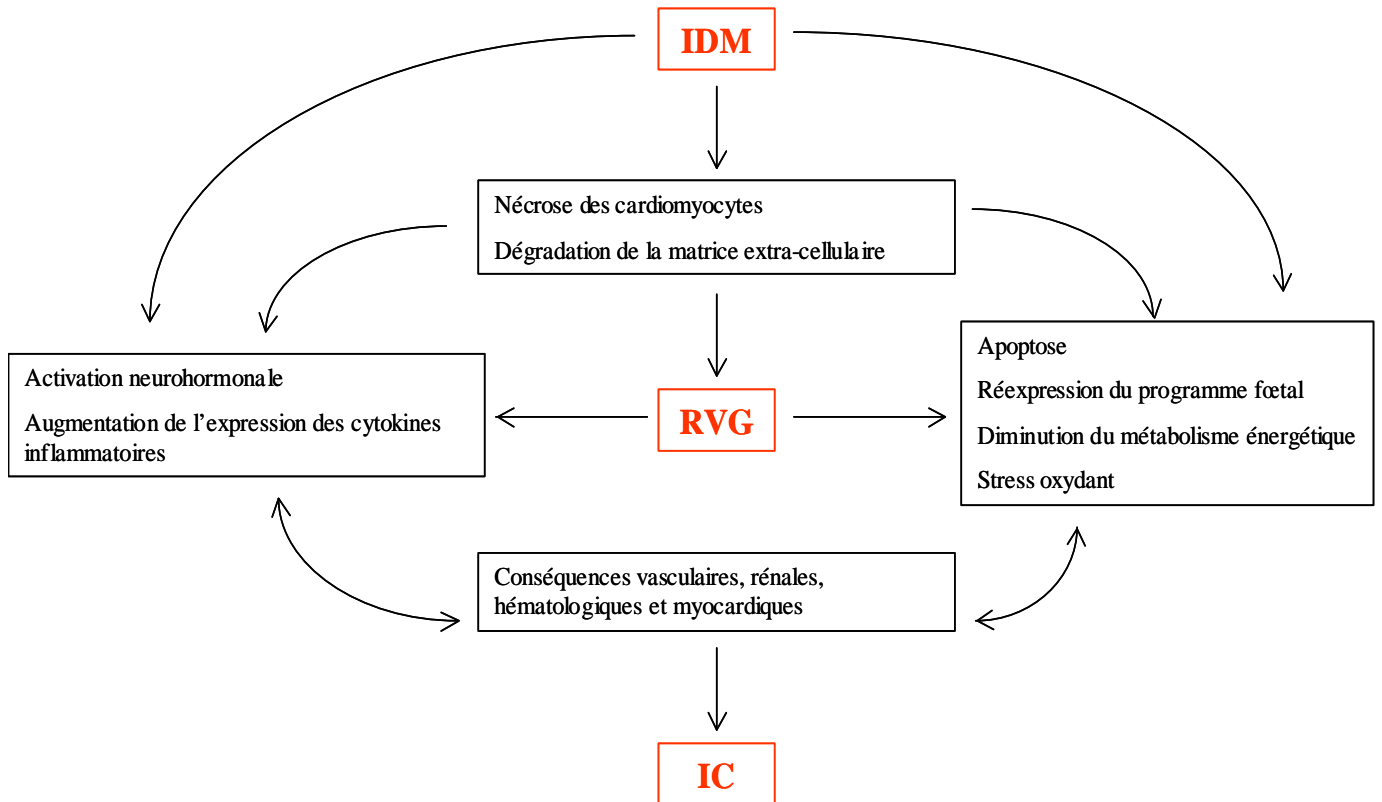


Figure 31 : Physiopathologie de l'IC induite par le RVG post-IDM.

4.2 Épidémiologie

Avec une prévalence entre 1 et 2%, l'IC est une des maladies cardiovasculaires les plus fréquentes dans les pays occidentaux [McMurray *et al.* 2005]. Cette prévalence augmente avec l'âge pour atteindre 6 à 10% chez les patients de plus de 80 ans [McMurray *et al.* 2005] (Figure 32).

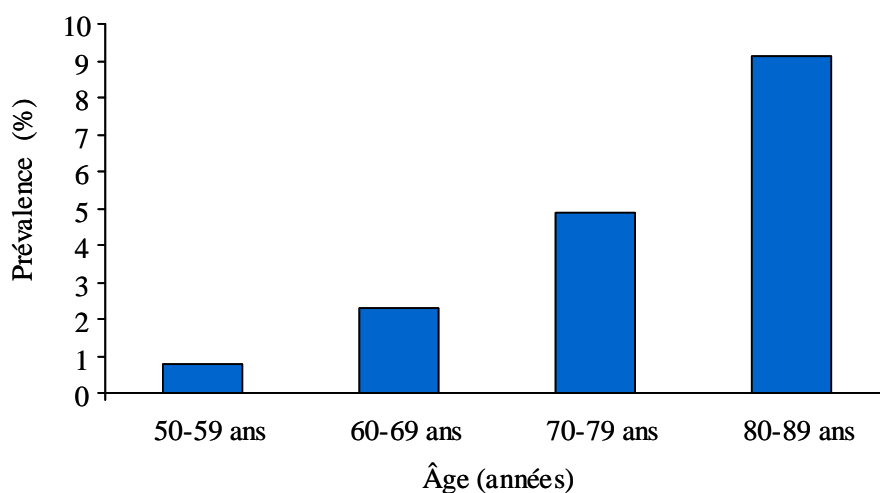


Figure 32 : Prévalence de l'IC dans l'étude de Framingham. L'étude de Framingham est une cohorte de 5209 sujets suivis depuis 1949.

De plus, l'incidence de cette maladie est en constante augmentation, ce qui peut être relié au vieillissement de la population et à l'augmentation de la durée de vie [McMurray *et al.* 2005]. Par ailleurs, le taux de mortalité est de 30 à 40% chez les patients deux ans après le diagnostic et de 50 à 60% chez les patients 5 ans après le diagnostic [McMurray *et al.* 2005]. Ce taux de mortalité présente une diminution qui reste modérée ces dernières années (Figure 33).

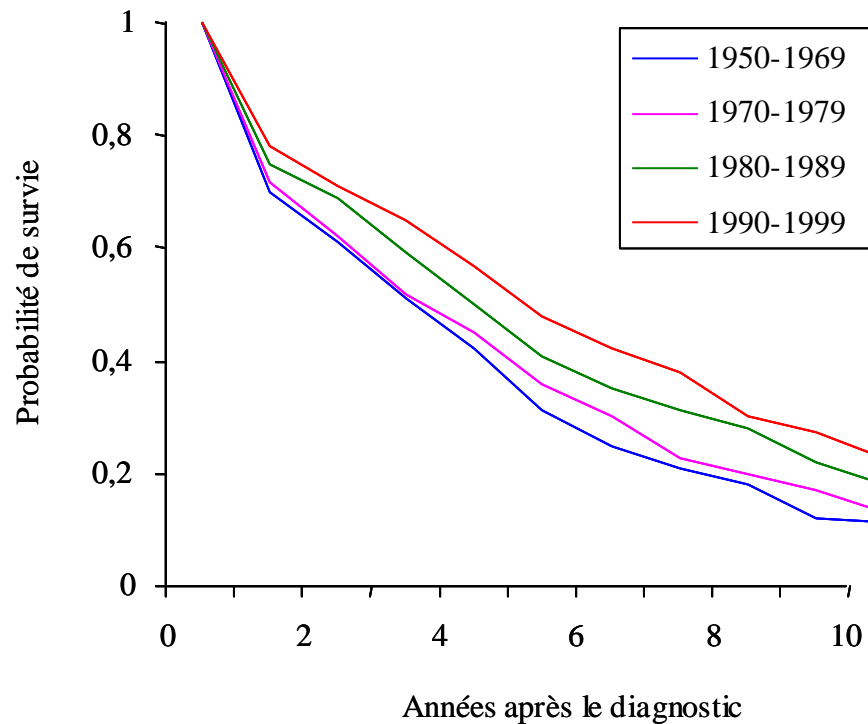


Figure 33 : Probabilité de survie en année après le diagnostic d'IC chez les hommes de l'étude de Framingham.

4.3 Biomarqueurs

Actuellement, les principaux biomarqueurs de l'IC sont le BNP et le fragment aminoterminal du proBNP, appelé NT-proBNP [Maisel *et al.* 2008]. Physiologiquement, le pré-proBNP, précurseur de cette voie, est synthétisé dans les cardiomyocytes sous forme inactive. Ce précurseur subira alors un premier clivage pour libérer dans les cardiomyocytes un peptide signal de 26 acides aminés ainsi que le proBNP qui est encore inactif. Ce proBNP sera à son tour clivé pour libérer dans le sang, le BNP et le fragment NT-proBNP, inactif, lors de modifications importantes du volume et des pressions ventriculaires [Maisel *et al.* 2008] (Figure 34).

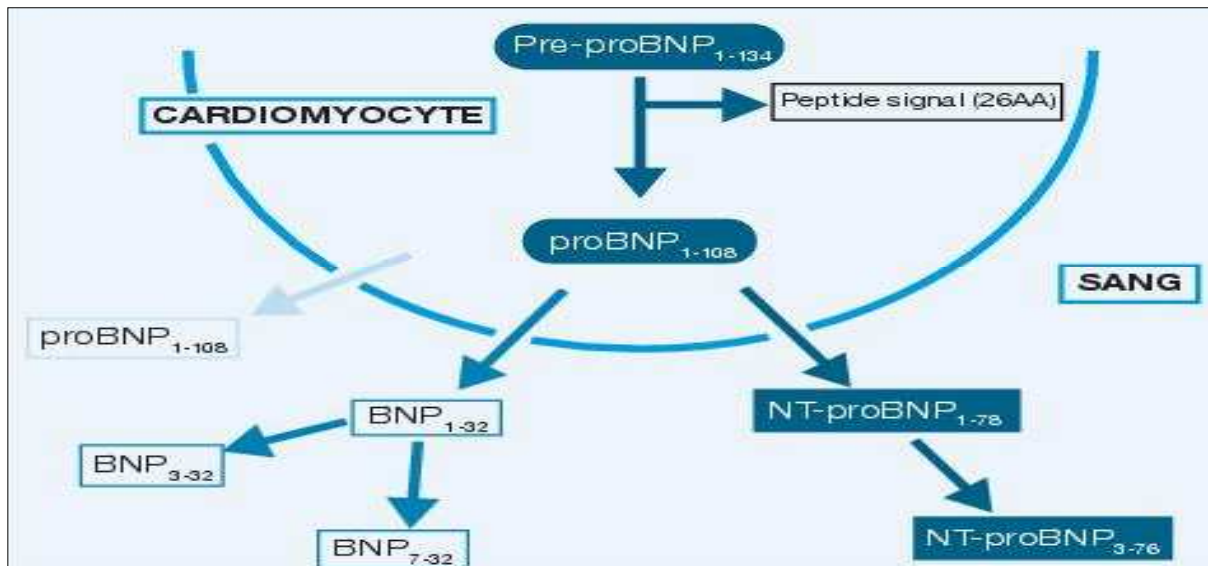


Figure 34 : Voie de synthèse du BNP et du NTproBNP.

Le BNP, ainsi libéré, induira une vasodilatation artérielle, notamment par inhibition du système rénine-angiotensine-aldostérone mais également les processus de diurèse et de natriurèse ainsi qu'une inhibition du système nerveux sympathique [Braunwald 2008].

Actuellement, si les troponines cardiaques sont considérées comme les meilleurs biomarqueurs de l'IDM, le BNP et le NT-proBNP sont quant à eux considérés comme les meilleurs biomarqueurs de l'IC [Maisel *et al.* 2008]. En effet, leur concentration sanguine augmente de manière considérable et proportionnelle à la gravité de l'IC (Figure 35).

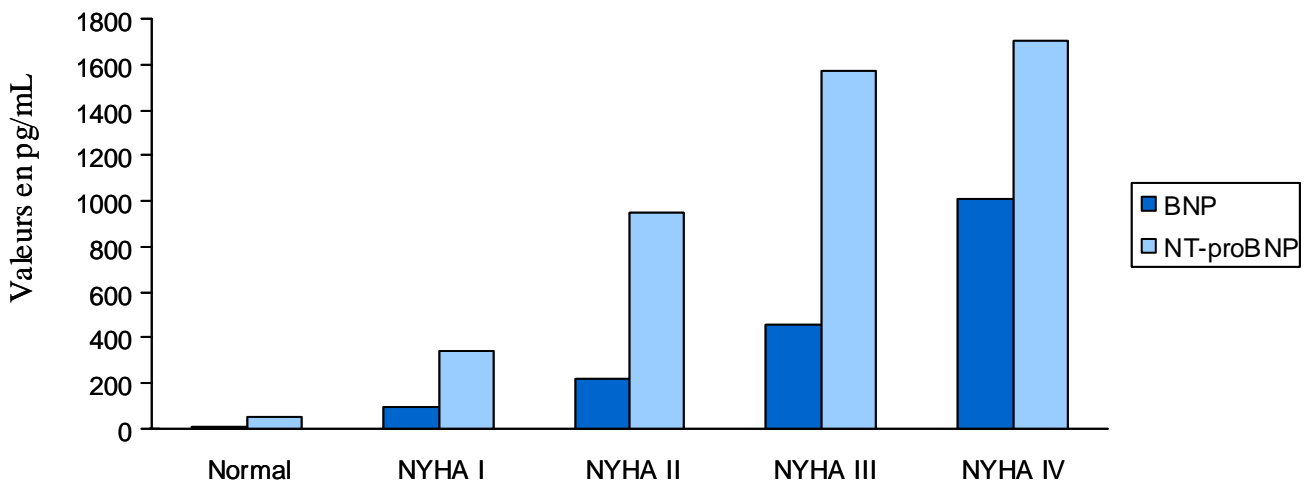


Figure 35 : Valeurs de détection du BNP et du NT-proBNP en fonction du stade NYHA de l'IC.

De plus, le BNP et le NT-proBNP possèdent des valeurs pronostiques et diagnostiques élevées [Maisel *et al.* 2005]. En effet, un taux de BNP supérieur à 100 pg/mL montre une sensibilité de 90% et une spécificité de 76% pour l'IC [Maisel *et al.* 2005]. Cependant, il ne s'agit pas de biomarqueurs parfaits puisque le taux de ces hormones peut être augmenté dans

de nombreuses pathologies qui peuvent être associées à l'IC, comme l'hypertension pulmonaire, l'insuffisance rénale ou l'obésité abdominale [Braunwald 2008].

Cependant, de nombreux biomarqueurs de l'IC, intervenant dans diverses étapes du processus physiopathologique sont actuellement décrits [Braunwald 2008]. Une liste non exhaustive des principaux biomarqueurs de l'IC connus à ce jour est présentée en Table IX.

Table IX : Caractéristiques des principaux biomarqueurs de l'IC.

Nom	Sensibilité	Spécificité	Pathologie	Avantages	Inconvénients	Références
Inflammation						
CRP	96%	29%	> 3 mg/dL	Corrélié à la sévérité de l'IC, et au stade NYHA Augmentation lors de dysfonction diastolique	Augmentation lors d'une infection, d'un tabagisme et d'un syndrome coronarien aiguë	Collinson, 2009 Lamblin <i>et al</i> , 2005
TNF α				Corrélié à la dysfonction ventriculaire gauche, aux stades NYHA et à la mortalité	Non utilisable en routine	Dinh <i>et al</i> , 2009
IL-6			50 pg/mL	Corrélié à la dysfonction ventriculaire gauche, aux stades NYHA et à la mortalité	Non utilisable en routine	Dinh <i>et al</i> , 2009 Ruiz-Ruiz <i>et al</i> , 2007
Stress oxydant						
Myéloperoxydase			432 pmol/L	Corrélié à la dysfonction ventriculaire gauche et à la mortalité	Non utilisable en routine	Tang <i>et al</i> , 2009
Remodelage de la matrice extra-cellulaire						
MMP-2	77%	40%	1445 ng/mL	Biomarqueur de la dysfonction diastolique	Non utilisable en routine	Martos <i>et al</i> , 2009
Procollagène de type I	77%	25%	204 μ g/L	Biomarqueur de la dysfonction diastolique	Non utilisable en routine	Martos <i>et al</i> , 2009
Procollagène de type III	77%	60%	3,7 μ g/L	Biomarqueur de la dysfonction diastolique	Non utilisable en routine	Martos <i>et al</i> , 2009
Neurohormones						
Norépinéphrine				Corréliée à la morbi-mortalité	Difficile en routine	Lee <i>et al</i> , 2005
Arginine vasopressine				Corréliée à la sévérité	Instable	Voors <i>et al</i> , 2009
Provasopressine	67,7%	82,5%	25,9 pmol/L	Très stable Facilement mesurable Biomarqueur pronostique	Corréliée à l'âge, la fonction rénale et l'exercice physique	Voors <i>et al</i> , 2009
Nécrose myocytaire						
Troponines cardiaques	83%	65%	> 0,02 ng/mL	Corrélié à la sévérité et à la mortalité	Corrélié à la fonction rénale	Latini <i>et al</i> , 2007
Acides gras				Corrélié au stade NYHA et à la mortalité	Non utilisable en routine	Lee <i>et al</i> , 2005
Stress myocytaire						
BNP	90%	96%	> 400 pg/mL	Bon biomarqueur diagnostique Corrélié à la mortalité	Augmentation en cas d'hypertension pulmonaire Corrélié à l'âge	de Lemos <i>et al</i> , 2004
NT-proBNP	93%	80%	> 2000 pmol/L	Meilleur que le BNP pour la prédiction de la mortalité et de la réhospitalisation Durée de vie longue Meilleur biomarqueur pronostique	Augmentation en cas d'insuffisance rénale Corrélié à l'âge	de Lemos <i>et al</i> , 2004

Les protéines de l'**inflammation** jouent un rôle important dans la physiopathologie et la progression de l'IC [Braunwald 2008]. En effet, les cytokines inflammatoires peuvent être associées à la dysfonction ventriculaire gauche, à la réexpression du programme fœtal ainsi qu'à l'hypertrophie et la nécrose des myocytes [Lee *et al.* 2005]. Parmi ces protéines, la CRP présente un intérêt particulier car son niveau augmente avec la sévérité de l'IC [Braunwald 2008]. Cette protéine possède des effets néfastes puisqu'elle va induire une diminution de la libération de NO associée à une augmentation de la production d'endothéline-1, conduisant à une vasoconstriction importante [Braunwald 2008]. Cependant, d'autres cytokines inflammatoires telles que le TNF α ou l'IL-6, sont également considérées comme des biomarqueurs potentiels de l'IC [Dinh *et al.* 2009].

Les protéines impliquées dans le **stress oxydant** sont également impliquées dans l'IC [Tsutsui *et al.* 2009]. Cependant, il est difficile de doser directement les ROS chez l'homme, c'est pourquoi l'utilisation de biomarqueurs indirects s'avère nécessaire [Braunwald 2008]. La mesure de la myéloperoxydase est notamment corrélée à la sévérité et à la mortalité de l'IC [Tang *et al.* 2009].

Les protéines impliquées dans le **remodelage de la matrice extracellulaire** telles que la MMP-2 ou les procollagènes de type I et III peuvent être utilisées comme biomarqueurs de l'IC avec fonction systolique préservée [Martos *et al.* 2009].

Les **neurohormones** peuvent aussi être utilisées comme biomarqueurs de l'IC. La norépinéphrine peut être corrélée à la mortalité par IC [Braunwald 2008]. Par ailleurs, l'arginine vasopressine ainsi que son précurseur plus stable, la provasopressine, peuvent être utilisées comme biomarqueurs pronostiques [Voors *et al.* 2009]. La synthèse de ce puissant vasoconstricteur est par ailleurs induite par l'angiotensine II.

Les marqueurs de la **nécrose myocytaire** jouent également un rôle important lors de l'IC puisqu'ils sont issus à la fois de l'ischémie myocardique lors de l'IDM mais également de l'inflammation, du stress oxydant et de l'activation neurohormonale qui intervient lors de ce processus [Braunwald 2008]. Le niveau des troponines cardiaques, ainsi que la mesure des acides gras cardiaques, peuvent notamment être corrélés à la mortalité [Braunwald 2008].

Cependant, en dehors de l'utilisation du BNP et du NT-proBNP, il n'existe pas de consensus quant à l'utilisation de ces biomarqueurs. Au vu de l'impact épidémiologique de l'IC, il semble donc indispensable de rechercher de nouveaux biomarqueurs tant diagnostiques que pronostiques de cette pathologie.

II) Recherche de biomarqueurs par analyse protéomique

Il existe trois grandes classes de biomarqueurs :

- les *biomarqueurs de dépistage* qui détectent les patients avant l'apparition des symptômes.
- les *biomarqueurs diagnostiques* pour identifier la pathologie.
- les *biomarqueurs pronostiques* pour suivre l'évolution de la pathologie et permettre une meilleure prise en charge des patients [Gerszten *et al.* 2008].

Actuellement, si des biomarqueurs diagnostiques et pronostiques sont disponibles pour les pathologies cardiovasculaires, il n'existe pas de biomarqueur capable de dépister de manière précoce les pathologies telles que l'athérosclérose à l'origine de l'IDM ou le RVG qui peut être à l'origine de l'IC [Gerszten *et al.* 2008].

Un biomarqueur doit répondre à trois critères essentiels qui sont [Braunwald 2008]:

- la possibilité d'obtenir des mesures rapides, reproductibles et à un prix permettant une utilisation courante dans la pratique clinique.
- la capacité à apporter une information supplémentaire non disponible par les moyens hospitaliers classiques.
- la capacité à fournir une aide au diagnostic ou au pronostic.

Les principaux biomarqueurs actuels ont été recherchés sur des bases physiopathologiques. Cependant, cette approche ne permet pas toujours de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs. En effet, dans le cadre de l'étude REVE-1 visant à mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs du RVG chez l'homme, une approche gène-candidat a été réalisée. Dans cette étude, le RVG est défini comme une augmentation supérieure à 20% du volume du VG mesurée en fin de diastole entre le niveau basal et à un an après l'IDM chez 93 patients [Savoye *et al.* 2006]. Cette approche porte sur les principaux systèmes décrits précédemment comme le système rénine-angiotensine-aldostérone, le système adrénergique et les MMP. De manière étonnante, aucun des polymorphismes étudiés ne semblent jouer un rôle dans le RVG [Bauters *et al.* 2007]. Une étude protéomique a par ailleurs été effectuée sur les patients de cette étude et a permis de mettre en évidence une augmentation des variants post-traductionnels de la chaîne $\alpha 1$ de l'haptoglobine chez les patients présentant un RVG comparés aux patients sans RVG [Pinet *et al.* 2008].

1 Choix de l'analyse protéomique

1.1 Définition

L'analyse protéomique se définit comme l'analyse quantitative et qualitative l'ensemble des protéines présentes dans un échantillon biologique obtenu dans des conditions bien définies à un temps donné, appelé le protéome [Pinet *et al.* 2007].

1.2 Intérêt

Le séquençage du génome humain en 2001 a mis en évidence environ 20 000 gènes codant pour plus d'un million de protéines, ce qui suggère que le génome d'un organisme ne reflète pas sa complexité [Lander *et al.* 2001] ; [Venter *et al.* 2001]. En effet, il est connu qu'un gène ne code pas pour une seule protéine mais pour plusieurs. Le nombre de protéines codées dépend des modifications post-transcriptionnelles, telles que l'épissage alternatif et des modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation ou la glycosylation (Figure 36).

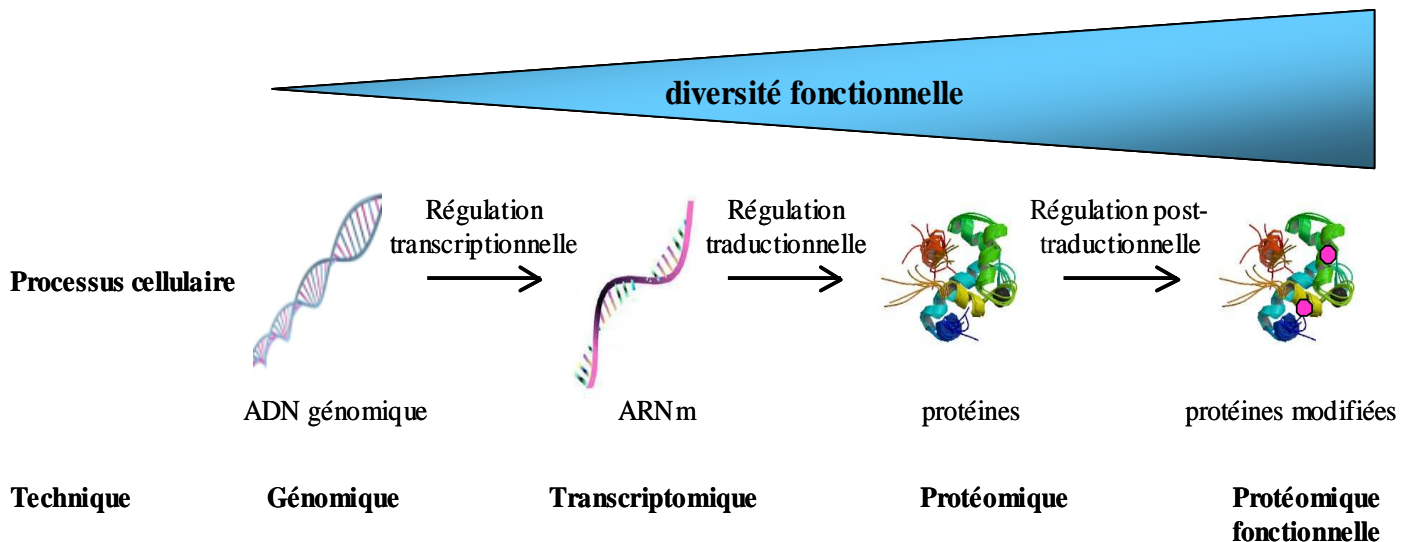


Figure 36 : Représentation schématique de la complexité biologique.

Il est donc nécessaire d'établir la recherche de biomarqueurs selon une approche sans *a priori* telles que la transcriptomique (analyse de l'ARN) ou la protéomique (analyse des protéines) ou la métabolomique (analyse des métabolites) qui devraient permettre d'élucider le rôle fonctionnel de plusieurs gènes, ou produits de gènes, pour comprendre le phénotype lié à une maladie ou à un état sain [Pinet *et al.* 2007].

L'analyse protéomique permet à la fois d'étudier un grand nombre de protéines d'un échantillon mais également leurs modifications post-traductionnelles afin d'accéder à la réalité cellulaire ainsi qu'à la modulation de la fonctionnalité de ces protéines [Arrell *et al.*

2001b]. De plus, cette technique permet de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs potentiels d'une pathologie et d'obtenir des informations sur le protéome des différents organites cellulaires, notamment les mitochondries ou les myofilaments [Mayr *et al.* 2006]. Enfin, les protéines sont impliquées dans tous les processus cellulaires et sont modifiées dans les conditions pathologiques, justifiant l'intérêt de leurs études [Arrell *et al.* 2001b].

1.3 Outils

L'approche protéomique classique combine une technique de fractionnement de l'échantillon, telle que l'électrophorèse bidimensionnelle (2D), afin de séparer et de visualiser les protéines d'un échantillon et de quantifier le niveau d'expression de ces protéines et la spectrométrie de masse afin de les identifier [Ong *et al.* 2001]. Néanmoins, elle nécessite la validation ultérieure des résultats obtenus par des approches classiques de western blot ou de dosage ELISA.

1.3.1 Électrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse 2D permet de séparer les protéines d'un échantillon à la fois en fonction de leur point isoélectrique (pI) lors de l'étape d'isoélectrofocalisation (IEF) et de leur poids moléculaire (Mr) lors de la seconde dimension (SDS-PAGE). Cette technique présente également l'avantage de mettre en évidence plusieurs isoformes de la même protéine [Lescuyer *et al.* 2004]. De plus, il s'agit d'une technique reproductible permettant de quantifier le niveau d'expression des protéines.

1.3.1.1 *Isoélectrofocalisation*

Pour cette étape, l'échantillon protéique est déposé sur un gel de polyacrylamide contenant un gradient de pH stable établi par des immobilines qui copolymérisent avec l'acrylamide dans le gel d'IEF. Le gel de polyacrylamide utilisé présente une forte porosité pour que la taille des protéines n'influence pas leur migration. Le gradient d'immobilines présente de nombreux avantages tels qu'une bonne stabilité au cours du temps, une meilleure reproductibilité, une grande capacité de chargement en protéines et enfin la possibilité d'obtenir des gradients de pH très étroits sur une ou deux unités [Dutt *et al.* 2000].

Les protéines sont des molécules amphotères, c'est-à-dire qu'elles peuvent être chargées positivement, négativement ou avoir une charge neutre selon le pH de la solution dans laquelle elles se trouvent. Sous l'effet d'un champ électrique, les protéines vont migrer dans le gel jusqu'à leur pI qui correspond au pH pour lequel leur charge nette est nulle. Pour cette

étape, les paramètres de migration sont optimisés en fonction de l'échantillon à analyser. L'étape d'IEF est représentée schématiquement en Figure 37.

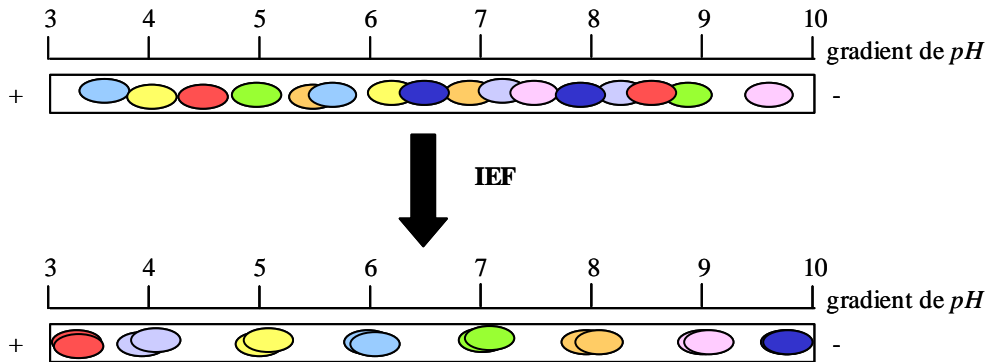


Figure 37 : Représentation schématique de l'étape d'IEF.

1.3.1.2 Seconde dimension ou SDS-PAGE

Le gel d'IEF est ensuite déposé au sommet d'un gel de polyacrylamide avec une réticulation plus ou moins importante permettant la séparation des protéines de l'échantillon en fonction de leur M_r sous l'effet d'un champ électrique. Cette technique permet de séparer de façon résolutive jusqu'à 3000 protéines [Faber *et al.* 2006]. La migration en gel SDS-PAGE est représentée schématiquement en Figure 38.

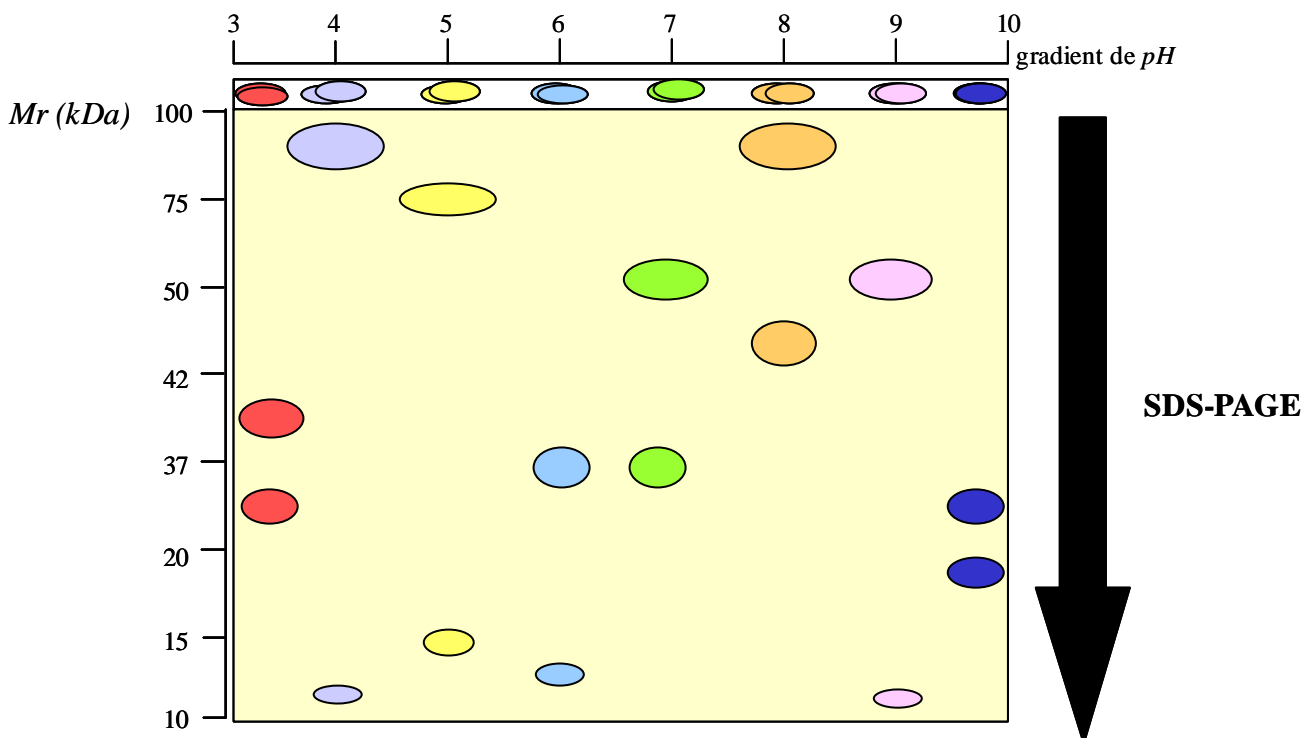


Figure 38 : Représentation schématique de la SDS-PAGE.

1.3.1.3 Détection des spots polypeptidiques

Différentes techniques de révélation non spécifiques des protéines sur gel de polyacrylamide peuvent être utilisées (Tableau X).

Table X : Les différentes techniques de coloration d'un gel de polyacrylamide.

<i>Technique de coloration</i>	<i>Détection</i>	<i>Avantages</i>	<i>Inconvénients</i>
<i>Pro-Q®Diamond</i>		Compatible avec la spectrométrie de masse	Relativement coûteuse Faible sensibilité
<i>Pro-Q®Emerald</i> <i>Sypro®Ruby</i>	fluorescence	Compatible avec la spectrométrie de masse Compatible avec la spectrométrie de masse	Relativement coûteuse Relativement coûteuse
<i>2D-DIGE</i>		Compatible avec la spectrométrie de masse Analyse bioinformatique facilitée	Relativement coûteuse
<i>Nitrate d'argent</i>		Plus sensible que le bleu colloïdal	Relativement coûteuse Linéaire sur un log
<i>Bleu colloïdal</i>	visible	Compatible avec la spectrométrie de masse Economique	Moins sensible que le nitrate d'argent

Le choix de la coloration se fait essentiellement en fonction de l'utilisation ultérieure des gels d'électrophorèse 2D. Les propriétés les plus importantes du colorant sont sa sensibilité (seuil limite de détection), une échelle dynamique linéaire pour une quantification précise, sa reproductibilité et sa compatibilité avec les étapes d'identification par spectrométrie de masse (MS).

En général, elles font appel à l'emploi de colorants tels que des sels d'argent (technique très sensible), une solution de bleu colloïdal (de plus faible sensibilité), des sondes fluorescentes telles que le Sypro®Ruby (Sypro®Ruby Protein Gel Stain Molecular Probes™) ou le marquage par des cyanines utilisé pour la technique de 2D DIGE (très sensible mais plus coûteuse) [Rabilloud 2000].

Certains marquages permettent également de visualiser des catégories spécifiques de protéines telles que la coloration au Pro-Q®Diamond (Pro-Q®Diamond Phosphoprotein Gel Stain, Molecular Probes™) qui permet de détecter les protéines phosphorylées ou la coloration au Pro-Q®Emerald qui permet de détecter les glycoprotéines. De manière intéressante, la technologie du Pro-Q®Diamond nous offre la possibilité de détecter et de quantifier les protéines contenant des phospho-sérines, -thréonines ou -tyrosines puisque ce colorant fluorescent ne révèle que les phosphoprotéines, sans détecter les autres macromolécules telles que l'ADN, l'ARN ou encore les glycanes sulfatés [Steinberg *et al.* 2003]. De plus, cette technique est rapide, simple à mettre en œuvre, reproductible, réversible et compatible avec d'autres technologies telles que la spectrométrie de masse. Cependant, la sensibilité de cette technique reste faible et nécessite une quantité importante d'échantillons.

Au vu de ses propriétés, j'ai principalement utilisé cette technique de coloration, couplée à la détection des protéines totales par coloration au Sypro®Ruby, au cours de ma thèse.

1.3.1.4 Analyse bioinformatique

L'analyse bioinformatique joue un rôle central lors de l'analyse protéomique. Dans une expérience classique de protéomique utilisant l'électrophorèse 2D, de nombreux gels d'échantillons contrôles et expérimentaux sont réalisés en parallèle. Dans un premier temps, les gels 2D obtenus sont numérisés et des analyses différentielles entre les images des gels d'électrophorèse 2D contrôles et expérimentaux sont réalisées en utilisant un des nombreux logiciels spécialisés de traitement d'images disponibles sur le marché. Quelque soit le logiciel utilisé et son niveau de sophistication, une part active de l'utilisateur reste indispensable puisque aucun de ces logiciels ne permet une analyse d'images complètement automatique.

Au cours de ma thèse, j'ai effectué une analyse du phosphoprotéome du VG de rats témoins et IC. Pour cela, des électrophorèses 2D ont été effectuées et colorées au Pro-Q®Diamond dans le but de détecter les protéines phosphorylées puis au Sypro®Ruby afin de détecter l'ensemble des protéines. L'analyse bioinformatique des gels d'électrophorèse 2D a été effectuée avec le logiciel d'analyse d'images 2D Platinum®6.0 (GE Healthcare) selon un modèle classique d'analyse.

Dans un premier temps, la détection automatique de tous les spots polypeptidiques de chaque gel s'effectue grâce à trois paramètres : le *smooth* qui modifie le contour du spot polypeptidique, l'*aera* représentative de l'aire du spot polypeptidique et le *saliency* représentatif du bruit de fond. Les spots détectés par le logiciel, et ne correspondant pas à des spots polypeptidiques, sont ensuite éliminés manuellement. Une dizaine de points d'ancrage sont alors placés manuellement sur chacun des gels colorés au Pro-Q®Diamond (*master gel*). L'appariement entre les *master gels* et les images des gels colorés au Sypro®Ruby s'effectue automatiquement grâce à ces points d'ancrage. L'appariement de chaque spot polypeptidique détecté sur le gel coloré au Pro-Q®Diamond avec le même spot polypeptidique détecté sur le gel coloré au Sypro®Ruby est ensuite vérifié manuellement pour tous les gels inclus dans l'analyse. Le volume de chaque spot polypeptidique est ensuite quantifié et normalisé par rapport au volume de l'ensemble des spots polypeptidiques détectés sur la même image du gel. Le pourcentage du volume normalisé (%vol) d'un spot polypeptidique détecté au Pro-Q®Diamond est rapporté au %vol du même spot polypeptidique détecté au Sypro®Ruby. Pour chaque spot polypeptidique, le ratio %vol Pro-Q / %vol Sypro est calculé. Ce ratio est ensuite comparé entre les animaux témoins et IC. Une représentation schématique des

différentes étapes composant l'analyse bioinformatique est présentée en Figure 39.

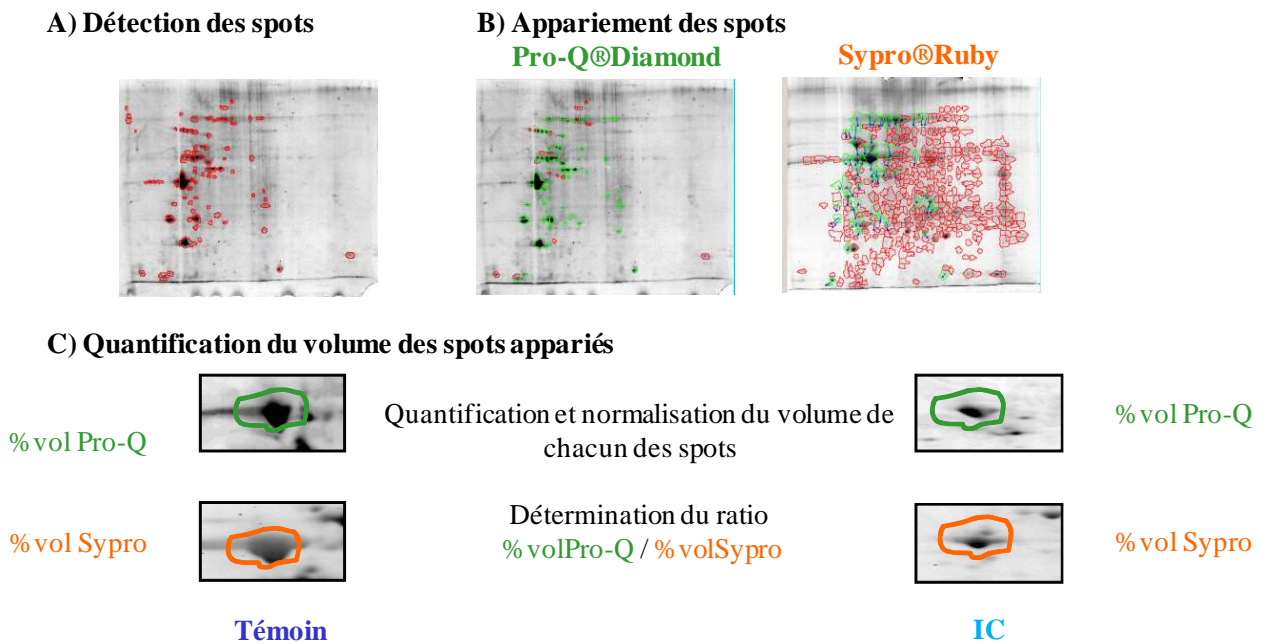


Figure 39 : Représentation schématique des différentes étapes de l'analyse bioinformatique.

1.3.2. Spectrométrie de masse

Suite à l'analyse bioinformatique, les spots polypeptidiques d'intérêt sélectionnés sont identifiés en spectrométrie de masse. Il s'agit d'une technique analytique qui utilise la mesure du rapport masse sur charge (m/z) des différents peptides issus de la même protéine pour identifier cette dernière. Pour cela, les spots polypeptidiques d'intérêt sont découpés sur un gel d'électrophorèse 2D et digérés afin d'obtenir des peptides de petites tailles compatibles avec cette technique. La trypsine est l'enzyme la plus couramment utilisée car elles possèdent des sites de clivages connus (extrémité C-terminal des lysines et des arginines). De plus, les peptides issus de la digestion par cette enzyme sont répertoriés dans les bases de données.

L'avantage de cette approche est que l'élution de peptides digérés est plus facile que celle de protéines entières. De plus, les petites molécules, tels que les peptides, seront séparées de façon plus efficace lors de la spectrométrie de masse, permettant une identification plus fiable.

Il existe deux techniques principales de spectrométrie de masse permettant l'analyse des protéines, les spectromètres de masse utilisant la source électrospray et les MALDI-TOF (Ionisation/Désorption par tir laser assisté par matrice et mesure du temps de vol) [Dutt *et al.* 2000]. Dans le cadre de ma thèse, j'ai uniquement utilisé cette dernière technique qui vous sera présentée.

1.3.2.1. MALDI-TOF

Pour cette technique, l'empreinte peptidique (correspondant aux rapports m/z des différents peptides issus de la digestion d'une protéine) est obtenue par spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode positif. Le principe est d'irradier par un faisceau laser pulsé les peptides d'un échantillon co-cristallisé dans une matrice, à la surface d'une cible. La matrice permet d'éviter la dégradation de l'échantillon par le faisceau laser et a la propriété d'absorber l'énergie émise par ce faisceau, ce qui conduira à l'excitation de la matrice. Celle-ci va alors transférer son énergie aux molécules de l'échantillon, induisant l'ionisation des peptides digérés. Dans le cas d'une source MALDI, les ions formés seront généralement monochargés, principalement de type $[M+H]^+$. Les ions formés seront désorbés et seront séparés dans l'analyseur TOF en fonction de leur temps de vol, inversement proportionnel à leur masse : les ions les plus légers sont accélérés davantage que les ions plus lourds et sont par conséquent détectés les premiers. Une fois l'acquisition des spectres effectuée, ces derniers sont traités informatiquement à l'aide du logiciel Data ExplorerTM (PerSeptive Biosystems).

L'identification des protéines est réalisée grâce à leur empreinte peptidique en utilisant les moteurs de recherche Protein Prospector, ProFound et Mascot à la fois dans les banques de données NCBI et Swiss-Prot. L'espèce, l'empreinte peptidique, la M_r et le pI apparents, l'enzyme utilisée ainsi que le nombre de clivages manquants autorisés sont utilisés pour interroger les banques de données. Une modification des cystéines par l'acrylamide appelée carbamidométhylation ainsi qu'une possible oxydation des méthionines sont également des critères pris en compte pour l'identification. Enfin, nous admettons une erreur de masse de 0.05 Da pour le rapport m/z des peptides ionisés. Les différentes étapes nécessaires à l'identification d'une protéine en MALDI-TOF sont représentées schématiquement en Figure 40.

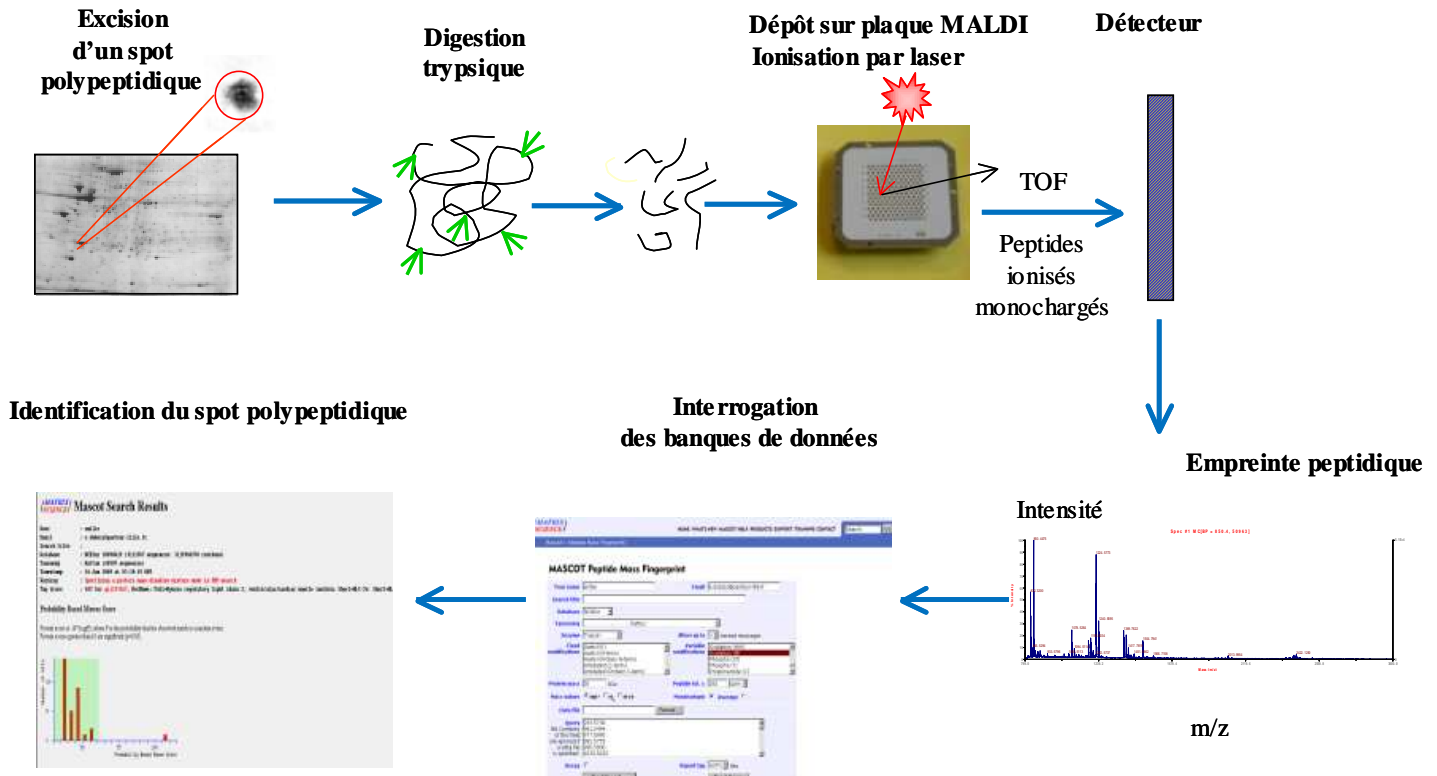


Figure 40 : Représentation schématique des différentes étapes de l'analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF.

A l'issue de l'interrogation des banques de données plusieurs candidats peuvent être possibles. Pour considérer une identification exacte selon les critères recommandés par [Wilkins *et al.* 2006] :

- la protéine doit obtenir un score de probabilité élevé (score > 70 pour Mascot).
- la même protéine doit être obtenue en tête de liste par au moins deux moteurs de recherche différents.
- au moins quatre peptides du spectre MALDI doivent avoir permis l'identification.
- le pourcentage de recouvrement de séquence doit être supérieur à 15%.
- la M_r théorique doit correspondre à la M_r expérimentale $\pm 20\%$ et il y a moins d'une unité de pH entre le pI théorique et le pI expérimental.

1.3.2.2. MALDI-TOF/TOF

Parfois les résultats obtenus à partir de l'empreinte peptidique sont ambigus. Pour identifier la protéine d'intérêt, il est possible d'utiliser un spectromètre de masse en mode tandem. Cette technique consiste à sélectionner, dans un premier analyseur de masse, un à un les peptides provenant de la digestion par la trypsine de la protéine étudiée. Chaque peptide est alors fragmenté dans une chambre de collision, principalement à l'aide de gaz neutre de

type argon. Les “ions fils” générés sont ensuite analysés dans un second analyseur. L’analyse de ces fragments (spectre MS/MS) permet par calcul de la différence de masse observée entre deux ions de la même série, de déterminer des éléments de la séquence en acides aminés du peptide, séquence qui sera utilisée pour identifier la protéine dans les banques de données. Les différentes étapes nécessaires à l’identification d’une protéine en MALDI-TOF/TOF sont représentées schématiquement en Figure 41.

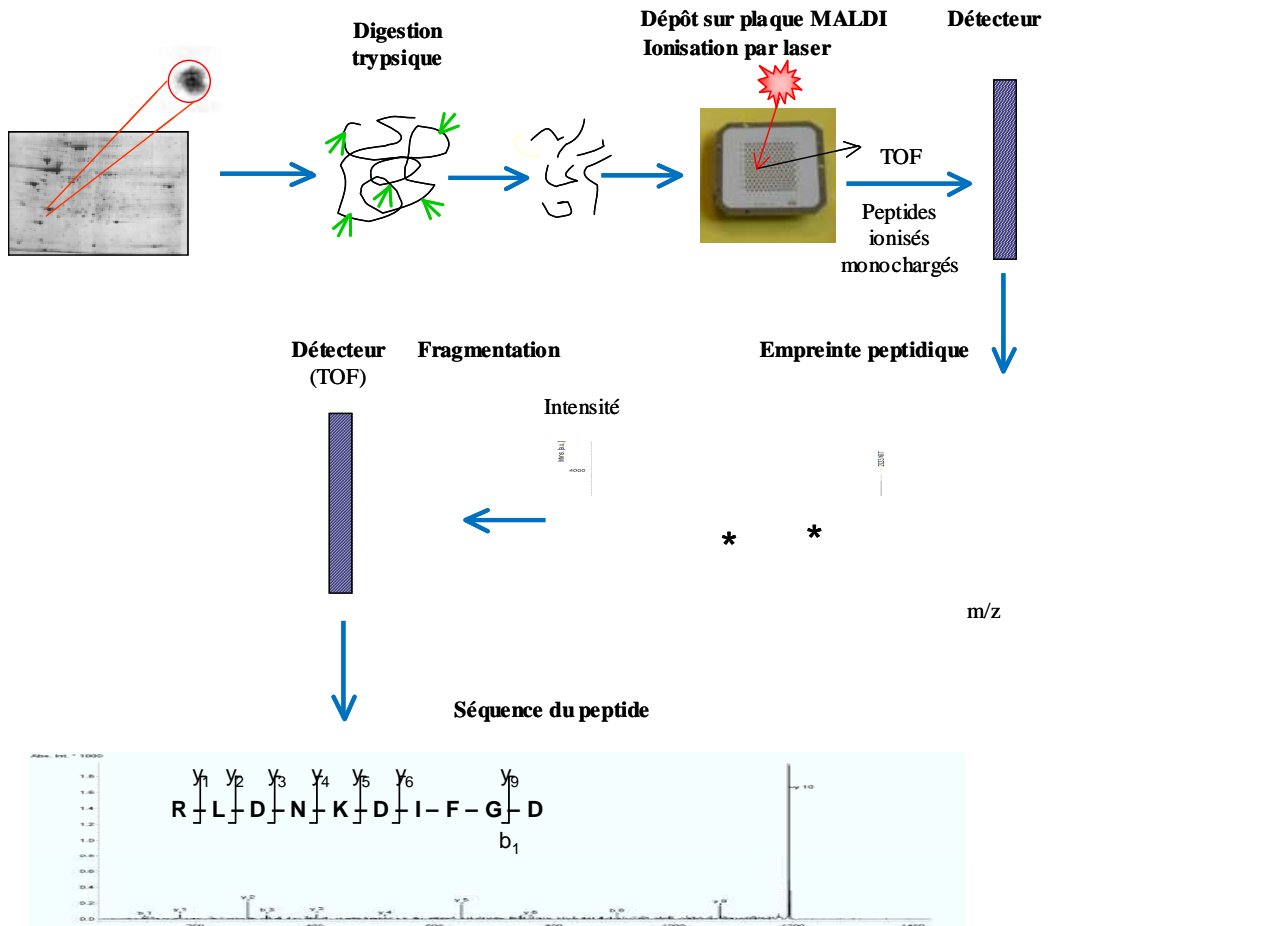


Figure 41 : Représentation schématique des différentes étapes de l’analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF.

Toutefois, l’interprétation des spectres MS/MS ne permet de déterminer, en général, qu’une séquence partielle du peptide analysé ; cette dernière, complétée à la fois par la mesure de la masse du peptide et la position de cette séquence sur le peptide constitue un *Peptide Sequence Tag* qui permet de sonder avec une grande efficacité les banques protéiques.

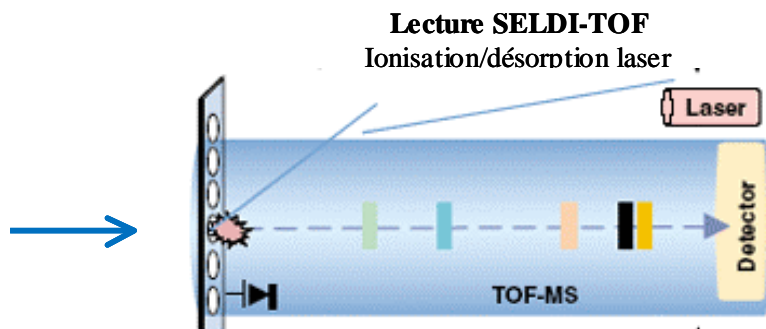
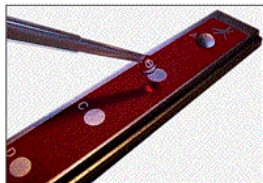
1.3.3. SELDI-TOF

La technique d’électrophorèse 2D possède certaines limites. En effet, les protéines avec un *pI* ou un *Mr* extrêmes de même que les protéines hydrophobes telles que les protéines membranaires ne sont pas séparées correctement ou non visualisables par cette technique

[Lescuyer *et al.* 2004]. Il est donc important d'utiliser des techniques protéomiques complémentaires afin d'avoir accès à un plus grand nombre d'information.

La technique de SELDI-TOF (*Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization*), commercialisée par Biorad, est une alternative complémentaire à l'électrophorèse 2D qui combine la chromatographie et la spectrométrie de masse [Pinet *et al.* 2008]. Les éléments clés de ce dispositif sont les puces à protéines (*ProteinChips®*) qui se présentent sous la forme de barrettes sur lesquelles sont alignés huit sites actifs. Ces sites actifs peuvent être constitués de surfaces très variées, tant sur le plan chimique (surfaces anioniques Q10, cationiques CM10, hydrophobes H50 ou hydrophiles NP20) que biologique (anticorps, récepteurs ou ADN) permettant l'adhésion spécifique des protéines d'intérêt présentes dans un échantillon biologique [Pinet *et al.* 2007]. Pour réaliser cette capture, un extrait protéique brut est déposé sur chaque site actif et couplé à une matrice qui permettra l'ionisation des protéines sous l'impact du faisceau laser. La puce à protéines est ensuite insérée dans un lecteur SELDI-TOF qui va générer un profil caractérisé par l'inventaire des masses moléculaires des protéines présentes dans l'échantillon et capturées par la puce en fonction de leur abondance relative (Figure 42).

Dépôt de l'échantillon sur une puce à protéines



Analyse des spectre SELDI

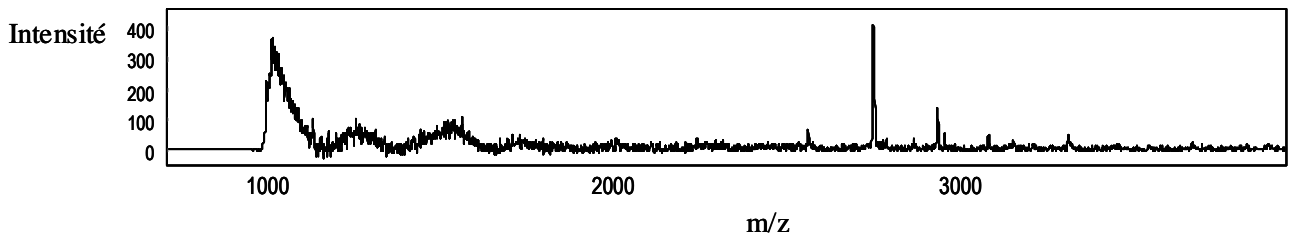


Figure 42 : Représentation schématique des différentes étapes de l'analyse en SELDI -TOF.

La comparaison des profils d'expression de protéines obtenus sur les différents sites actifs est ensuite réalisée à l'aide du logiciel *ProteinChip® data manager* fourni avec le système, afin de pointer les pics protéiques différentiellement exprimés dans les échantillons.

Cette technique présente de nombreux avantages, notamment sa rapidité et sa compatibilité avec pratiquement tous les types d'échantillons biologiques. De plus, elle nécessite peu de matériel biologique, sa sensibilité est relativement importante et elle permet l'étude des protéines hydrophobes, membranaires ou avec des *pI* et des *Mr* extrêmes. Cependant, elle est relativement coûteuse, sa variabilité est assez importante et elle ne permet pas d'identification biologique directe des marqueurs puisque les pics mis en évidence comme différentiellement exprimés nécessitent d'être ensuite identifiés en spectrométrie de masse.

1.4 Applications en pathologie cardiovasculaire

Actuellement, les techniques de protéomique ont permis de mettre en évidence un certain nombre de biomarqueurs potentiels dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires. Par ailleurs, il n'existe pas à l'heure actuelle de biomarqueurs permettant de prédire l'évolution d'un IDM vers le RVG et l'IC. Des études protéomiques ont alors été mises en œuvre afin de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs de cette pathologie. Un nombre important de protéines a ainsi été mis en évidence comme biomarqueur potentiel de l'IC. Cependant, ces protéines ne sont pas utilisées en clinique à l'heure actuelle car les principaux résultats sont encore très récents. En effet, la mise en place d'une analyse protéomique complète et les validations nécessaires à cette analyse nécessitent un temps non négligeable. Malgré tout, ces différentes analyses ont permis de mettre en avant de nombreuses pistes dont les principales sont présentées en Table XI..

Table XI : Biomarqueurs potentiels de l'IC mis en évidence par analyse protéomique (issue de Dubois, en annexe).

Références	Protéines étudiées	Échantillons utilisés	Résultats obtenus	Techniques utilisées
Scheler <i>et al</i> , 1999	Hsp27	VG humains sains (n=7) et IC dus à cardiomyopathie dilatée (n=6) ou IC ischémique (n=5)	Dégradation de la Hsp27 lors de l'IC	Électrophorèse 2D et immunoblot avec un anticorps dirigé spécifiquement contre Hsp27
Agnetti <i>et al</i> , 2008	Desmine	Cardiomyocytes néonataux traités à l'endothéline-1 pendant 48 h	Augmentation du niveau d'expression de la desmine et de l' α B-crystalline après traitement à l'endothéline-1	Électrophorèse 2D
	αB-crystalline		Diminution du niveau d'expression de la Hsp 60 et de la Grp 75 après traitement à l'endothéline-1	
	Hsp 60			
Cieniewski-Bernard <i>et al</i> , 2008	Grp75			
	Glycéraldehyde-3-phosphate déshydrogénase αB-crystalline Péroxirédoxine 2 Isocitrate déshydrogénase	VG de rats témoins (n=4) et IC (n=4) à 2 mois post-ligature de l'artère coronaire gauche	Modulation d'expression proportionnelle à la sévérité de l'IC	Électrophorèse 2D et western blot pour validation
Pinet <i>et al</i> , 2008	Variants post-traductionnels de la chaîne α1 de l'haptoglobine	Plasma de 93 patients présentant un IDM divisé en tertiles pour le RVG (REVE)	Augmentation du niveau d'expression des variants post-traductionnels de l'haptoglobine	SELDI-TOF Western blot pour validation
Jacquet <i>et al</i> , 2009	Protéine C cardiaque et son produit de dégradation de 40 kDa	Effluent de cœur perfusé isolé de souris avec une ischémie/reperfusion (n=4) et saines (n=3)	Augmentation du niveau d'expression de la protéine C cardiaque et d'un produit de dégradation de 40 kDa	2D-DIGE Western blot pour validation
Urbonavicius <i>et al</i> , 2009	Enzymes impliquées dans le métabolisme	Biopsies of de patients IC stables lors d'un <i>bypass</i> coronaire (n=9) comparées à du myocarde sain (n=5)	Augmentation du niveau d'expression de deux enzymes du métabolisme et diminution du niveau d'expression de six enzymes du métabolisme lors de l'IC	Électrophorèse 2D

Table XI (suite)

Références	Protéines étudiées	Échantillons utilisés	Résultats obtenus	Techniques utilisées
Wei <i>et al</i> , 2009	Hsp70	Patients avec une cardiomyopathie de l'OD (n=8) et patients sains (n= 8)	Augmentation du niveau d'expression de la Hsp 70 lors de l'IC	Électrophorèse 2D Western blot, immunohistochimie et ELISA pour validation
Agnetti <i>et al</i> , 2010	31 protéines mitochondriales	Mitochondries isolées de VG de chiens IC avec une désynchronisation VG de rats témoins (n=4) et IC (n=4) à 2 mois post-ligature de l'artère coronaire gauche	Diminution du métabolisme lors de l'IC	Électrophorèse 2D
Dubois <i>et al</i> , 2010	Troponine T phosphorylée en sérine²⁰⁷	Validation dans VG et plasma des rats témoins (n=16) et IC (n=19) Validation dans 93 patients présentant un IDM divisé en tertiles pour le RVG (REVE)	Diminution du niveau de troponine T phosphorylée en sérine ²⁰⁷ lors du RVG	Électrophorèse 2D colorée au Pro-Q®Diamond et western blot pour validation
Fertin <i>et al</i> , 2010	peptide N-terminal (24-48 aa) de l'albumine clivée par la pepsine 19 autres pics	4 échantillons de plasma et de sérum de 45 patients présentant un IDM divisé en tertiles pour le RVG (REVE 2)	Diminution du niveau d'expression du peptide N-terminal de l'albumine	SELDI-TOF
	MMP-7	VG de patients IC (n=8) et de patients sains (n=8)	Augmentation du niveau d'expression de la MMP-7 lors de l'IC	Puce à protéines
Wei <i>et al</i> , 2010	MMP-10	Cohorte de 34 patients IC sévère pour validation	Augmentation du niveau d'expression de la MMP-10 lors de l'IC	Western blot, immunohistochimie et ELISA pour validation
	TIMP-4		Diminution du niveau d'expression de TIMP-4 lors de l'IC	

2 Limites de l'analyse protéomique

2.1 Choix des échantillons

Le choix des échantillons est une étape clé de l'analyse protéomique car les extraits protéiques analysables par approche protéomique sont très variés. [Mischak *et al.* 2007]. Les différents échantillons biologiques utilisés pour l'analyse protéomique dans le cadre des pathologies cardiovasculaires sont présentés dans la Table XII.

Table XII : Les différents échantillons biologiques utilisés pour l'analyse protéomique cardiovasculaire (issue de Dubois, en annexe).

Échantillons biologiques	Espèces	
	Homme	Rat
<i>Tissu cardiaque</i>	+/-	+
<i>Cellules</i>		
Cardiomyocytes	+/-	+
Cellules endothéliales	+/-	+
Cellules musculaires lisses	+/-	+
<i>Organelles</i>		
Mitochondries	-	+
Sarcomères	-	+
<i>Fluides</i>		
Sérum	+	+
Plasma	+	+
Urine	+	+

Dans le domaine cardiovasculaire, la question du type d'échantillons biologiques à analyser se pose. En effet, travailler au niveau tissulaire, notamment sur le VG ou l'aorte, s'avère intéressant en sachant qu'un tissu est composé de plusieurs types cellulaires différents et que les informations obtenues, notamment par électrophorèse 2D, représenteront les protéines majoritaires. La question du type cellulaire le plus approprié peut alors se poser. Enfin, le plasma et le sérum représentent des échantillons biologiques simples d'accès, notamment dans le cadre de la recherche de biomarqueurs. Dans ce cas, une technique permettant de réduire la complexité de l'échantillon devra être mise en œuvre. En effet, lors de l'analyse du plasma ou du sérum, les protéines abondantes telles que l'albumine, représentant 60 à 70% des protéines totales, et les immunoglobulines, représentant 10 à 20% des protéines totales, peuvent gêner la détection des protéines peu représentées. Ces protéines majoritaires doivent alors soit être éliminées de manière spécifique par l'utilisation de kits commercialisés permettant l'élimination de l'albumine et des immunoglobulines, soit être

équalisées, afin d'enrichir l'échantillon en protéines peu abondantes [Fertin *et al.* 2010a], [Beseme *et al.* 2010].

Dans tous les cas, une conservation optimale des échantillons biologiques et des extraits protéiques est nécessaire pour garantir une analyse protéomique correcte ainsi qu'une optimisation de l'étape d'extraction protéique pour obtenir une bonne reproductibilité de cette technique indispensable à l'analyse protéomique. En effet, de nombreux biais peuvent être involontairement induit lors de l'extraction protéique et il est nécessaire de s'en affranchir. Une étude récente a notamment montré que l'utilisation de DNase I lors de l'extraction des protéines de macrophages en culture induisait un biais en interagissant directement avec l'actine du cytosquelette [Acosta-Martin *et al.* 2009]. Par ailleurs, il sera nécessaire d'inhiber certains processus pouvant engendrer des modifications des protéines, tels que l'action des protéases ou des phosphatases.

2.2 Difficulté de l'analyse chez l'homme

Lors de la mise en place d'études cliniques, il est essentiel de standardiser le protocole de prélèvement sanguin des patients et de conservation des échantillons. En effet, le fait de ne pas manipuler de manière standardisée tous les échantillons d'une même analyse peut conduire à l'identification de marqueurs biologiques erronés [Pinet *et al.* 2007]. Le temps entre le prélèvement et l'obtention du sérum par coagulation ainsi que la composition du tube de prélèvement s'avèrent notamment être des éléments importants à prendre en compte. Différents profils du même échantillon de plasma peuvent ainsi être observés en fonction de l'anticoagulant utilisé (EDTA, citrate ou héparine) [Banks *et al.* 2005].

Par ailleurs, des études à grande échelle sont nécessaires puisque l'effet prédictif peut parfois être relativement faible [Gerszten *et al.* 2008]. De plus, cet effet peut être diminué par l'hétérogénéité importante observée dans les échantillons obtenus chez l'homme.

2.3 Choix du modèle expérimental

L'étude du RVG post-IDM conduisant à l'IC nécessite l'utilisation de modèles animaux viables permettant de quantifier la dysfonction du VG afin d'étudier la physiopathologie de l'IC et de développer de nouvelles approches thérapeutiques de cette pathologie [Patten *et al.* 2009]. Dans un premier temps, les principaux modèles expérimentaux d'IC ont été développés chez le petit animal en raison de coûts réduits et de la possibilité d'obtenir un grand nombre d'animaux (Table XIII).

Table XIII : Les principaux modèles expérimentaux d'IC développés chez le petit animal (issu de [Patten *et al.* 2009]).

Espèce	Modèle	Cause de l'IC	Avantages	Inconvénients
Rat	Ligature de l'artère coronaire gauche	IDM	Technique chirurgicale plus facile que chez la souris Accès à la fonction cardiaque Obtention de tissu cardiaque	Pas de modèle transgénique Résultats pas toujours reproduits dans les études cliniques
	Constriction de l'aorte ascendante	Surcharge de pression graduelle	Hypertension graduelle Accès à la fonction cardiaque Obtention de tissu cardiaque	Pas de modèle transgénique Résultats pas toujours reproduits dans les études cliniques
	Rat Dahl salt-sensitive	Surcharge de pression chronique	Pas de chirurgie IC induite graduellement	Coût élevé du à la longue période de développement de l'IC
	Rat spontanément hypertendu	Surcharge de pression chronique	Pas de chirurgie IC induite graduellement	Coût élevé du à la longue période de développement de l'IC
Souris	Ligature de l'artère coronaire gauche	IDM	Coût inférieur aux rats Accès à la fonction cardiaque Existence de modèle transgénique	Chirurgie plus complexe que pour le rat Quantité de tissu plus faible
	Constriction de l'aorte ascendante	Surcharge de pression aigüe	Développement rapide d'une hypertrophie	Hypertension non graduelle
	Souris inactivée pour lim	Cardiomyopathie dilatée	Pas de chirurgie	Coût élevé du à la longue période de développement de l'IC
	Souris inactivée pour le TNF α	Cardiomyopathie dilatée	Pas de chirurgie	Effets secondaires importants

Afin d'étudier le RVG post-IDM, nous avons utilisé, au cours de ma thèse, le modèle expérimental d'IC de rat chez lequel un IDM est induit par ligature de la branche descendante de l'artère coronaire gauche (ACG) [Mulder *et al.* 1997] (Figure 43).

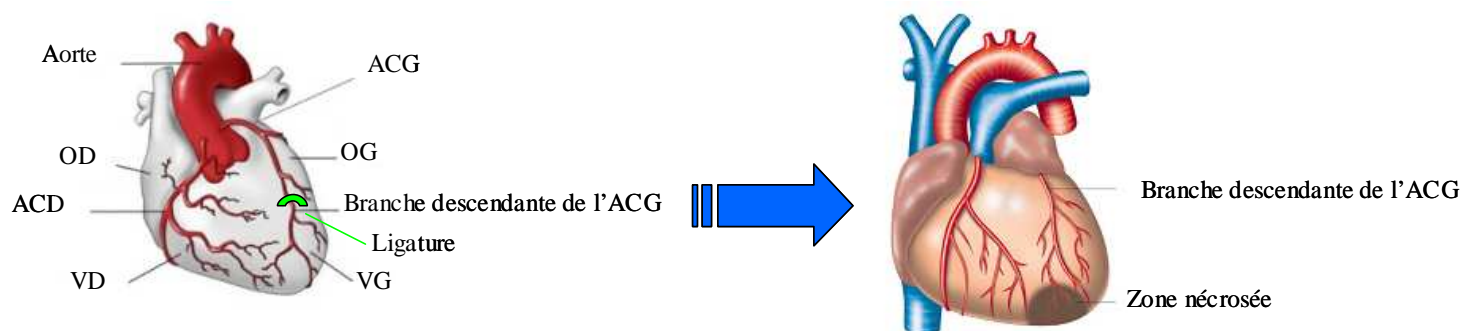


Figure 43 : Représentation schématique de la localisation de la ligature de la branche descendante de l'ACG. OD : oreillette droite, ACD : artère coronaire droite, VD : ventricule droit, VG : ventricule gauche, ACG : artère coronaire gauche, OG : oreille gauche.

Il s'agit du modèle expérimental le plus couramment utilisé. Il a notamment été à l'origine de la découverte de l'effet bénéfique des inhibiteurs de l'ACE dans l'IC [Pfeffer *et al.* 1985]. Ce modèle est remarquable dans le sens où tous les animaux ayant subi la ligature de l'ACG vont développer un RVG et une IC comparable à ce qui est observé chez l'homme

mais sans autre pathologie associée telle que l'athérosclérose, le diabète de type II ou l'HTA [Mulder *et al.* 1997]. Ce modèle expérimental nous a permis d'obtenir des échantillons sériés de tissus, notamment le VG d'animaux témoins et IC à 7 jours (temps correspondant à la phase précoce du RVG chez le rat) et à 2 mois post-ligature (temps correspondant à la phase tardive du RVG) et les animaux témoins subissant l'intervention sans ligature de l'ACG. Nous avons également à notre disposition le plasma de ces animaux à 7 jours et 2 mois post-ligature, mais également 1 jour avant l'opération, ce qui nous permet d'avoir un contrôle optimal de nos expérimentations.

III) Modifications post-traductionnelles

1 Généralités

Si l'analyse protéomique est aujourd'hui un outil phare quant à la recherche de nouveaux biomarqueurs impliqués dans le développement de certaines pathologies, l'étude seule du protéome n'est plus suffisante en tant que telle pour la compréhension des mécanismes physiologiques et physiopathologiques. L'étude des modifications post-traductionnelles, qui ajoutent un niveau de complexité supplémentaire à l'expression du génome, permet d'aborder l'aspect de la modulation de la fonctionnalité des protéines et ainsi de se rapprocher davantage de ce qui se passe réellement dans la cellule [Lescuyer *et al.* 2004]. En effet, les protéines peuvent subir d'importantes modifications, appelées modifications post-traductionnelles, au cours et après leurs synthèses. Il existe actuellement près de 200 modifications post-traductionnelles décrites, les plus communes et les plus importantes sont résumées dans la Table XIV.

Table XIV : Les principales modifications post-traductionnelles.

Modification	Acide aminé modifié	Caractéristiques et fonctions
Acétylation	Partie N-terminale, lysine	Stabilité de la protéine, protection de l'extrémité N-terminale, régulation de l'interaction protéine-ADN
Acylation	<i>Myristoylation</i> <i>S-acylation</i>	Extrémité N-terminale de la glycine Cystéine, sérine
Glycosylation	<i>N-liée</i> <i>O-liée</i> <i>O-GlcNAc</i>	Asparagine Sérine, thréonine Sérine, thréonine
Hydroxylation	Proline	Stabilité de la protéine, interaction protéine-ligand
Méthylation	Lysine	Régulation de l'expression génique
Nitration	Tyrosine	Domage oxydatif lors de l'inflammation
Phosphorylation	Sérine, thréonine, tyrosine	Réversible, activation-inactivation de l'activité d'une protéine, modulation des interactions protéine-protéine, signalisation cellulaire
Ponts disulfure	Cystéine	Liaison intra- et inter-moléculaire, stabilité de la protéine
Sulfatation	Tyrosine	Modulation des interactions protéine-protéine et protéine-ligand
Ubiquitinylation	Lysine	Signal de dégradation de la protéine

Ces modifications peuvent aller de la protéolyse à l'ajout de groupements de taille plus ou moins importants et sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que la régulation de l'activité des protéines, leur ancrage à la membrane, leur adressage à certains compartiments cellulaires, leur dégradation ou encore leur implication dans diverses voies de signalisation.

2 Intérêt

Les modifications post-traductionnelles donnent, à partir d'une même protéine immature, plusieurs protéines dont les fonctions peuvent être différentes. Outre l'apport de ce type d'étude en terme de compréhension des mécanismes cellulaires, certaines de ces modifications post-traductionnelles peuvent constituer de bons marqueurs diagnostiques ou des cibles thérapeutiques potentielles, qui peuvent être étudiés par analyse protéomique [Krueger *et al.* 2006]. En effet, ces modifications étant impliquées dans de nombreux aspects de la vie cellulaire, toute perturbation de ce système peut avoir des conséquences pathologiques [de Grauw *et al.* 2006].

3 Phosphorylation

3.1 Généralités

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle dynamique indispensable à la vie cellulaire car elle en régle tous les aspects [de Graauw *et al.* 2006]. Il s'agit de la modification post-traductionnelle la plus courante puisqu'une protéine sur trois est phosphorylée [de Graauw *et al.* 2006].

En effet, par sa réversibilité et sa rapidité de réponse à divers stimuli, le mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation constitue un système idéal de régulation tant au niveau cellulaire que tissulaire. Ainsi, cette modification intervient dans de nombreux processus tels que les voies de transduction des signaux extracellulaires [Shchemelinin *et al.* 2006], l'activité enzymatique [Delom *et al.* 2006], la localisation sub-cellulaire et l'adressage des protéines [Delom *et al.* 2006], la régulation du cycle cellulaire [Bloom *et al.* 2007], le métabolisme cellulaire [Devin *et al.* 2007] ou encore la contraction musculaire [Noguchi *et al.* 2004].

3.2 Mécanisme

La phosphorylation est un mécanisme dynamique et réversible de par l'action antagoniste de protéines kinases, ajoutant le groupement phosphate sur un acide aminé hydroxylé (sérine, thréonine ou tyrosine) d'une protéine, et de protéines phosphatases, qui vont ôter le groupement phosphate des protéines (Figure 44).

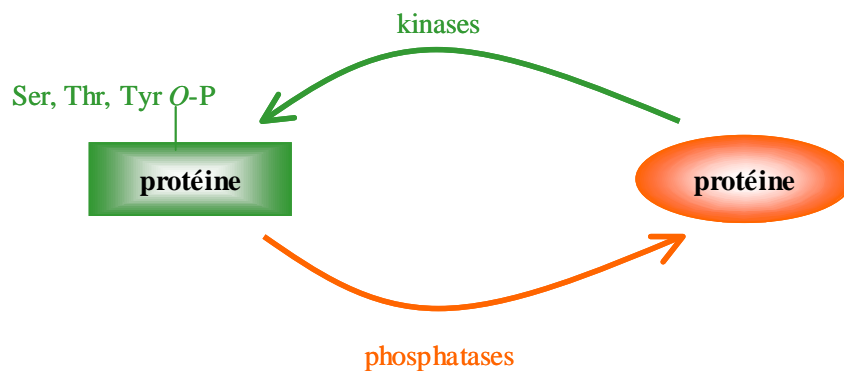


Figure 44 : Mécanisme de phosphorylation / déphosphorylation d'une protéine. Ser : Sérine, Thr : Thréonine, Tyr : Tyrosine, O-P : Phosphorylation.

La phosphorylation intervient sur les résidus sérine, thréonine ou tyrosine avec un ratio de 1000 :100 :1, respectivement [de Graauw *et al.* 2006].

3.3 Enzymes impliquées

Les protéines kinases et phosphatases ont une structure conservée au cours de l'évolution et jouent un rôle primordial dans la régulation de nombreux processus cellulaires en modifiant la fonction de leurs protéines cibles [Delom *et al.* 2006]. Ces enzymes représentent 2% du génome humain [Delom *et al.* 2006].

Plus de 500 **protéines kinases** sont codées par le génome [de Graauw *et al.* 2006]. Ces enzymes peuvent être classées en fonction de leurs substrats, on distinguera alors les protéines tyrosine kinases et les protéines sérine/thréonine kinases [Shchemelinin *et al.* 2006]. Les protéines tyrosine kinases peuvent elle-même être divisées en sous-groupes comprenant les récepteurs, qui sont des protéines transmembranaires avec un domaine extra-cellulaire de liaison à un ligand et un domaine kinase intracellulaire, et les non-récepteurs qui sont principalement retrouvés dans le cytosol ou le noyau [Shchemelinin *et al.* 2006]. Les principales protéines kinases et leurs principales fonctions sont détaillées dans la Table XV.

Table XV : Listes des principales protéines kinases, d'après [Shchemelinin *et al.* 2006].

Nom	Catégorie	Fonctions
c-kit	Tyrosine kinase	Prolifération et différenciation cellulaire
EGFR		Migration cellulaire
		Hématopoïèse
		Réponse inflammatoire
		Survie cellulaire
JAK PDGF		Angiogénèse
		Prolifération et différenciation cellulaire
		Inhibition de l'apoptose
		Inflammation
Src		Migration et prolifération cellulaire
	Développement du système cardiovasculaire	
	Inflammation	
	Angiogénèse	
VEGFR	Cicatrisation	
	Régulation de la fonction endothéliale	
CDK	Sérine/thréonine kinase	Adhésion cellulaire
MAPK		Prolifération et différenciation cellulaire
PKA		Angiogénèse
PKB/Akt		Régulation du cycle cellulaire
PKC		Signalisation intra-cellulaire
PKG		Réponse aux stimulations adrénérgiques
ROCK		Signalisation intra-cellulaire
	Signalisation intra-cellulaire	
	Réponse au NO	
	Réorganisation du cytosquelette	

Comme les protéines kinases, les **protéines phosphatases** sont classées en fonction de leurs substrats, on distingue donc les protéines sérine/thréonine phosphatases et les protéines tyrosines phosphatases. Les principales protéines phosphatases et leurs principales fonctions sont détaillées dans la Table XVI.

Table XVI : Listes des principales protéines phosphatases.

Nom	Catégorie	Fonctions
PTP1B		Réponse au NO
DEP-1	Tyrosine phosphatase	Angiogénèse
SHP		Inflammation
PP1		Réponse aux stimulations adrénergiques
		Spécifique de la PKA
PP2A	Sérine/thréonine phosphatase	Glycolyse
		Pro-apoptotique
		Inflammation
PP2C		Contraction musculaire
		Signalisation intra-cellulaire
Calcineurine		Inflammation

3.4 Rôles dans la pathologie cardiovasculaire

L'intérêt de l'étude de la phosphorylation réside dans son implication dans divers processus pathologiques. En effet, les protéines kinases régulent de nombreuses fonctions cardiaques telles que le métabolisme énergétique, le transport d'ions, la croissance ou la contraction [Delom *et al.* 2006] ; [Wheeler-Jones 2005]. De plus, des mutations dans les gènes codant pour plus de 200 kinases ont été décrites, notamment au niveau cardiovasculaire [Shchemelinin *et al.* 2006].

Il a notamment été montré que les stress mécaniques, électriques, hyperosmotiques ou oxydatifs entraînent une activation de la voie des **MAPK** dans les cardiomyocytes [Bogoyevitch 2000]. Celles-ci sont alors capables d'activer des facteurs de transcription qui vont jouer un rôle dans l'organisation de l'actine et la migration cellulaire ou induire l'apoptose des cardiomyocytes [Bogoyevitch 2000]. Cette voie de signalisation intervient également lors du développement de l'hypertrophie du VG en réponse des stimuli inflammatoires [Bogoyevitch 2000].

De plus, il a été décrit que l'expression de la **PKC** était significativement augmentée dans le cœur de patients IC [Bowling *et al.* 1999] au contraire l'expression de la **PKA** qui est diminuée [van, V *et al.* 2003].

En parallèle, des défauts de protéines phosphatases dans les pathologies cardiovasculaires ont également été mis en évidence. En effet, il a été montré que l'inhibition

de la protéine tyrosine phosphatase ***PTP1B*** a des effets bénéfiques dans le cadre de dysfonctions endothéliales dues à une IC dans un modèle expérimental de souris présentant une ligature de l'ACG [Vercauteren *et al.* 2006], évoquant ainsi l'importance des modifications de phosphorylation dans cette pathologie.

4 O-N-acétyl-glucosamylation

4.1 Généralités

Cette modification, plus couramment appelée *O*-GlcNAcylation, a été mise en évidence en 1984 par Torres et Hart [Torres *et al.* 1984]. Il s'agit d'une modification dynamique, qui intervient principalement au niveau nucléaire et cytosolique, à la différence des glycosylations dites classiques qui interviennent surtout au niveau des protéines membranaires ou sécrétées [Wells *et al.* 2003]. Cette modification consiste à greffer un résidu unique, la β -*N*-acétylglucosamine, contrairement aux autres glycosylations qui sont constituées de longues chaînes de plusieurs résidus glucosidiques [Slawson *et al.* 2003] (Figure 45).



Figure 45 : Structure du résidu de β -*N*-acétylglucosamine greffé lors de la *O*-GlcNAcylation d'une protéine. Ser : Sérine, Thr : Thréonine.

4.2 Mécanisme

Comme la phosphorylation, la *O*-GlcNAcylation est un mécanisme dynamique et réversible par l'action antagoniste de la *O*-GlcNAc transférase (*OGT*), ajoutant le résidu β -*N*-acétylglucosamine, à partir de l'UDP-GlcNAc, sur un acide aminé sérine ou thréonine d'une protéine, et de la β -*N*-acétylglucosaminidase (*O*-GlcNAcase), qui va ôter ce résidu des protéines (Figure 46).

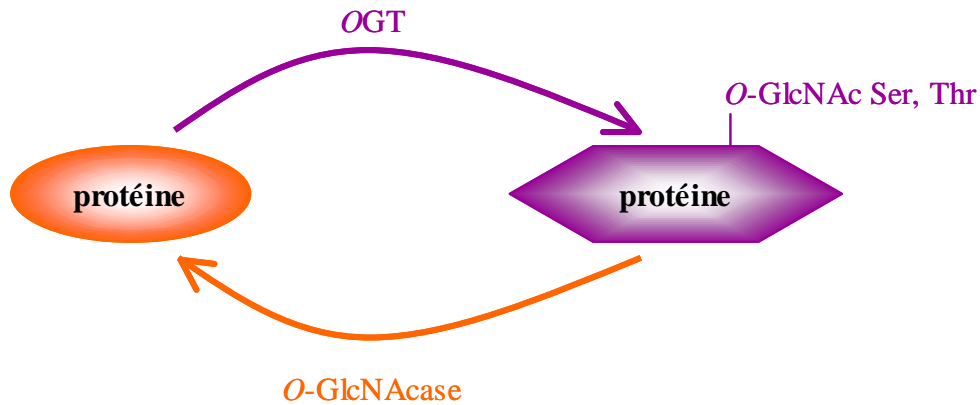


Figure 46 : Mécanisme de la O-GlcNAcylation d'une protéine. Ser : Sérine, Thr : Thréonine, O-GlcNAc : O-GlcNAcylation.

De plus, la phosphorylation et la O-GlcNAcylation sont deux modifications analogues qui peuvent intervenir sur des sites sérine et thréonine identiques ou adjacents au sein de la même protéine. Ce mécanisme est alors appelé balance phosphorylation / O-GlcNAcylation (Figure 47).

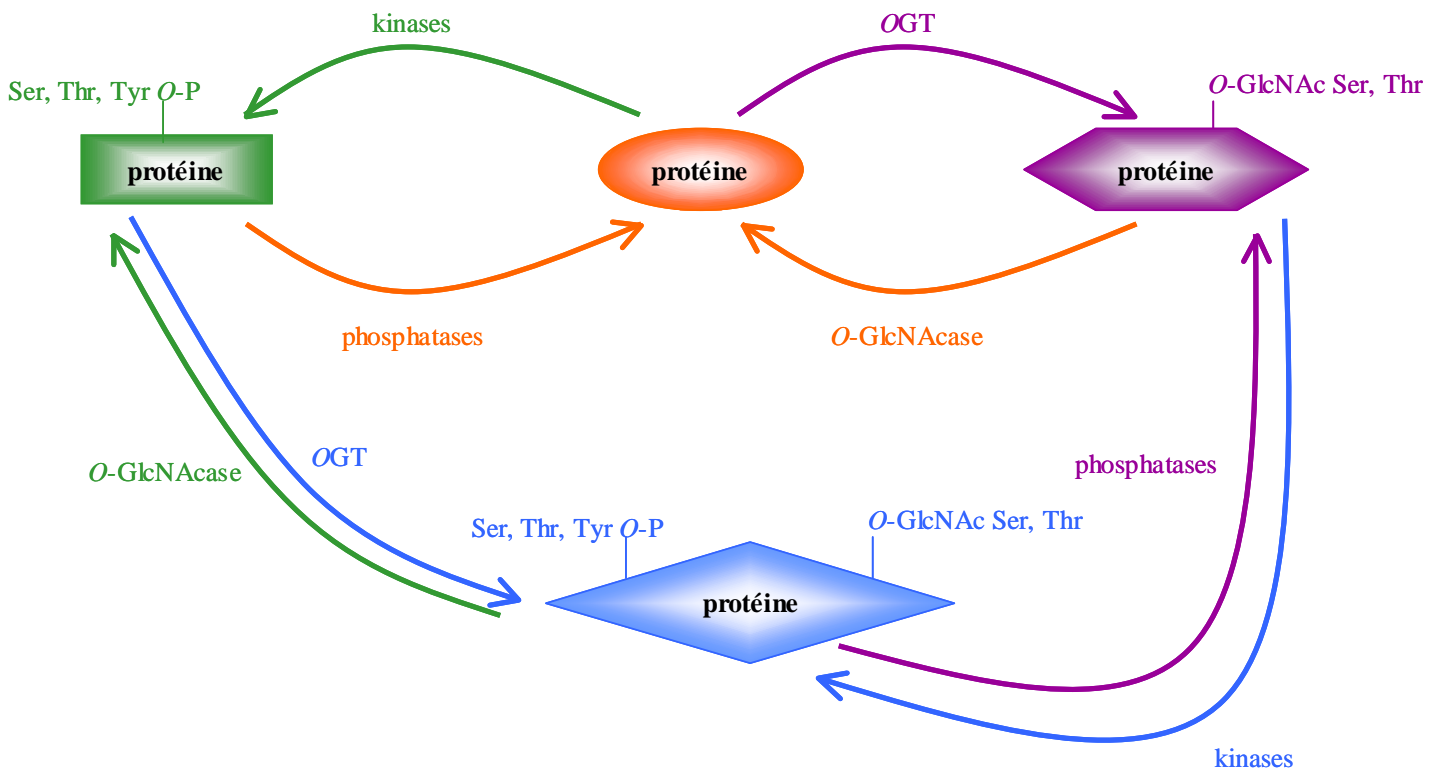


Figure 47 : Mécanisme de la balance phosphorylation / O-GlcNAcylation d'une protéine. Ser : Sérine, Thr : Thréonine, Tyr : Tyrosine, O-GlcNAc : O-GlcNAcylation, O-P : Phosphorylation.

Cette balance phosphorylation / O-GlcNAcylation a été mise en évidence pour de nombreuses protéines puisque la majorité des protéines décrites pour être O-GlcNAcylées sont également phosphorylées [Slawson *et al.* 2003] Table XVII.

Table XVII : Liste non exhaustive des protéines décrites pour être *O*-GlcNAcylées et leur statut de phosphorylation.

Nom	Fonctions	Phosphorylation
αB-crystalline		Oui
HSC 70	Protéine de choc thermique	Oui
HSP 27		Oui
HSP 90		Oui
Annexine I		Inflammation
APP	Stimule la prolifération des cellules	Oui
ARN polymérase II	Transcription de l'ARN messager	Oui
Cytokératine 18		Oui
Myosine	Cytosquelette	Oui
Taline		Oui
Vinculine		Oui
c-myc		
HNF-1		Non décrit
NF-κB	Facteur de transcription	Oui
p53		Oui
Récepteur aux oestrogènes		Oui
Sp-1		Oui
Enolase		Oui
GAPDH	Glycolyse	Oui
Phosphoglucérate kinase		Oui
Pyruvate kinase		Oui
OGT		Enzyme qui greffe le résidu <i>O</i> -GlcNAc d'une protéine
PKC	Kinase	Oui
PP I	Phosphatase	Oui
NO synthase endothéliale	Synthèse de NO	Oui
Tau	Polymérisation des microtubules	Oui

4.3 Enzymes impliquées

A l'inverse de la phosphorylation, il n'existe que deux enzymes impliquées dans le mécanisme de *O*-GlcNAcylation : l'*OGT* et la *O*-GlcNAcase [Wells *et al.* 2003].

L'*OGT* a été purifiée et caractérisée pour la première fois en 1990 [Haltiwanger *et al.* 1990]. Cette enzyme ubiquitaire est essentielle puisque sa suppression est létale chez la souris [Wells *et al.* 2003].

La *O*-GlcNAcase a, quant à elle, été décrite en 1976 [Beutler *et al.* 1976]. Cette enzyme est principalement cytoplasmique [Wells *et al.* 2003].

4.4 Rôles dans la pathologie cardiovasculaire

Dans un premier temps, des modifications du niveau de la *O*-GlcNAcylation ont été décrites dans le diabète de type II. En effet, une augmentation du niveau de la *O*-GlcNAcylation a été montrée chez des souris insulino-résistantes [Yki-Jarvinen 1999] et l'inhibition génétique ou pharmacologique de l'*O*-GlcNAcase induit également une insulino-résistance chez ces souris [McClain *et al.* 2002].

Par ailleurs, de nombreux facteurs de transcription, tels que p53, peuvent être *O*-GlcNAcylés (Table XVII). Suite à cette modification, p53 va induire la synthèse de l'angiotensine II qui pourra alors intervenir dans le RVG [Fulop *et al.* 2007]. Il a également été décrit qu'une augmentation du taux de *O*-GlcNAcylation induit une augmentation de l'inflammation et de la nécrose myocardique [Fulop *et al.* 2007]. Cependant, l'effet bénéfique ou délétère d'une augmentation du taux de *O*-GlcNAcylation n'est pas clairement démontré. En effet, outre les effets délétères décrits précédemment, l'inhibition de la l'*O*-GlcNAcase, qui augmente le niveau de *O*-GlcNAcylation, a un effet bénéfique dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez le rat [Zachara *et al.* 2004]. Enfin, une augmentation du taux de *O*-GlcNAcylation inhibe la dégradation des protéines par le protéasome, ce qui contribue à l'augmentation de la survie cellulaire [Fulop *et al.* 2007].

Objectifs

L'objectif de mon travail de thèse consistait à identifier les déterminants moléculaires du RVG dans le but de mieux en comprendre les mécanismes physiopathologiques. Actuellement, l'analyse protéomique est un outil phare quant à la recherche de nouveaux biomarqueurs impliqués dans le développement de certaines pathologies (Figure 48).

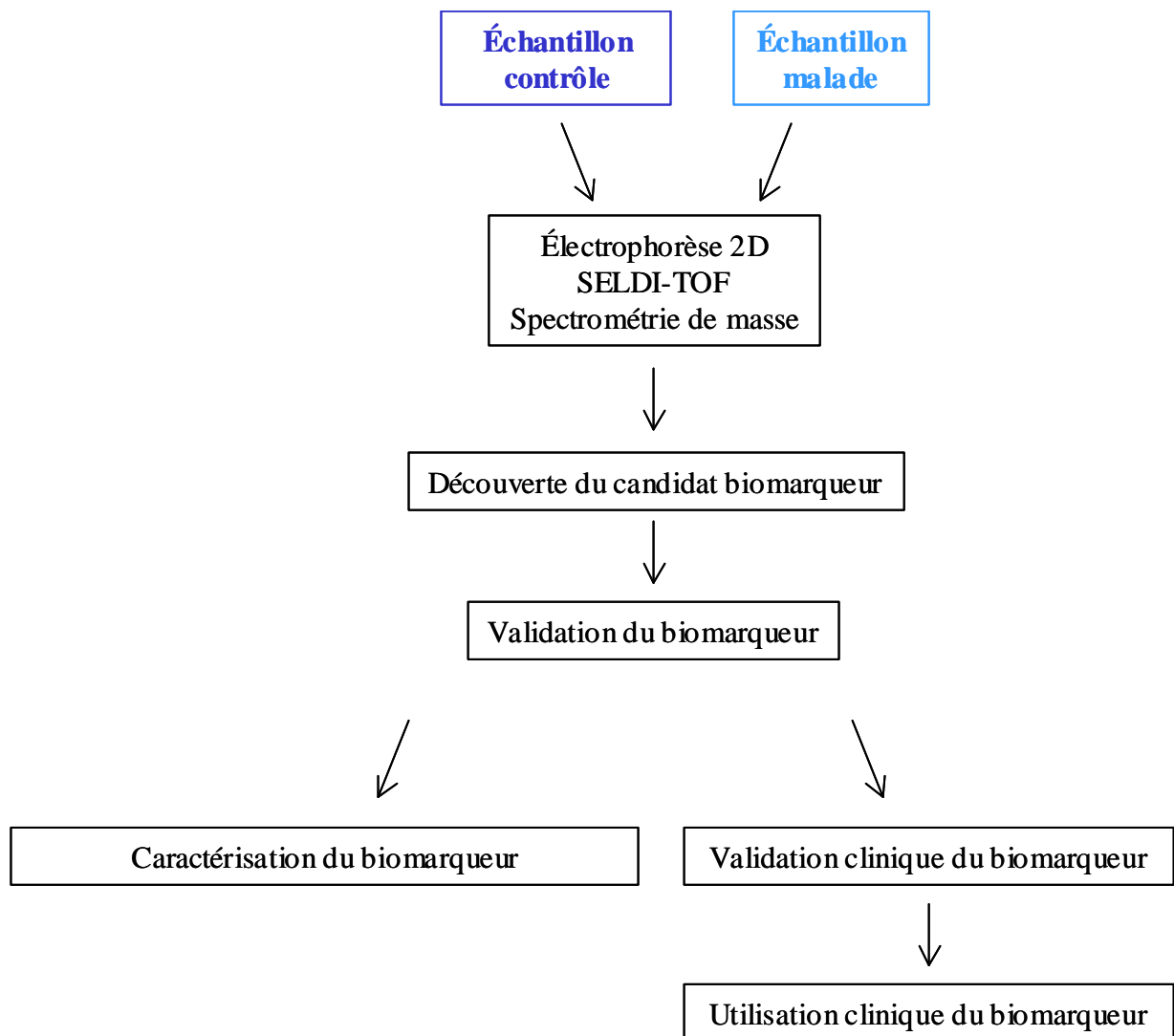


Figure 48 : Stratégie de recherche de biomarqueurs par analyse protéomique.

Nous avons effectué une analyse protéomique globale du VG de rats IC afin d'établir une corrélation entre le niveau d'expression des protéines et la sévérité de l'IC. Pour cette étude, nous avons travaillé en collaboration avec l'unité INSERM U644 de Rouen sur un modèle expérimental d'IC dans lequel l'IDM est induit chez des rats mâles de souche Wistar par ligature de la branche descendante de l'ACG, les rats témoins subissant l'intervention mais sans ligature.

Cependant, l'étude du protéome n'est plus suffisante en tant que telle pour la compréhension des mécanismes physiologiques et physiopathologiques. L'étude des modifications post-traductionnelles, qui ajoutent un niveau de complexité supplémentaire à

l'expression du génome, permet d'aborder l'aspect de la modulation de la fonctionnalité des protéines et ainsi de se rapprocher davantage de ce qui se passe réellement dans la cellule [Lescuyer *et al.* 2004]. La phosphorylation est une modification post-traductionnelle majeure, dynamique et réversible, indispensable à la vie cellulaire car elle en régle tous les aspects [de Graauw *et al.* 2006] (Figure 49).

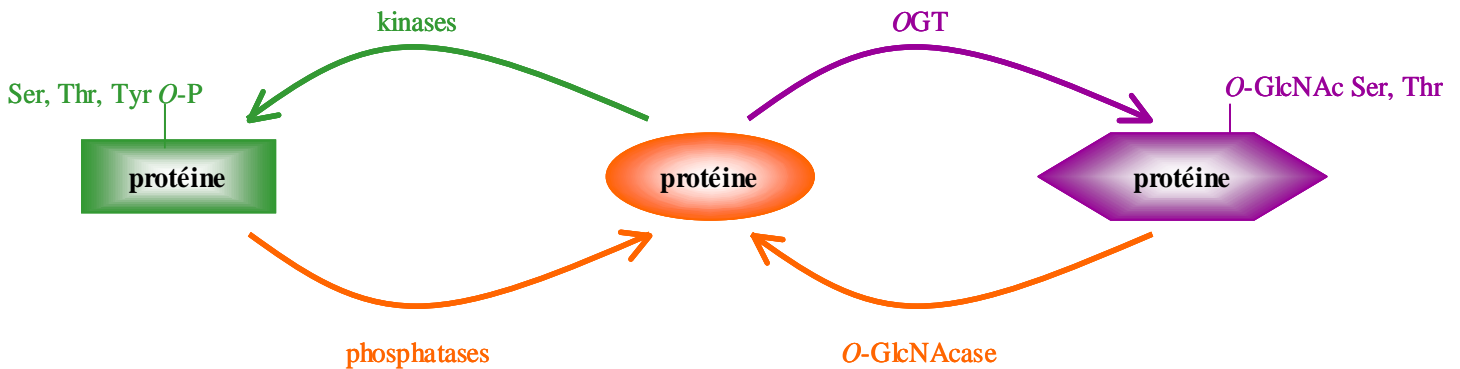


Figure 49 : Mécanisme de la balance phosphorylation / O-GlcNAcylation d'une protéine. Ser : Sérine, Thr : Thréonine, Tyr : Tyrosine, O-GlcNAc : O-GlcNAcylation, O-P : Phosphorylation.

Nous avons donc effectué par la suite l'étude du phosphoprotéome, correspondant à l'ensemble des protéines phosphorylées d'un échantillon donné à un instant donné, du VG dans le même modèle expérimental d'IC. Pour cela, nous avons utilisé la technique d'électrophorèse 2D colorée au Pro-Q®Diamond, afin de détecter l'ensemble des protéines phosphorylées, puis au Sypro®Ruby afin de détecter les protéines totales. L'objectif est de mettre en évidence des modulations du niveau de phosphorylation des protéines lors du RVG post-IDM.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux protéines contractiles pour lesquelles nous avons étudié les modifications du niveau de phosphorylation et de O-GlcNAcylation (Figure 49) dans le VG des animaux IC afin de mettre en évidence des modulations de ces modifications post-traductionnelles dans le cadre du RVG post-IDM. Nous avons également étudié les enzymes impliquées dans ces modifications. Enfin, nous avons analysé l'effet de ces modifications de phosphorylation et de O-GlcNAcylation sur la fonction cardiaque dans un modèle de cœur perfusé isolé.

Par la suite, nous nous sommes particulièrement intéressés à une des protéines contractiles identifiées, la troponine T (TnT). L'objectif était de déterminer si la forme phosphorylée de la TnT pouvait être un biomarqueur du RVG post-IDM. Pour cela, nous devons à la fois caractériser ce biomarqueur dans notre modèle expérimental d'IC mais également valider ce biomarqueur dans différentes populations de patients (Figure 50).

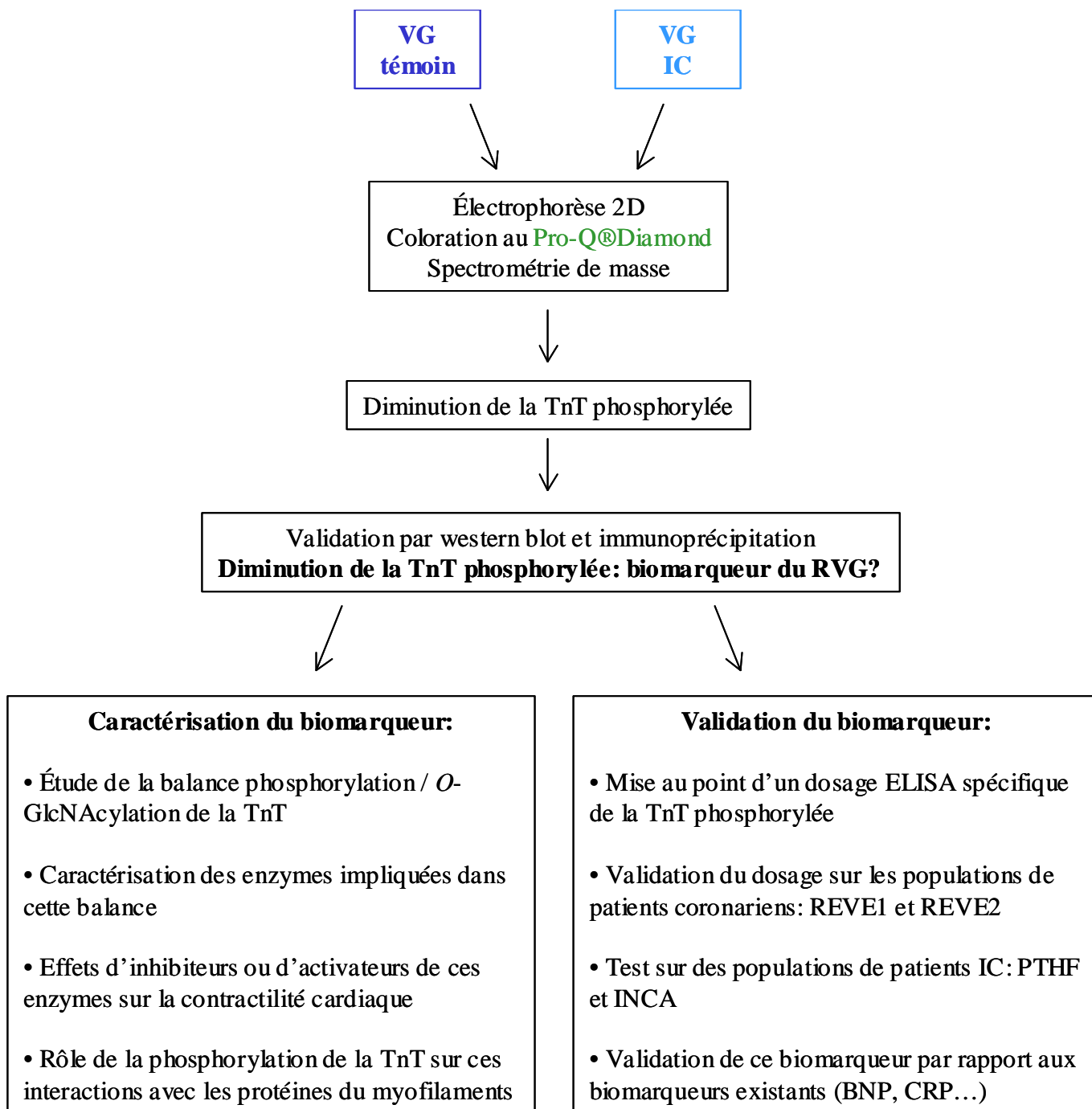


Figure 50 : Stratégie de recherche pour valider la TnT phosphorylée en sérine²⁰⁸ comme biomarqueur du RVG post-IDM.

Dans le but de caractériser les mécanismes impliqués dans la phosphorylation de la TnT, nous avons développé au laboratoire des anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés spécifiquement contre la TnT phosphorylée et la TnT non phosphorylée pour pouvoir la quantifier aisément. Nous avons mis au point les dosages des différentes enzymes impliquées dans les modifications post-traductionnelles de la TnT. Nous avons étudié l'effet d'inhibiteurs ou d'activateurs de ces enzymes sur la contractilité cardiaque dans un modèle de cœur perfusé

isolé [Mulder *et al.* 2004].

Parallèlement, un dosage ELISA pour quantifier la TnT phosphorylée dans le plasma de patients est actuellement en cours de développement afin de nous permettre de valider la pertinence de l'utilisation de ce biomarqueur en clinique.

Les principales stratégies utilisées pour la mise en évidence de nouveaux biomarqueurs des pathologies cardiovasculaires par analyse protéomique vous sont détaillées dans deux revues.

RÉSULTATS

*Partie 1 : Analyse du protéome du ventricule
gauche dans un modèle expérimental
d'insuffisance cardiaque*

I) Objectifs de l'étude

Cette étude consistait à rechercher des biomarqueurs tissulaires du RVG post-IDM par analyse protéomique différentielle du VG à partir d'un modèle expérimental d'IC. L'intérêt de l'utilisation d'un modèle expérimental pour cette étude réside dans l'obtention d'échantillons sériés de tissu cardiaque, ce qui n'est pas envisageable dans le cadre d'une étude chez l'homme. De plus, dans le cadre d'une analyse protéomique, les conditions de prélèvement et de conservation des échantillons sont essentielles. En effet, une bonne reproductibilité de ces étapes, facilitée par l'utilisation d'un modèle animal, est indispensable à la suite de l'analyse.

L'étude du RVG post-IDM par analyse protéomique nécessite donc l'utilisation d'un modèle animal viable et reproductible, permettant de quantifier la dysfonction du VG afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de celui-ci. Parmi les modèles animaux existants, les plus utilisés sont les modèles de rats et de souris. Cependant, les modèles expérimentaux de rat permettent l'obtention d'une plus grande quantité de tissu cardiaque et la technique chirurgicale est plus simple à mettre en œuvre. Nous nous sommes donc orientés vers cette espèce. Il existe actuellement quatre principaux modèles d'IC chez le rat ayant chacun leurs avantages et leurs inconvénients. Parmi ceux-ci, les modèles de constriction de l'aorte ascendante, de rats Dahl *salt-sensitive* et de rats spontanément hypertendus présentaient l'inconvénient d'induire une HTA en plus de l'IC. De plus, il n'y a pas de notion d'IDM dans ces modèles.

Pour cette étude, nous avons choisi de travailler sur le modèle expérimental d'IC dans lequel l'IDM est induit par ligature de l'ACG chez des rats mâles de souche Wistar. Ce modèle est remarquable puisque tous les animaux ayant subi la ligature de l'ACG vont développer un RVG et une IC comparable à ce qui est observé chez l'homme mais sans autres pathologies associées telles que l'athérosclérose, le diabète de type 2 ou l'HTA [Mulder *et al.* 1997]. Il s'agit du modèle expérimental le plus couramment utilisé, qui a notamment été à l'origine de la découverte de l'effet bénéfique des inhibiteurs de l'ACE dans l'IC [Pfeffer *et al.* 1985].

Le but de cette étude était de corrélérer les modifications du protéome cardiaque avec les changements fonctionnels et structuraux du myocarde post-IDM. Cette approche nous permettra de mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques mis en jeu lors du RVG et conduira à l'identification de nouveaux marqueurs potentiels du RVG.

II) Résultats

III) Résultats complémentaires

Nous avons réalisé une analyse protéomique différentielle du VG à deux mois post-ligature par gels d'électrophorèse 2D colorés au nitrate d'argent. Les résultats obtenus ont ensuite été validés par western blot à la fois lors de la phase tardive du RVG (deux mois post-ligature) mais également lors de la phase précoce de celui-ci (sept jours post-ligature). Nous avons ensuite mis en évidence des modulations d'expression corrélées à la sévérité de l'IC pour quatre protéines, qui sont la GAPDH, l' α B-crystalline, la péroxirédoxine-2 et l'isocitrate déshydrogénase.

Afin de compléter ces résultats, nous nous sommes intéressés aux modulations d'expression de ces protéines dans le plasma des rats IC. Pour cela, nous avons réalisé un western blot dirigé spécifiquement contre chacune de ces protéines à partir de 1 μ L de plasma de rats témoins et IC. Les résultats obtenus pour l' α B-crystalline sont présentés en Figure 51.

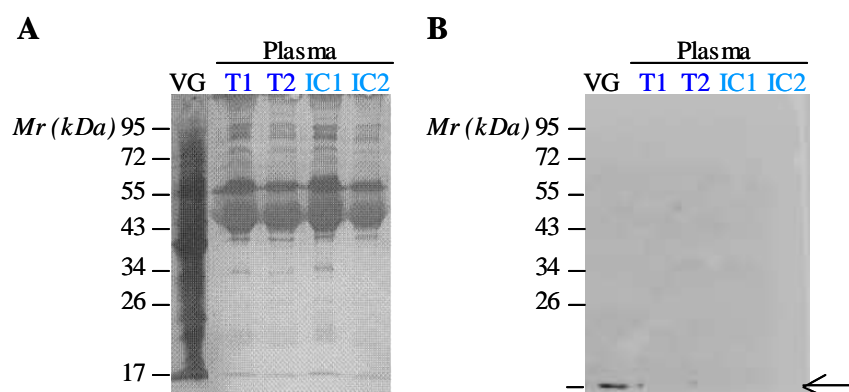


Figure 51 : Détection de l' α B-crystalline dans le plasma de rats témoins et IC. (A) Coloration au rouge ponceau. (B) Western blot dirigé spécifiquement contre l' α B-crystalline. Vingt-cinq μ g de protéines du VG et 1 μ L de plasma de rats témoins (T1 et 2) et IC (IC1 et IC2) ont été déposées sur un gel SDS-PAGE 12% et transférées sur une membrane de nitrocellulose et détectée par un anticorps dirigé spécifiquement contre l' α B-crystalline dilué au 1/2000, l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase est dilué au 1/10000.

Malheureusement, nous n'avons détecté aucune de ces protéines dans le plasma des rats témoins et IC, alors que cette protéine est détectée sans problème dans le VG (Figure 51).

IV) Discussion

Afin de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs du RVG post-IDM, nous avons utilisé le modèle expérimental de rats dont l'ACG a été ligaturée [Mulder *et al.* 1997] pour mettre en évidence une association entre les modifications des paramètres échographiques et hémodynamiques et les modulations du protéome induites par le RVG.

Cette étude nous a permis de valider l'utilisation de ce modèle expérimental pour étudier à la fois la phase précoce et la phase tardive du RVG. En effet, nous avons pu mettre

en évidence un RVG modéré après sept jours de ligature avec une dilation du VG sans hypertrophie alors que le RVG était plus important après deux mois de ligature avec une hypertrophie et une dilation importante du VG associées à une dysfonction de ce dernier, ce qui est similaire à ce que l'on peut observer chez l'homme. De plus, ce modèle induit une faible mortalité postopératoire puisque seuls deux animaux parmi les vingt-quatre sont décédés avant la fin de l'analyse à deux-mois post-ligature.

L'étude du protéome par gels d'électrophorèse 2D coloré au nitrate d'argent nous a permis de mettre en évidence des modulations d'expression de vingt-sept protéines dans le VG des animaux IC à deux mois post-ligature. Les principaux résultats obtenus sont résumés en Figure 52.

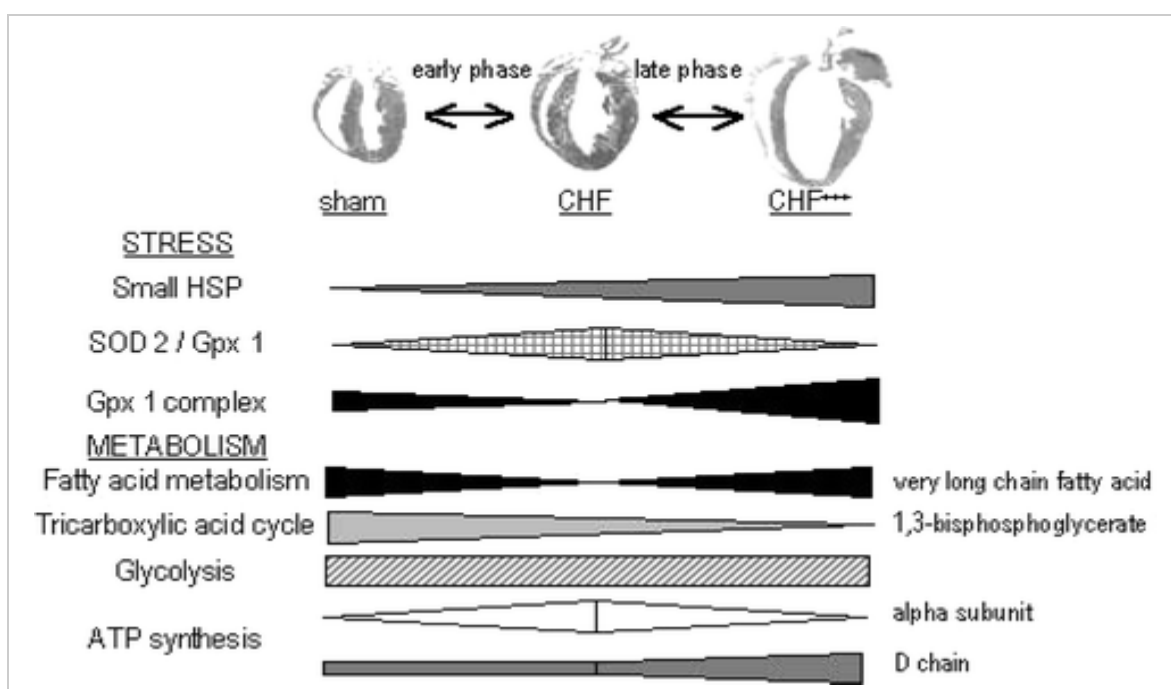


Figure 52 : Modulation d'expression des protéines du VG dans les différentes phases du RVG post-IDM. SOD : Superoxyde dismutase, Gpx : Glutathion peroxydase, CHF : *Chronic heart failure*.

De manière intéressante, la majorité des ces protéines correspondent à plusieurs spots localisés dans une zone de *Mr* compris entre 45 et 70 kDa et une zone de *pH* compris entre 3,5 et 5, ce qui peut laisser supposer la présence de différentes isoformes de la même protéine. Une analyse bibliographique des protéines identifiées nous a alors permis de mettre en avant que quatorze protéines parmi les vingt-sept identifiées possèdent des sites de phosphorylation décrits dans la littérature (Table XVIII).

Table XVIII : Liste des protéines dont l'expression varie dans le VG des rats IC et leurs sites de phosphorylation connus.

Nom protéine	Sites de phosphorylation	Références
<i>Protéines chaperonnes</i>		
HSP β -2		
HSP β -6	Non connu	
HSP β -7		
α -B crystalline	Sérine ^{19, 45 et 59}	Ito <i>et al.</i> , 1997
<i>Protéines impliquées dans les voies de stress et de dégradation du réticulum endoplasmique</i>		
Protéine disulfide isomérase 1	Sérine ou thréonine	Barati <i>et al.</i> , 2006
Isozyme L3 de l'ubiquitine carboxyl-terminal hydrolase	Non connu	
Sous-unité β -3 du protéasome		
<i>Protéines impliquées dans le stress oxydant</i>		
Péroxirédoxine-2	Phosphorylée	Bhojwani <i>et al.</i> , 2006
Péroxirédoxine-6	Thréonine ¹⁷⁷	Wu <i>et al.</i> , 2009
Glutathion peroxydase 1	Tyrosine ⁹⁶	Cao <i>et al.</i> , 2003
Superoxyde dismutase 2	Sérine ⁸²	Yamakura <i>et al.</i> , 2010
<i>Enzymes de la glycolyse</i>		
Phosphoglycérate kinase 1	Tyrosine ⁷⁶	Shetty <i>et al.</i> , 2010
Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	Phosphorylée	Baba <i>et al.</i> , 2010
Triose phosphate isomérase		
Phosphoglycérate mutase 1	Tyrosine	Yamaoka <i>et al.</i> , 2006
<i>Protéines impliquées dans le métabolisme des acides gras</i>		
Acyl-coenzyme A thioestérase 2	Non connu	
Enoyl-coenzyme A hydratase		
<i>Enzymes du cycle de Krebs</i>		
Sous-unité α de l'isocitrate déshydrogénase	Sérine ¹¹³ Thréonine ³⁴⁹	Dean <i>et al.</i> , 1989 Reinders <i>et al.</i> , 2007
Fumarate hydratase	Non connu	
Dihydrolipoyl déshydrogénase		
<i>Protéines impliquées de la chaîne respiratoire mitochondriale</i>		
Sous-unité de 24 kDa de la NADH-ubiquinone oxidoréductase	Non connu	
<i>Protéines impliquées dans la synthèse de l'ATP</i>		
Chaîne D de l'ATP synthase	Non connu	
Sous-unité α de l'ATP synthase	Sérine ^{65 et 178}	Boja <i>et al.</i> , 2009 Reinders <i>et al.</i> , 2007
Sous-unité β de l'ATP synthase	Sérine ^{10, 263 et 373} Thréonine ^{107, 112, 237, 262, 312 et 368}	Arrell <i>et al.</i> , 2006 Reinders <i>et al.</i> , 2007
<i>Protéines impliquées dans la voie de la kinine</i>		
Précurseur du kininogène T-1		
Précurseur du kininogène T-2	Non connu	
Inhibiteur de sérine protéase A3K		

De manière étonnante, nous n'avons pas mis en évidence de modulations du niveau d'expression des protéines contractiles dans cette étude alors que celles-ci ont été décrites dans la littérature. En effet, des modulations de l'expression des chaînes lourdes de myosine [Barry *et al.* 2008], de la titine [Taegtmeyer *et al.* 2010] ou de l' α -actine [Taegtmeyer *et al.*

2010] ont été mises en évidence dans le VG hypertrophié. Cependant, les chaînes lourdes de myosine et la titine sont des protéines de très haut poids moléculaire, respectivement 200 et 3000 kDa. Pour cette étude, nous avons utilisé des conditions standards de gels d'électrophorèse 2D nous permettant d'accéder aux plus grands nombres de protéines du VG afin de réaliser une étude protéomique globale. Les conditions utilisées ne nous permettent pas de détecter les protéines de très haut (supérieure à 100 kDa) ou très bas (inférieure à 10 kDa) poids moléculaire, ce qui pourrait expliquer l'absence de ces protéines dans notre analyse.

Par ailleurs, l'implication de la phosphorylation dans le mécanisme de la contraction cardiaque a été bien décrit. En effet, la phosphorylation de la TnT, de la TnI ou de la MLC-2 induit un ralentissement de la cinétique de formation des ponts actine-myosine [Noland, Jr. *et al.* 1992]. Des sites de phosphorylation ont également été décrits pour la MLC-1/3 [Arrell *et al.* 2001a], l' α -tropomyosine [Mak *et al.* 1978] ou la desmine [Kitamura *et al.* 1989], [Inada *et al.* 1998].

Au vu de ces résultats intéressants, nous nous sommes orientés vers l'étude du phosphoprotéome, correspondant à l'ensemble des protéines phosphorylées d'un échantillon, afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le RVG post-IDM.

*Partie 2 : Analyse du phosphoprotéome du
ventricule gauche dans un modèle expérimental
d'insuffisance cardiaque*

I) Objectifs de l'étude

Actuellement, l'étude seule du protéome n'est plus suffisante en tant que telle pour la compréhension des mécanismes physiologiques et physiopathologiques. L'étude des modifications post-traductionnelles, qui ajoutent un niveau de complexité supplémentaire à l'expression du génome, permet d'aborder l'aspect de la modulation de la fonctionnalité des protéines [Lescuyer *et al.* 2004]. La phosphorylation est une modification post-traductionnelle majeure, dynamique et réversible, impliquée dans tous les processus cellulaires [de Graauw *et al.* 2006].

L'objectif de cette étude est d'effectuer une analyse différentielle globale du phosphoprotéome dans le VG de rats IC à 2 mois post-ligature, dans le but de rechercher sans *a priori* des modifications de phosphorylation associées au RVG.

II) Résultats

1 Mise au point de la coloration au Pro-Q®Diamond

Afin d'obtenir une détection optimale de l'ensemble des protéines phosphorylées du VG, tout en réduisant la quantité de protéines nécessaire, différents tests ont été réalisés sur la quantité de protéines du VG (100 µg, 250 µg ou 500 µg), la dilution possible du Pro-Q®Diamond (1/5 ou non dilué) ou le temps d'incubation (90 minutes ou sur la nuit) (Figure 53).

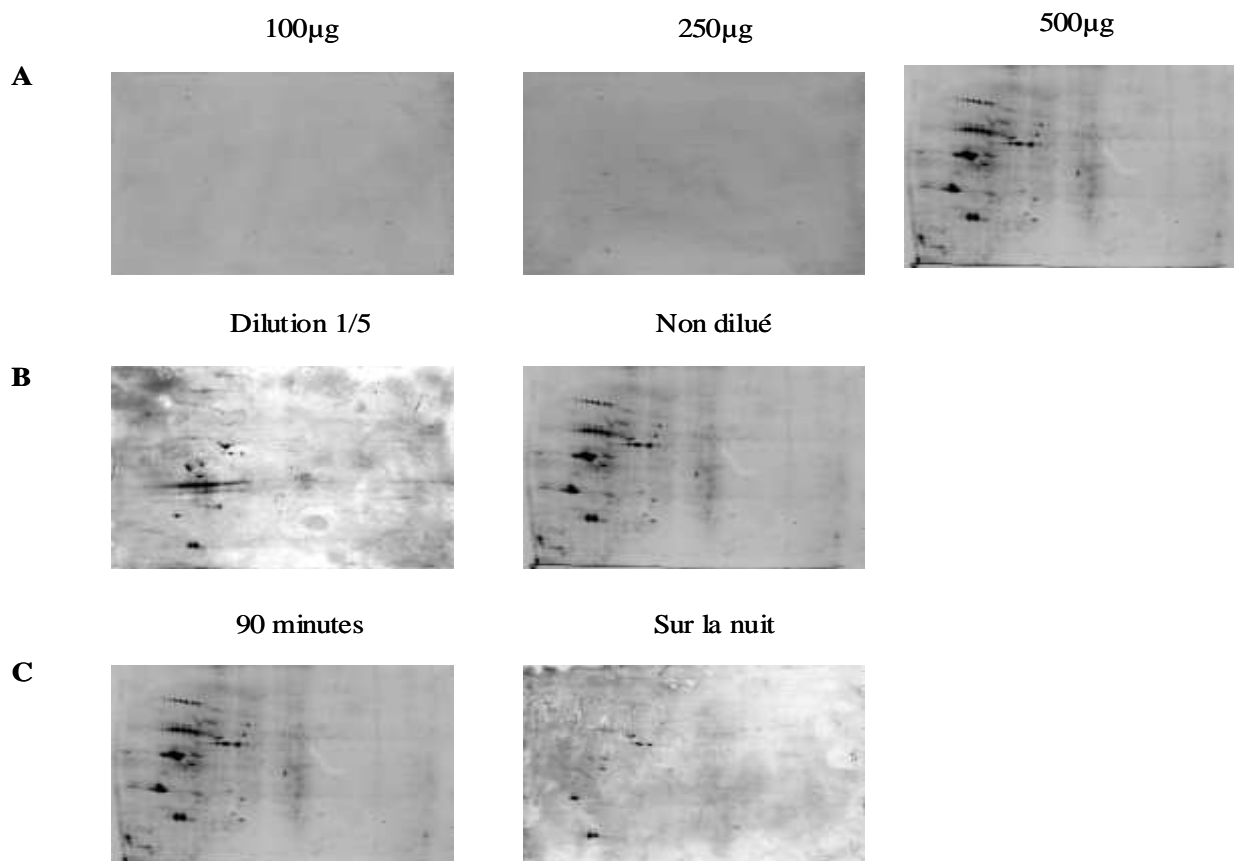


Figure 53 : Mise au point de la coloration au Pro-Q®Diamond. (A) Gels d'électrophorèses 2D réalisées à partir de 100, 250 et 500 µg de protéines du VG (gradient de *pH* 3-10, gel d'acrylamide 12%), incubation Pro-Q®Diamond non dilué 90 minutes. (B) Gels d'électrophorèses 2D réalisées à partir de 500 µg de protéines du VG incubation Pro-Q®Diamond dilué au 1/5 ou non dilué 90 minutes. (C) Gels d'électrophorèses 2D réalisées à partir de 500 µg de protéines du VG, incubation Pro-Q®Diamond non dilué 90 minutes ou toute la nuit.

Au vu des différents tests effectués, les conditions optimales d'utilisation du Pro-Q®Diamond pour l'étude du phosphoprotéome dans le VG de rat sont : une quantité de protéines à analyser de 500 µg et une incubation des gels de 90 minutes dans du Pro-Q®Diamond non dilué.

2 Détection et quantification des protéines phosphorylées

Cinq cent µg de protéines extraites du VG de rats témoins et IC à 2-mois post-ligature ont été séparés par gels d'électrophorèse 2D. Les images représentatives des gels colorés au Pro-Q®Diamond (visualisation du phosphoprotéome) puis au Sypro®Ruby (visualisation du protéome) sont représentées en Figure 54.

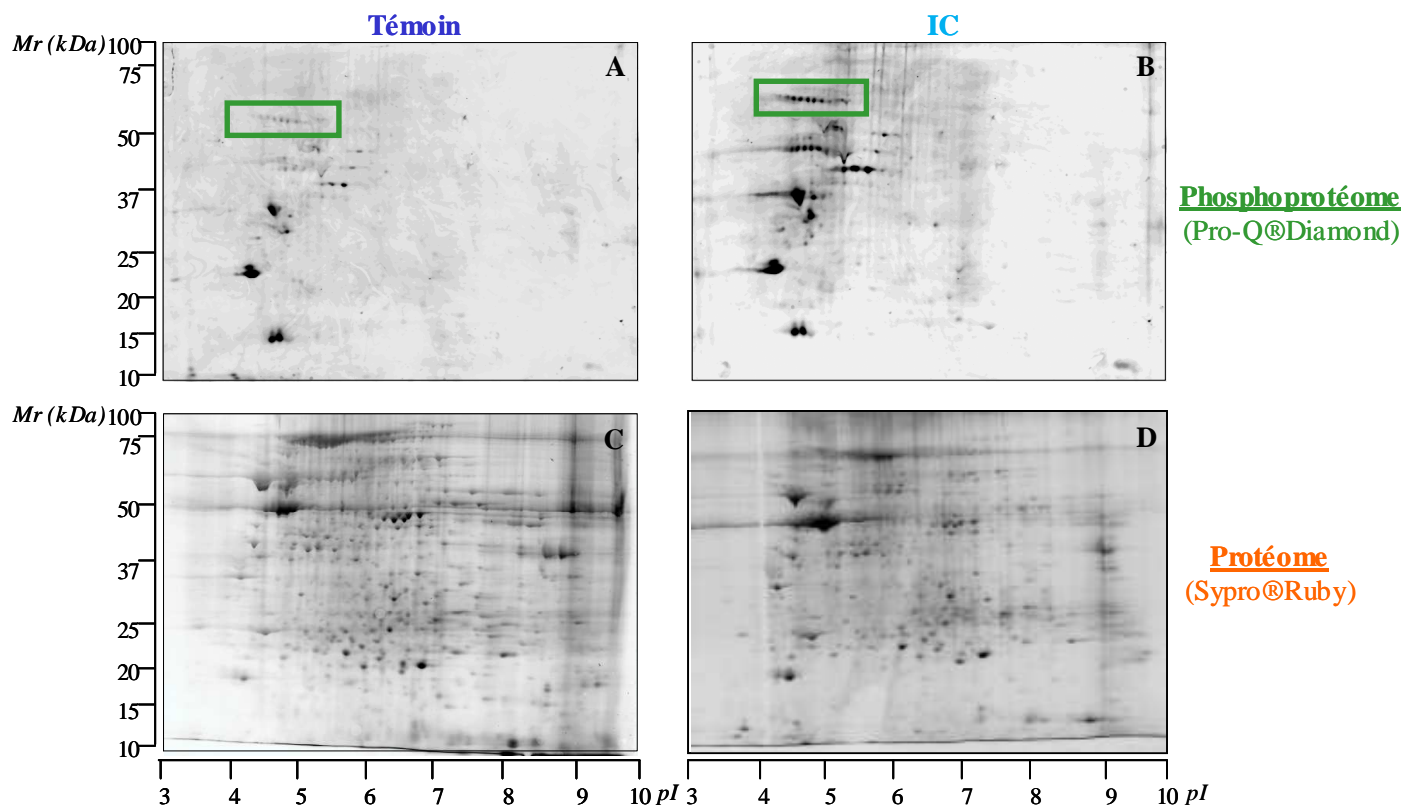


Figure 54 : Gels d'électrophorèses 2D représentatifs du VG d'animaux témoins (A et C) et IC (B et D) après coloration au Pro-Q@Diamond (A et B) puis au Sypro@Ruby (C et D). Cinq cent μ g de protéines de VG de rats témoins (A) et IC (B) ont été séparées par gels d'électrophorèse 2D (gradient de pH 3-10, gel d'acrylamide 12%). Le phosphoprotéome a été détecté par coloration Pro-Q@Diamond (A et B) et le protéome total a été détecté par coloration au Sypro@Ruby (C et D). L'encart correspond à plusieurs spots polypeptidiques identifiés comme la même protéine.

Dans un premier temps, nous pouvons observer un grand nombre de protéines phosphorylées avec un pI acide puisque la majorité apparente des spots polypeptidiques colorés au Pro-Q@Diamond est détectée dans la zone de pH 4-7 tandis que pratiquement aucun spot polypeptidique n'est présent dans la zone de pH basique malgré la présence de nombreux spots polypeptidiques visualisés au Sypro@Ruby (Figure 54). Par ailleurs, la coloration au Pro-Q@Diamond met en évidence que certains spots polypeptidiques sont inclus dans une chaîne de plusieurs spots polypeptidiques (Figure 54, encart), présentant un Mr identique et une différence de pI d'environ 0,1 entre chaque spot polypeptidique pouvant correspondre à différentes isoformes de phosphorylation de la même protéine.

Afin de quantifier les modulations de phosphorylation des protéines du VG entre les animaux témoins et IC, nous avons réalisé une analyse comparative avec le logiciel d'analyse d'image 2D Platinum@6.0 à partir de 8 gels (4 rats témoins et 4 rats IC) colorés au Pro-Q@Diamond puis au Sypro@Ruby, chacun des gels correspondant à un rat différent. Cette analyse nous a permis de mettre en évidence un profil de protéome total (gels colorés au Sypro@Ruby) similaire en nombre de spots polypeptidiques entre les VG des animaux

témoins (309 ± 49) et IC (284 ± 29) (Figure 55).

A

Catégorie	Échantillon	Nombre de spots polypeptidiques		
		Pro-Q®Diamond	Sypro®Ruby	%Pro-Q/Sypro
Témoins	VG161	38	290	13
Témoins	VG162	40	434	9
Témoins	VG163	24	266	9
Témoins	VG164	26	245	11
IC	VG121	57	342	17
IC	VG122	44	225	20
IC	VG123	56	267	21
IC	VG124	40	302	13
test de student		0,027	0,685	0,017

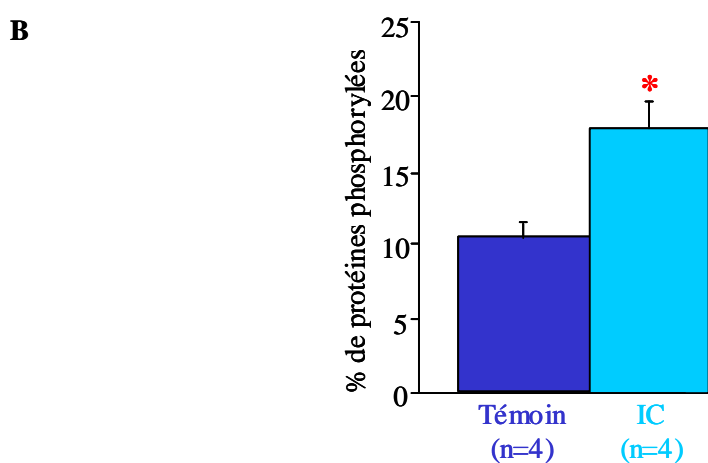


Figure 55 : Résultats de l'analyse bioinformatique. (A) Table détaillée des résultats de l'analyse bioinformatique globale. (B) Représentation graphique des résultats de l'analyse du pourcentage de protéines phosphorylées dans le VG d'animaux témoins et IC. Les résultats sont exprimés en moyenne du pourcentage de protéines phosphorylées \pm la déviation standard (sem), * pour $p < 0.05$ en test de student.

A l'inverse du protéome, le nombre de spots polypeptidiques détectés sur les gels colorés au Pro-Q®Diamond est significativement supérieur ($p=0.046$) dans le VG des animaux IC (52 ± 8) par rapport aux animaux témoins (32 ± 5) (Figure 55A). Le pourcentage de protéines phosphorylées est également significativement plus élevé dans le VG des animaux IC (19 ± 2) par rapport aux témoins (11 ± 1), ($p=0.013$) (Figure 55B). Au total, nous avons mis en évidence soixante-neuf spots polypeptidiques correspondant à l'ensemble des protéines phosphorylées. Parmi ces soixante-neuf spots polypeptidiques, soixante-quatre présentent une modulation de leur niveau de phosphorylation d'au moins 1,5, dont trente-cinq statistiquement significatives, entre les animaux témoins et IC à l'issue de cette analyse.

3 Cartographie du phosphoprotéome du VG

Afin d'établir la cartographie du phosphoprotéome du VG d'animaux témoins et IC, nous avons sélectionné les soixante-neuf spots polypeptidiques détectés par coloration au Pro-Q®Diamond pour l'identification en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Figure 56).

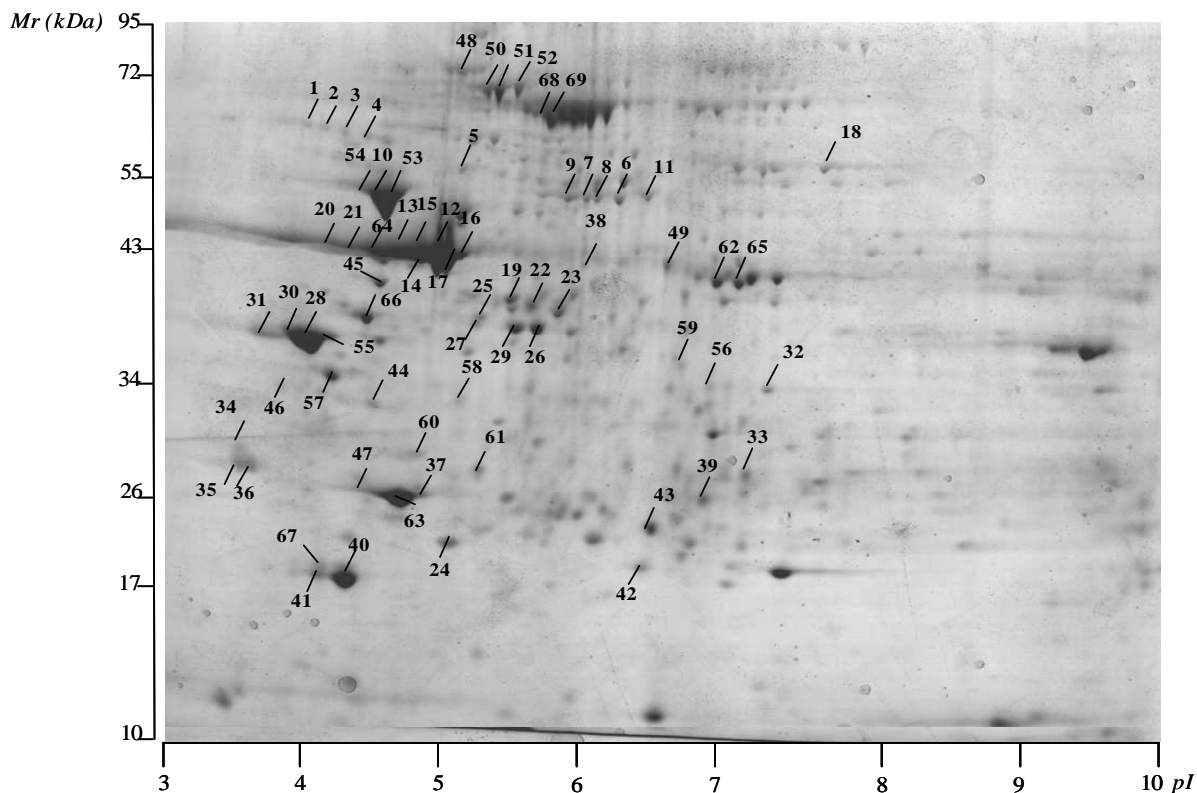


Figure 56: Annotation des spots polypeptidiques détectés au Pro-Q®Diamond et analysés en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF dans un gel d'électrophorèse 2D coloré au bleu colloïdal (visualisation des protéines totales). Cinq cent µg de protéines de VG de rats IC ont été séparées par gel d'électrophorèse 2D (gradient de *pH* 3-10, gel d'acrylamide 12%) et colorés au bleu colloïdal. Les spots polypeptidiques sélectionnés ont été découpés puis soumis à une identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

Parmi les soixante-neuf spots polypeptidiques sélectionnés, neuf spots polypeptidiques n'ont pu être identifiés en raison de leur comigration avec l' α -actine (spots 12 à 17, 20, 21 et 64) et sept en raison d'un faible signal en spectrométrie de masse ou d'une quantité de protéines insuffisante (spots 19, 25, 27, 33, 46, 60 et 66). Les cinquante-trois spots polypeptidiques restant ont été identifiés avec succès et correspondent à trente protéines différentes, présentant des fonctions biologiques variées (Table XIX).

Table XIX : Liste des protéines phosphorylées identifiées dans le VG par MALDI-TOF.

N°spot	N°accession	Nom protéine	Moyenne ± SEM du ratio Pro-Q / Témoin		Facteur de variation	Site de phosphorylation connus	Références
<i>Protéines chaperonnes</i>							
42	P23928	α B-crystalline	1,82 ± 0,29	0	< 4,7	Ser19, 45 et 59	Ito <i>et al</i> , 1997
43			2,92 ± 0,14	1,01 ± 0,36			
48	P06761	GRP78	1,61 ± 1,30	0	Supprimé	Phosphosérine	Lefebvre <i>et al</i> , 2001
52	P63018	Protéine de choc thermique de 71 kDa	0,22 ± 0,22	1,36 ± 0,11	> 6,2	Phosphosérine	Lefebvre <i>et al</i> , 2001
58	P67779	Prohibitine	0	2,25 ± 0,09	Induite	Tyrosine ¹¹⁴ et 259	Ande <i>et al</i> , 2009
<i>Protéines impliquées dans le stress oxydant</i>							
39	P04041	Glutathion peroxydase 1	3,89 ± 0,01	0,84 ± 0,56	< 4,6	Tyrosine ⁹⁶	Cao <i>et al</i> , 2003
59	P97532	3-mercaptopyruvate sulfurtransférase	0,37 ± 0,29	4,74 ± 1,27	> 12,8	Non décrit	
61	O35244	Péroxirédoxine 6	0	1,87 ± 0,23	Induite	Thrénine ¹⁷⁷	Wu <i>et al</i> , 2009
<i>Enzymes du métabolisme</i>							
6	P04764	α -énolase	0	2,68 ± 0,86	> 4,6	Tyrosine ⁴⁴	Tanaka <i>et al</i> , 1995
7			0,76 ± 0,44	1,95 ± 0,35			
8			1,43 ± 0,87	2,93 ± 1,08			
9			0	2,58 ± 0,35			
18	O55171	Acyl-coenzyme A thioesterase 2	0	2,40 ± 0,55	Induite	Non décrit	
22	Q99NA5	Sous-unité α de l'isocitrate déshydrogénase	0	2,45 ± 0,27	Induite	Sérine ¹¹³	Dean <i>et al</i> , 1989
23				1,60 ± 0,13		Thrénine ³⁴⁹	Reinders <i>et al</i> , 2007
26	P42123	Chaîne B de la L-lactate déshydrogénase	1,33 ± 0,56	6,79 ± 0,64	> 5,1	Non décrit	
29	P15429	β -énolase	14,24 ± 3,31	0	Supprimé	Sérine ⁸³ et 263	Chiou <i>et al</i> , 2010
38	P11884	Aldéhyde déshydrogénase	3,45 ± 0,17	1,44 ± 0,17	< 2,4	Sérine ⁵⁰⁰	Reinders <i>et al</i> , 2007
49	P11980	Isozyme M1/M2 de la pyruvate kinase	0	2,47 ± 0,40	Induite	Phosphothrénine Phosphosérine	Soderling <i>et al</i> , 1986
56	O88989	Malate déshydrogénase	2,92 ± 0,14	1,01 ± 0,36	> 2,9	Sérine ¹¹⁷	Reinders <i>et al</i> , 2007
62	P00564	Créatine kinase type M	0	3,95 ± 0,96	Induite	Thrénine ^{274, 282, 289, 322 et 327}	Stolz <i>et al</i> , 2002
65				4,36 ± 1,29		Tyrosine ¹⁵¹	Lewandrowski <i>et al</i> , 2008
<i>Protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale</i>							
11	Q68FY0	Sous-unité 1 du complexe cytochrome b-c1	1,21 ± 0,72	0	Supprimé	Sérine ¹⁴¹	Reinders <i>et al</i> , 2007
44	Q68FT1	Protéine COQ9	2,32 ± 0,53	0	Supprimé	Tyrosine ¹³⁹	
50	Q66HF1	Sous-unité de 75 kDa de la NADH-ubiquinone oxidoréductase	1,35 ± 0,22	0	Supprimé	Sérine ²⁷	Reinders <i>et al</i> , 2007
51						Thrénine ²⁸	

Table XIX (suite)

N°spot	N°accession	Nom protéine	Moyenne ± SEM du ratio Pro-Q / Témoin IC		Facteur de variation	Site de phosphorylation connus	Références
<i>Protéines impliquée dans la synthèse de l'ATP</i>							
32	P15999	Sous-unité α de l'ATP synthase	0	14,67 ± 1,13	Induite	Sérine ^{65 et 178}	Boja <i>et al.</i> , 2009 Reinders <i>et al.</i> , 2007
10	P10719	ATP synthase béta	0,90 ± 0,54	1,93 ± 0,60	> 4,9	Sérine ^{10, 263 et 373}	Arrell <i>et al.</i> , 2006 Reinders <i>et al.</i> , 2007
53			0,73 ± 0,73	2,00 ± 1,47		Thréonine ^{107, 112, 237, 262, 312 et 368}	
54			0	3,96 ± 0,93			
24	P31399	Sous-unité D de l'ATP synthase	6,15 ± 3,36	3,88 ± 1,31	< 1,6	Non décrit	
<i>Protéines impliquée dans la voie de la kinine</i>							
1	P05545	Inhibiteur de sérine protéase A3K	1,48 ± 0,62	10,69 ± 4,48	> 5,9	Non décrit	
2			2,69 ± 1,18	2,18 ± 0,48			
3			0	6,94 ± 1,33			
4			0	4,86 ± 1,18			
<i>Protéines impliquée dans la régulation de la pression osmotique</i>							
68	P02770	Précurseur de la sérum albumine	4,22 ± 1,68	0,46 ± 0,27	< 10,5	Phosphotyrosine	Gerasimova <i>et al.</i> , 2008
69			3,02 ± 0,13	0,23 ± 0,23			
<i>Protéines du myofilaments</i>							
5	P48675	Desmine	0	3,26 ± 2,27	> 5	Sérine ^{12, 29, 38 et 59}	Kitamura <i>et al.</i> , 1989
45			0,89 ± 0,52	1,19 ± 0,72		Thréonine ^{16, 75 et 76}	Inada <i>et al.</i> , 1998
28	P04692	α -tropomyosine	4,91 ± 3,06	1,26 ± 0,74	< 5,5	Sérine ²⁸³	Mak <i>et al.</i> , 1978
30			4,85 ± 3,16	0			
31			1,24 ± 0,84	0,35 ± 0,21			
55			1,04 ± 0,65	0,60 ± 0,60			
34	P50753	Troponine T	18,06 ± 0,98	4,61 ± 2,66	< 4,3	Sérine ²⁰⁸	Sumandea <i>et al.</i> , 2009
35			15,37 ± 2,23	2,64 ± 0,95		Thréonine ¹⁹⁰	Jacquet <i>et al.</i> , 1995
36			9,58 ± 1,22	2,88 ± 1,66			
37	P16409	MLC-1/3	0	2,59 ± 0,09	> 12,2	Sérine ¹⁹⁵	Arrell <i>et al.</i> , 2001
47			1,20 ± 0,43	7,65 ± 2,33		Thréonine ⁶⁴	
63			0	4,36 ± 1,29			
40	P08733	MLC-2	3,19 ± 0,39	0	Supprimé	Sérine ^{1, 2 et 19}	Pearson <i>et al.</i> , 1984
41			3,56 ± 2,15	0,39 ± 0,20			Kawamoto <i>et al.</i> , 1989
67			18,22 ± 1,00	0			
57	P63269	Actine γ	1,85 ± 0,66	35,58 ± 4,18	> 19,2	Tyrosine ⁵³	Liu <i>et al.</i> , 2006

Le numéro de spot correspond au spot polypeptidique annoté sur le gel de la Figure 56. Les attributions des noms et des fonctions ont été faites selon les informations présentées dans la base de données UniProtKB/Swiss-Prot et UniProtKB/TrEMBL mises à jour du 10 août 2010.

Parmi ces trente protéines, vingt-trois ont été décrites dans la littérature comme étant phosphorylées, ce qui valide l'utilisation du Pro-Q®Diamond pour détecter et quantifier les protéines phosphorylées.

III) Discussion

Dans un premier temps, nous avons mis au point la coloration au Pro-Q®Diamond afin de détecter l'ensemble des protéines phosphorylées du VG. Cette coloration permet de visualiser et de quantifier l'ensemble des protéines phosphorylées [Steinberg *et al.* 2003]. Cependant, cette coloration reste peu sensible puisqu'elle nécessite l'utilisation de cinq cent µg de protéines du VG par gel d'électrophorèse 2D. Nous avons ensuite effectué l'analyse différentielle du phosphoprotéome du VG et mis en évidence des modulations du niveau de phosphorylation de trente protéines dans le VG des rats IC.

Contrairement à l'analyse du protéome, l'analyse du phosphoprotéome du VG a révélé des modulations du niveau de phosphorylation de six protéines contractiles, qui sont la desmine, l' α -tropomyosine 1, la TnT, la MLC-1/3, la MLC-2 et l'actine γ ainsi que l' α B-crystalline, une protéine de choc thermique impliquée notamment dans l'assemblage des filaments d'actine [Singh *et al.* 2007]. Ces résultats confirment l'importance de cette modification post-traductionnelle dans le mécanisme de la contraction cardiaque.

La technique de coloration au Pro-Q®Diamond permet de visualiser et quantifier les protéines phosphorylées indépendamment de l'acide amine phosphorylé [Steinberg *et al.* 2003]. Il est donc important de déterminer par la suite l'acide aminé phosphorylé (sérine, thréonine ou tyrosine) afin d'affiner les résultats. De plus, l'analyse protéomique est une technique globale, donnant accès à de nombreuses informations sur un échantillon. Les résultats obtenus doivent donc être validés par des techniques complémentaires, telles que le western blot ou l'ELISA. Au vu des résultats intéressants concernant les protéines contractiles, ainsi que l'implication de la perte de la fonction contractile observées lors du RVG, nous avons sélectionné cette catégorie de protéines afin de poursuivre cette analyse.

*Partie 3 : Rôle de la balance
phosphorylation / O-GlcNAcylation
dans l'insuffisance cardiaque*

I) Objectifs de l'étude

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle dynamique et réversible, indispensable à la vie cellulaire dont elle régule tous les aspects [de Graauw *et al.* 2006]. Cette modification est impliquée dans de nombreux processus physiopathologiques, notamment dans les pathologies cardiovasculaires [Shchemelinin *et al.* 2006]. De plus, l'implication de la phosphorylation dans le mécanisme de contraction cardiaque est bien décrit. La phosphorylation de la TnT, de la TnI ou de la MLC-2 induit notamment un ralentissement de la cinétique de formation des ponts actine-myosine [Noland, Jr. *et al.* 1992]. Des sites de phosphorylation ont également été décrits pour la MLC-1/3 [Arrell *et al.* 2001a], l' α -tropomyosine 1 [Mak *et al.* 1978] ou la desmine [Kitamura *et al.* 1989], [Inada *et al.* 1998].

La *O*-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle analogue à la phosphorylation. Ces deux modifications peuvent intervenir sur des résidus identiques ou adjacents au cours d'un mécanisme appelé balance phosphorylation / *O*-GlcNAcylation [Slawson *et al.* 2003]. De plus, des sites de *O*-GlcNAcylation ont récemment été décrits pour certaines protéines contractiles telles que la MLC-1/3 et la MLC-2 [Ramirez-Correa *et al.* 2008].

L'objectif de cette étude est dans un premier temps de valider les résultats obtenus lors de l'analyse du phosphoprotéome. Pour cela, nous déterminerons le type d'acide aminé phosphorylé pour chacune des protéines contractiles identifiées, puis nous quantifierons les modulations de phosphorylation de ces protéines.

Par la suite, nous quantifierons également les modulations du niveau de *O*-GlcNAcylation de ces protéines afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le RVG post-IDM.

Enfin, nous étudierons l'effet de ces modulations sur la fonction cardiaque.

II) Résultats

III) Résultats complémentaires

1 Modulation du niveau de phosphorylation et de O-GlcNAcylation de l'actine γ

Nous avons réalisé une analyse différentielle du phosphoprotéome du VG à deux mois post-ligature par gels d'électrophorèse 2D puis validé les résultats obtenus par immunoprécipitation et western blot pour cinq protéines contractiles, qui sont la desmine, l' α -tropomyosine 1, la MLC-1/3, la MLC-2 et l' α B-crystalline. Afin de compléter les résultats de cette analyse, nous nous sommes également intéressés aux modulations du niveau de phosphorylation de l'actine γ , également identifiée lors de l'analyse du phosphoprotéome du VG.

Comme pour les autres protéines contractiles, nous avons d'abord déterminé le type d'acide aminé phosphorylé ainsi que l'existence d'une forme O-GlcNAcylée de cette protéine. Pour cela, nous avons immunoprécipité les protéines phosphorylées sur les résidus de sérine, de thréonine, de tyrosine ou O-GlcNAc puis nous avons effectué un western blot dirigé spécifiquement contre l'actine γ (Figure 57).

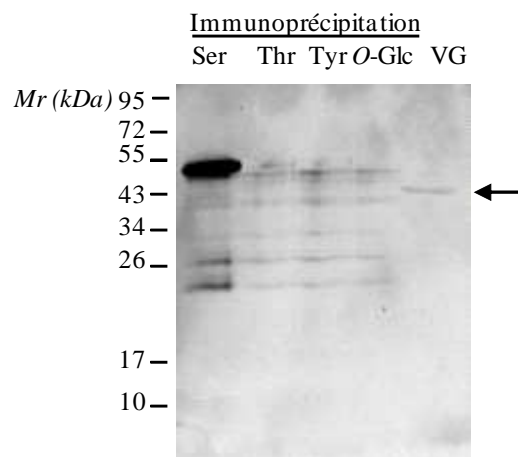


Figure 57 : Détection d'une forme phosphorylée ou O-GlcNAcylée de l'actine γ dans le VG de rats témoins. Immunoprécipitation et western blot dirigé spécifiquement contre l'actine γ . L'immunoprécipitation est réalisée à partir de 50 μ g de protéines du VG et 1 μ g d'anticorps dirigé spécifiquement contre les résidus phosphorylés de sérine (Ser), thréonine (Thr), tyrosine (Tyr) phosphorylés ou O-GlcNAcylés (O-Glc). Le western blot est effectué avec un anticorps dirigé spécifiquement contre l'actine γ dilué au 1/2500, l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase est dilué au 1/5000. La flèche indique la taille attendue pour l'actine γ .

Malheureusement, nous n'avons pas mis en évidence de forme phosphorylée ou O-GlcNAcylée de l'actine γ dans le VG de rat témoins ou IC, alors que cette protéine est présente dans le VG avec une *Mr* de 43 kDa, comme montré par western blot (Figure 57).

2 Détection des protéines contractiles dans le plasma

Nous avons également déterminé si certaines des protéines contractiles étudiées étaient détectées dans le plasma de rats. Nous ne nous sommes pas intéressés à l' α B-crystalline pour laquelle les tests avaient été effectués précédemment (Figure 51) ni à l'actine γ pour laquelle nous n'avons pas mis en évidence de forme phosphorylée ou O-GlcNAcylée (Figure 57).

Nous avons testé si la desmine, l' α -tropomyosine 1, la MLC-1/3 et la MLC-2 pouvaient être détectées dans le plasma. Pour cela, nous avons effectué un western blot dirigé spécifiquement contre chacune de ces protéines à partir de 1 μ L de plasma de rat afin de détecter la protéine totale. Nous avons également effectué une immunoprécipitation des protéines phosphorylées sur les résidus de sérine (pour la desmine, l' α -tropomyosine 1 et la MLC-2 phosphorylée) ou de tyrosine (pour la MLC-1/3) puis un western blot dirigé spécifiquement contre les protéines d'intérêt afin de mettre en évidence, dans le plasma de rat, la forme phosphorylée de ces protéines. Les résultats obtenus pour la MLC-1/3 sont présentés dans la Figure 58.

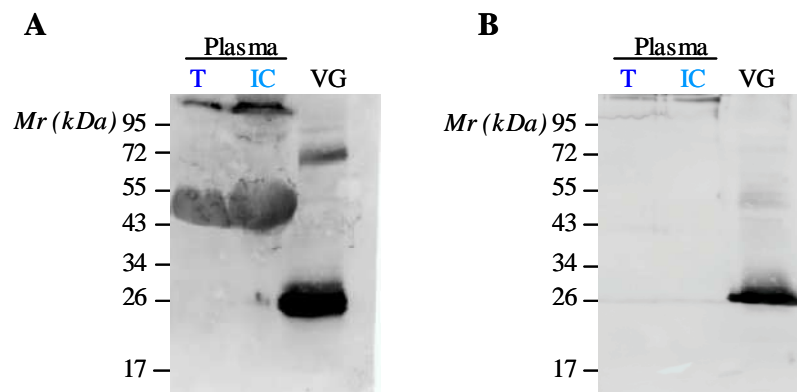


Figure 58 : Détection de la MLC-1/3 et de sa forme phosphorylée dans le plasma de rats témoins. (A) Western blot dirigé spécifiquement contre la MLC-1/3. (B) Immunoprécipitation des phosphotyrosines phosphorylées et western blot dirigé spécifiquement contre la MLC-1/3. L'immunoprécipitation est réalisée à partir de 1 μ L de plasma et 1 μ g d'anticorps dirigé spécifiquement contre les résidus de tyrosine phosphorylées. Le western blot est effectué avec un anticorps dirigé spécifiquement contre la MLC-1/3 dilué au 1/2000, l'anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxydase est dilué au 1/10000.

Malheureusement, nous n'avons détecté aucune de ces protéines ou leurs formes phosphorylées dans le plasma des rats témoins ou IC, bien qu'elles soient détectées sans aucun problème dans le VG (Figure 58).

3 Effet de la PUGNAc chez les rats IC

Nous avons montré dans cette étude que le traitement de rats sains à la PUGNAc induit une augmentation significative des paramètres de contractilité cardiaque. Par ailleurs, ce traitement entraîne une augmentation du niveau de O-GlcNAcylation de la desmine, de la MLC-1/3 et de la MLC-2 ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation sur les résidus de tyrosine de l' α B-crystalline, confirmant l'importance de la balance phosphorylation / O-GlcNAcylation dans le mécanisme de contraction cardiaque.

Afin de compléter ces résultats, il serait intéressant d'étudier les effets de cette inhibition dans un modèle de rats IC. Pour cela, nous avons utilisé le modèle expérimental chez lequel l'ACG a été ligaturé. Les rats ont été sacrifiés à six semaines post-ligature et l'effet de la PUGNAc a été étudié par analyse en cœur perfusé isolé, en collaboration avec l'unité U644 de Rouen.

Dans un premier temps, nous avons vérifié que la taille de l'IDM induit par la ligature coronaire était similaire dans les deux groupes. Pour cela, le VG est immergé dans une solution de formol. Après fixation, le VG est sectionné, perpendiculairement à l'axe apex-base, en trois sections d'épaisseur identique. Des coupes histologiques en paraffine de 3 μ m d'épaisseur sont alors réalisées et colorées au rouge Sirius. Pour la mesure de la taille de l'IDM, les lames sont observées par vidéomicroscopie (Microwatcher VS-30H, Mitsubishi Kasei Coop) au grossissement 20. Les périmètres endocardiques et épicaudiques de la zone infarctée et du VG sont déterminés par le logiciel d'analyse d'image (Cyberview, Cervus International). La taille de l'IDM représente (périmètre endocardique + périmètre épicaudique de la zone infarctée) / (périmètre endocardique + périmètre épicaudique du VG) et est exprimée en pourcentage. Les résultats obtenus pour les rats IC et IC traités à la PUGNAc sont présentés en (Table XX).

Table XX : Valeur de la mesure de la taille de l'IDM.

catégorie	numéro du rat	% IDM
IC	111	54,4
	112	74,7
	113	60,9
	116	65,5
	117	58,1
IC + PUGNAc 200µM	212	71,5
	214	51,1
	215	74,6
	219	63,0
	220	71,2
	221	45,0

Nous avons observé une reproductibilité de la taille de l'IDM chez tous les rats. Le traitement court par la PUGNAc (200µM, deux heures) n'a eu aucun effet sur la taille de l'IDM (rats IC : $62,7 \pm 3,5$; rats IC traités à la PUGNAc ; $62,7 \pm 5$).

Nous avons également contrôlé l'activité O-GlcNAcase par dosage enzymatique afin de vérifier l'efficacité de la PUGNAc, un inhibiteur de la O-GlcNAcase (Figure 59).

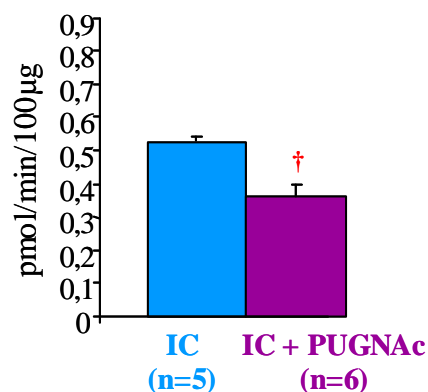


Figure 59 : Quantification de l'activité O-GlcNAcase dans le VG issu de cœurs isolés perfusés de rats IC et IC traités à la PUGNAc. L'activité O-GlcNAcase a été quantifiée dans le VG (50 µg) de rats IC (n=5) et IC traités à la PUGNAc (n=6). Les résultats sont exprimés en pmol/min/100 µg de protéines \pm sem. † p < 0.01.

L'activité O-GlcNAcase est significativement diminuée dans le VG de rats IC traités à la PUGNAc comparé au VG de rats IC (p = 0.005). Ces résultats indiquent l'efficacité d'un traitement de deux heures à la PUGNAc avant de mesurer la fonction cardiaque sur cœur perfusé isolé.

Nous avons alors analysé la fonction cardiaque sur cœur isolé perfusé et obtenu les résultats présentés en Table XXI.

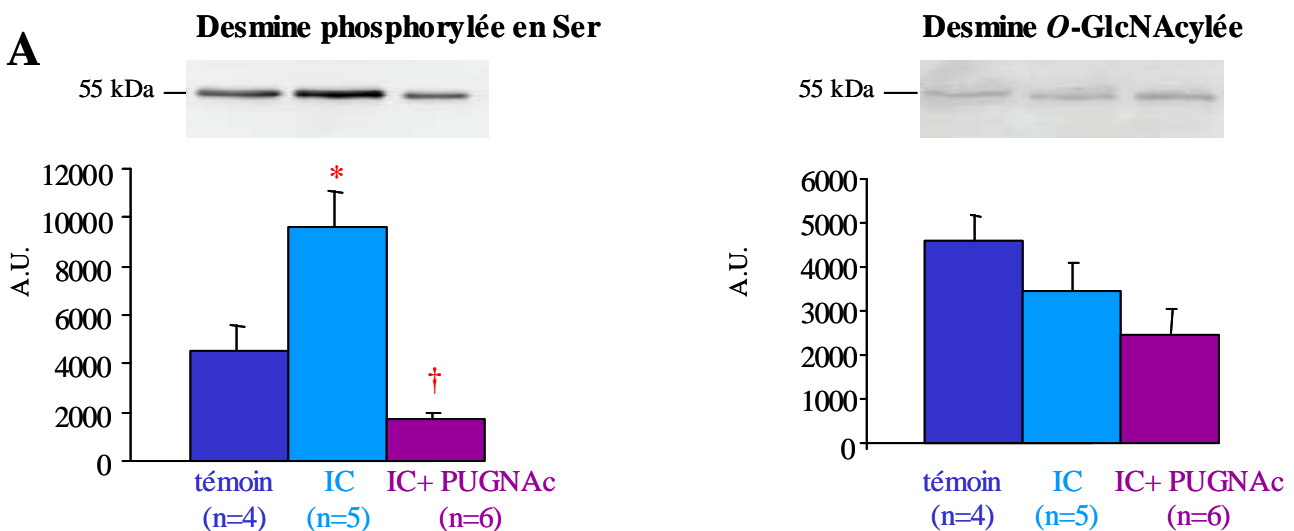
Table XXI : Effet de la PUGNAc sur la contractilité cardiaque.

	Témoin	IC	IC + PUGNAc
n	8	5	6
Pression systolique du VG, mmHg	68±8	28±2 [†]	64±4 [‡]
Pression diastolique du VG, mmHg	12±2	10±1	10±1
Pression développée du VG, mmHg	55±6	18±2 [†]	54±5 [‡]
dP/dt max 10 ³ mmHg/s	16±2	20±2	20±1
dP/dt min 10 ³ mmHg/s	4±1	5±2	4±1
Flux coronaire, mL/min	12±1	15±1	16±1

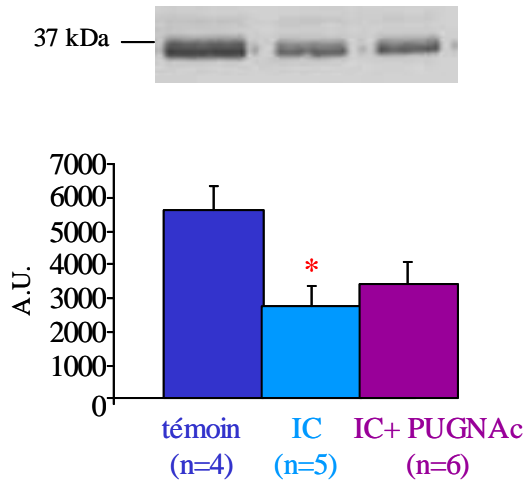
Moyenne ± sem des paramètres de la fonction cardiaque mesurés en cœur perfusé isolé pour les animaux témoins, IC et IC traités à la PUGNAc. [†] p < 0.01, [‡] p < 0.001.

Comparé aux rats témoins, les rats IC présentent une diminution significative de la pression systolique (p=0.001) et développée (p=0.001) du VG. De manière intéressante, ces paramètres reviennent à la normale suite au traitement à la PUGNAc (p=0.001 et p=0.003, respectivement), suggérant un effet bénéfique de l'inhibiteur de la O-GlcNAcase sur la contractilité cardiaque dans l'IC.

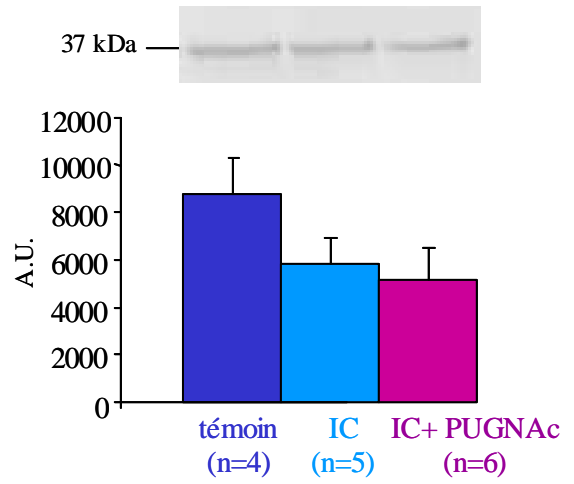
Nous nous sommes donc intéressés aux modulations de phosphorylation et de O-GlcNAcylation des protéines contractiles dans le VG après la mesure des paramètres de contractilité cardiaque, en utilisant les mêmes techniques d'immunoprécipitation et de western blot que précédemment (Figure 60).



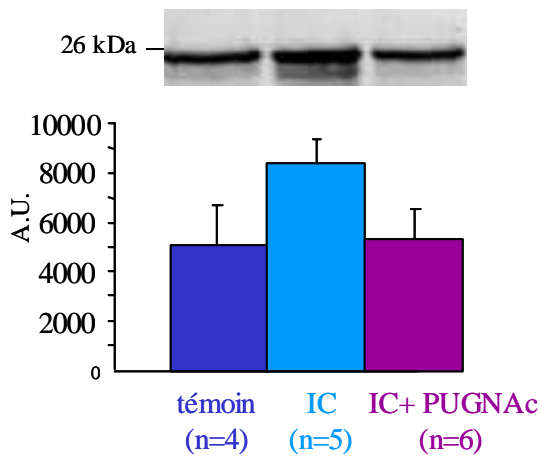
B α Tm1 phosphorylée en Ser



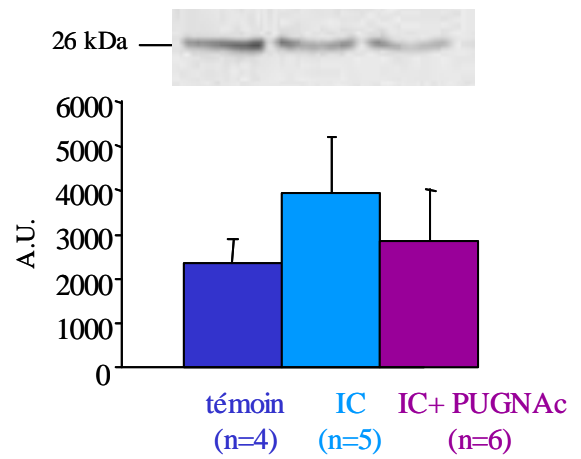
α Tm1 O-GlcNAcylée



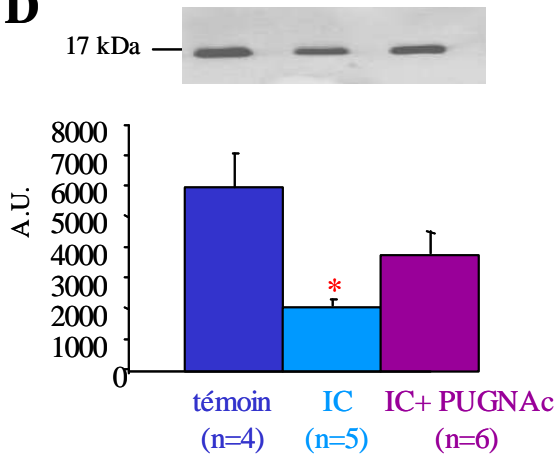
C MLC1/3 phosphorylée en Tyr



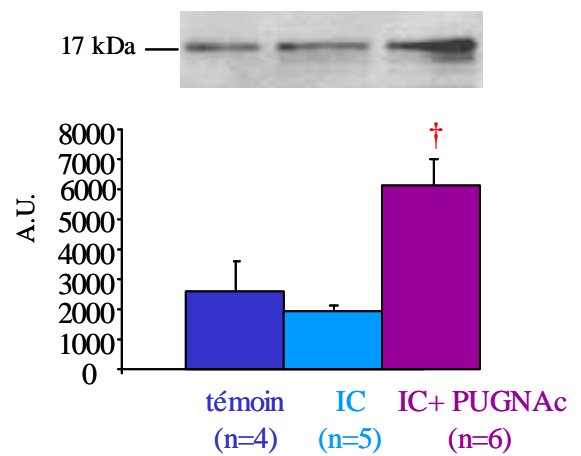
MLC-1/3 O-GlcNAcylée



D MLC-2 phosphorylée en Ser¹⁵



MLC-2 O-GlcNAcylée



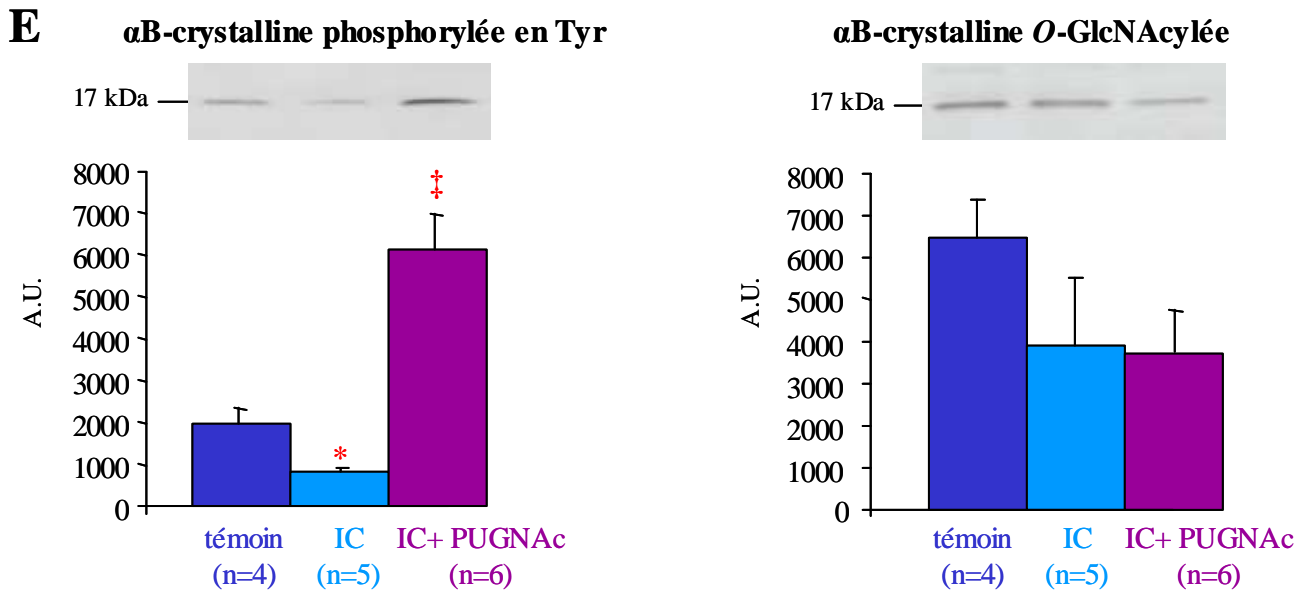


Figure 60 : Quantification de la phosphorylation et de la O-GlcNAcylation des protéines contractiles dans le VG de rats témoins, IC et IC traités à la PUGNAc. L'immunoprécipitation est réalisée à partir de 50 μ g de protéines de VG et de 1 μ g d'anticorps. Le Western blot est dirigé spécifiquement contre les protéines d'intérêt. Le poids moléculaire est indiqué sur la gauche. Les quantifications ont été effectuées chez les rats témoins (n=4), IC (n=5) et IC traités à la PUGNAc (n=6) et sont exprimés en moyenne \pm sem. * $p < 0.05$, † $p < 0.01$, ‡ $p < 0.001$.

Nous avons mis en évidence une augmentation significative de la phosphorylation de la desmine ($p=0.024$) et une diminution significative de la phosphorylation de l' α -tropomyosine 1 ($p=0.022$), de la MLC-2 ($p=0.037$) et de l' α B-crystalline ($p=0.049$) dans le VG des animaux IC non traités par rapport aux animaux témoins non traités. Enfin, le niveau d'expression de ces protéines n'est pas modulé exceptée pour l' α B-crystalline, pour laquelle nous avons observé une augmentation d'expression significative dans le VG des animaux des animaux IC non traités par rapport aux animaux témoins non traités ($p=0.006$).

Par ailleurs, nous avons observé une diminution significative de la phosphorylation de la desmine ($p=0.005$) et une augmentation de la phosphorylation de l' α B-crystalline ($p=0.001$) dans le VG des animaux IC traités à la PUGNAc par rapport aux animaux IC non traités. Nous avons également montré une augmentation significative de la MLC-2 O-GlcNAcylée ($p=0.003$) dans le VG des animaux IC traités à la PUGNAc par rapport aux animaux IC non traités.

IV) Discussion

1 Modifications post-traductionnelles des protéines contractiles

Nous avons effectué l'analyse différentielle du phosphoprotéome du VG dans un modèle expérimental d'IC. Nous avons ainsi sélectionné les protéines contractiles présentant une modulation de leur niveau de phosphorylation dans le VG des rats IC pour la suite de notre analyse.

Dans cette étude, nous avons validé les résultats obtenus lors de l'analyse du phosphoprotéome pour toutes les protéines contractiles identifiées, excepté pour l'actine γ . En effet, nous n'avons pas mis en évidence de forme phosphorylée ou O-GlcNAcylée de cette protéine. Il peut s'agir d'un biais d'identification, puisque l'actine est une protéine majoritaire dans le tissu cardiaque et les techniques de spectrométrie de masse utilisées pour cette étude identifient la protéine majoritaire dans un mélange de protéine. Cependant, un site de phosphorylation, la tyrosine 53, a été décrit pour cette protéine dans une espèce végétale [Liu *et al.* 2006]. Il est donc possible que cette forme phosphorylée existe également chez le rat mais que les techniques d'immunoprécipitation et de western blot utilisées ne soient pas assez sensibles pour détecter la forme phosphorylée de cette protéine dans nos échantillons.

Par la suite, nous avons déterminé si les protéines contractiles ou leurs formes phosphorylées pouvaient être détectées dans le plasma des rats témoins et IC mais nous n'avons pas détecté ces protéines dans le plasma de rat, ce qui pourrait suggérer que ces protéines ne soient pas libérées dans le plasma. Ces résultats sont corrélés par l'absence de description dans la littérature d'une forme plasmatique de la desmine ou de l' α -B cristalline. Cependant, il faut préciser que pour ces tests nous avons utilisé du plasma brut. Il s'agit d'un échantillon biologique simple d'accès mais complexe à analyser puisque les protéines abondantes telles que l'albumine, représentant 60 à 70% des protéines totales, et les immunoglobulines, représentant 10 à 20% des protéines totales, peuvent gêner la détection des protéines peu représentées. Il pourrait être intéressant d'effectuer des tests sur du plasma dans lequel ces protéines majoritaires sont éliminées de manière spécifique par l'utilisation de kits commercialisés permettant l'élimination de l'albumine et des immunoglobulines, soit égalisées, afin d'enrichir l'échantillon en protéines peu abondantes [Fertin *et al.* 2010a], [Beseme *et al.* 2010]. L' α -tropomyosine 1 a notamment été identifiée dans le plasma après déplétion [de Roos *et al.* 2008]. De plus, la MLC-1/3 et la MLC-2 ont été décrites dans le plasma et le sérum avec une concentration maximale de 30 ng/mL [Isobe *et al.* 1989], alors que la concentration normale en albumine est de 38 à 48 mg/mL. Nous pouvons faire

l'hypothèse que les techniques utilisées pour cette analyse ne soient pas assez sensibles pour détecter cette gamme de concentration dans le plasma des rats.

2 Effet des modifications de O-GlcNAcylation sur la fonction cardiaque

Nous avons ensuite étudié l'effet d'une augmentation du niveau de protéines O-GlcNAcylées sur la fonction cardiaque. Pour cela, nous avons administré un inhibiteur de la O-GlcNAcase, la PUGNAc, à des rats sains et IC pendant deux heures avant d'analyser les paramètres cardiaques par la technique de cœur perfusé isolé. En effet, cette méthode nous donne accès aux pressions cardiaques ainsi qu'aux constantes de contraction et de relaxation [Mulder *et al.* 2004]. Il s'agit d'une technique bénéficiant d'une bonne reproductibilité et permettant de mettre en évidence les effets bénéfiques ou délétères des substances injectées aux animaux [Skrzypiec-Spring *et al.* 2007].

Nous avons alors montré que le traitement de rats sains et IC à la PUGNAc induit une augmentation significative des paramètres de contractilité cardiaque. Par ailleurs, ce traitement entraîne des modulations du niveau de phosphorylation et de O-GlcNAcylation des protéines contractiles. De manière intéressante, ces modulations sont inverses à celles observées lors du RVG post-IDM. Ces résultats suggèrent que l'effet bénéfique sur la fonction cardiaque de l'augmentation de la O-GlcNAcylation est associé aux modifications post-traductionnelles des protéines contractiles.

*Partie 4 : Diminution de la troponine T
phosphorylée, un nouveau biomarqueur du
remodelage ventriculaire gauche*

I) Objectif de l'étude

L'étude du phosphoprotéome du VG nous a permis de mettre en avant l'importance de la phosphorylation dans les mécanismes physiopathologiques du RVG post-IDM. De plus, l'étude de la balance phosphorylation / O-GlcNAcylation des protéines contractiles dans l'IC a mis en évidence l'importance des protéines contractiles dans les mécanismes physiopathologiques du RVG post-IDM.

Parmi les protéines contractiles identifiées lors de l'analyse du phosphoprotéome, nous nous sommes particulièrement intéressés à la troponine T (TnT). En effet, cette protéine est connue pour être actuellement le meilleur biomarqueur de l'IDM [Moe *et al.* 2010]. Elle est facilement détectable dans le plasma humain et pourrait à ce titre être utilisée comme biomarqueur du RVG post-IDM.

L'objectif de cette étude consiste à démontrer que la diminution de la phosphorylation de la troponine T peut être un nouveau biomarqueur du RVG post-IDM.

II) Résultats

III) Discussion

Dans cette étude, nous avons mis en évidence une diminution de la TnT phosphorylée dans le VG et le plasma de rats IC. Cette diminution a également été retrouvée dans le plasma de patients de l'étude REVE-1, présentant un RVG post-IDM modéré à important. Ces résultats suggèrent que la diminution de la TnT phosphorylée peut être un nouveau biomarqueur du RVG post-IDM. Il est cependant essentiel de valider ces résultats à plus grande échelle. En effet, le western blot reste une technique semi-quantitative, il est donc nécessaire de confirmer ces résultats par une technique spécifique, reproductible, quantitative et plus adaptée aux grandes séries d'échantillon. Pour cela, nous avons produits des anticorps monoclonaux afin de développer un dosage ELISA de la TnT phosphorylée plasmatique.

Il est également important d'étudier les mécanismes physiopathologiques conduisant à la diminution de la TnT phosphorylée lors du RVG post-IDM, notamment par l'étude des enzymes impliquées dans cette phosphorylation. Enfin au vu des résultats obtenus pour les autres protéines contractiles, il semble également intéressant d'analyser la balance phosphorylation / O-GlcNAcylation de la TnT lors du RVG post-IDM.

*Partie 5 : Voies de signalisation impliquées
dans la diminution de la troponine T
phosphorylée*

I) Objectifs de l'étude

Dans l'étude précédente, nous avons mis en évidence une diminution de la TnT phosphorylée en sérine²⁰⁸ dans le VG et le plasma de rats IC comparé aux rats témoins [Dubois *et al.* 2010]. L'objectif de ce travail est d'étudier les mécanismes physiopathologiques conduisant à cette diminution de la TnT phosphorylée en sérine²⁰⁸ lors du RVG post-IDM, notamment par l'étude des enzymes impliquées dans cette modulation de la phosphorylation.

Nous avons ensuite analysé l'effet de l'inhibition des enzymes impliquées dans la modulation de la phosphorylation sur la fonction cardiaque et sur les modifications post-traductionnelles des protéines contractiles.

Enfin, au vu des résultats obtenus lors de l'étude des protéines contractiles, il semble également intéressant d'analyser la balance phosphorylation / O-GlcNAcylation de la TnT lors du RVG post-IDM.

II) Résultats

III) Résultats complémentaires

1 Balance phosphorylation / O-GlcNAcylation de la TnT

Dans l'étude précédente, nous avons mis en évidence une diminution de la TnT phosphorylée en sérine²⁰⁸ dans le VG et le plasma de rats IC. Il nous a semblé intéressant de regarder si la TnT pouvait porter des sites de O-GlcNAcylation et si son niveau de O-GlcNAcylation pouvait être modulé dans le VG et le plasma de rats IC comparés aux VG de rats témoins. Pour cela, nous avons immunoprécipités les protéines O-GlcNAcylées à partir du VG et du plasma de rat puis effectué un western blot dirigé spécifiquement contre la TnT (Figure 61).

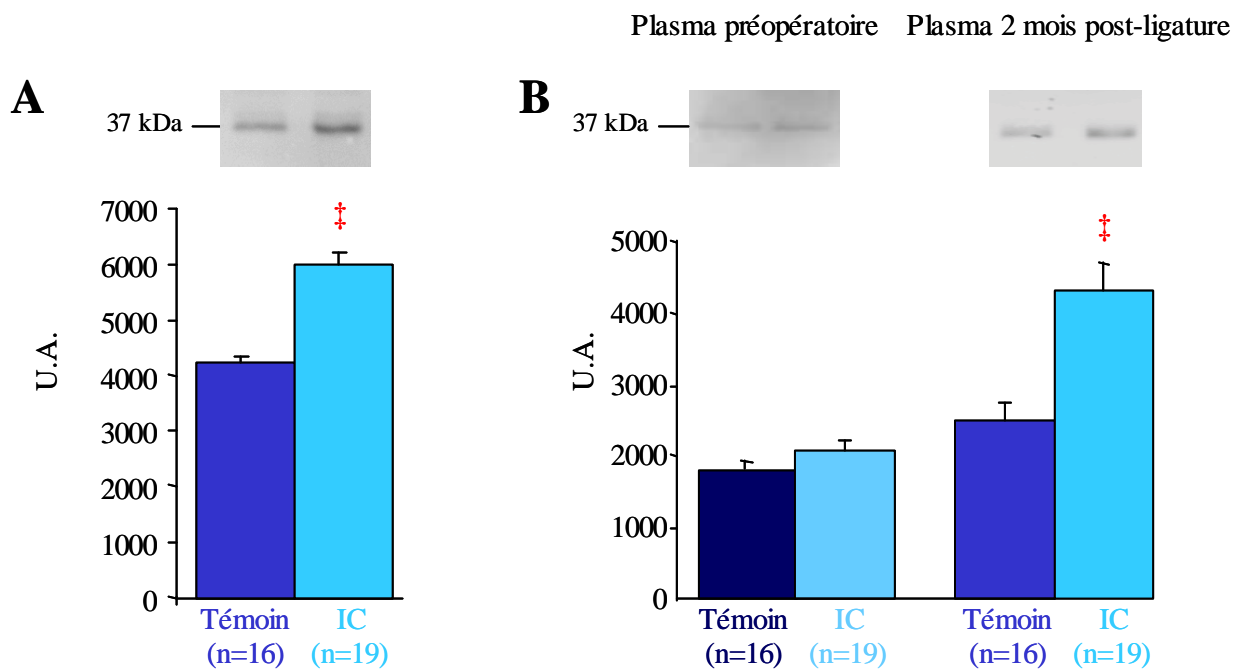


Figure 61 : Quantification de la TnT O-GlcNAcylée dans le VG et le plasma de rats témoins et IC. (A) Quantification de la TnT O-GlcNAcylée dans le VG. **(B)** Quantification de la TnT O-GlcNAcylée dans le plasma. L'immunoprécipitation est réalisée à partir de 50 µg de protéines de VG ou 1 µL de plasma et de 1 µg d'anticorps. Le Western blot est dirigé spécifiquement contre la TnT dilué au 1/100, l'anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxydase est dilué au 1/5000. Le poids moléculaire est indiqué sur la gauche. Les quantifications ont été effectuées chez les rats témoins (n=16) et IC (n=19) et sont exprimés en moyenne ± sem. ‡ p < 0.001.

Nous avons montré, pour la première fois, l'existence d'une forme O-GlcNAcylée de la TnT. Nous avons également mis en évidence une augmentation significative de la TnT O-GlcNAcylée dans le VG et dans le plasma des rats IC à 2 mois post-ligature comparé aux rats témoins. Ces résultats suggèrent une balance phosphorylation / O-GlcNAcylation de la TnT lors du développement de l'IC.

2 Effet de l'inhibition de la PKC sur la balance phosphorylation / O-GlcNAc de la TnT

Nous avons voulu déterminer si le traitement par les inhibiteurs de la PKC induisait des modifications de O-GlcNAcylation de la TnT. Nous avons alors étudié le niveau de TnT O-GlcNAcylée dans le VG des animaux non traités ou traités avec la Calphostine C ou et avec l'inhibiteur ϵ V1-2. Pour cela, nous avons immunoprécipités les protéines O-GlcNAcyliées à partir du VG puis effectué un western blot dirigé spécifiquement contre la TnT (Figure 62).

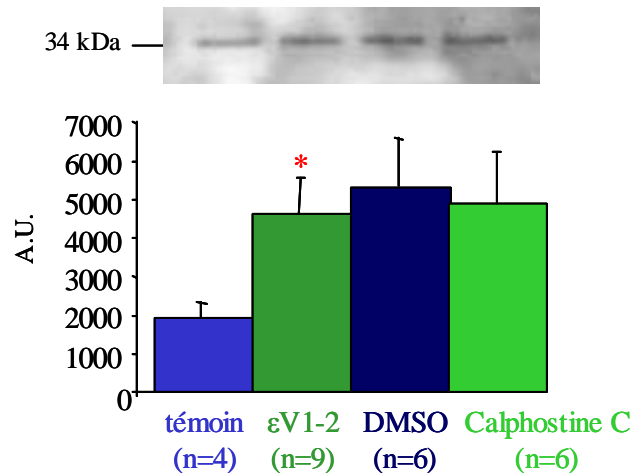


Figure 62 : Quantification de la TnT O-GlcNAcyliée dans le VG de rats témoins et traités à la Calphostine C ou avec l'inhibiteur ϵ V1-2. L'immunoprécipitation est réalisée à partir de 50 μ g de protéines de VG et de 1 μ g d'anticorps. Le Western blot est dirigé spécifiquement contre la TnT dilué au 1/100, l'anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxydase est dilué au 1/5000. Le poids moléculaire est indiqué sur la gauche. Les quantifications ont été effectuées chez les rats témoins (n=4), traités avec l'inhibiteur ϵ V1-2 (n=9), traités au DMSO (n=6) et traités à la Calphostine C (n=6) et sont exprimés en moyenne \pm sem. * p < 0.05.

Par cette technique, nous avons mis en évidence une augmentation significative de la TnT O-GlcNAcyliée dans le VG des animaux traités avec l'inhibiteur ϵ V1-2 comparé aux animaux témoins (p=0.026), aucune modification chez les animaux traités à l'inhibiteur non sélectif des PKC Calphostine C comparés aux animaux traités au DMSO 1%.

Ces résultats confirment l'existence d'une balance phosphorylation / O-GlcNAcylation de la TnT, impliquées dans le mécanisme de contraction cardiaque.

Afin de compléter ces résultats, nous avons étudié les effets de cette inhibition dans un modèle de rats IC. Pour cela, nous avons utilisé le modèle expérimental chez lequel l'ACG a été ligaturé. Les rats ont été sacrifiés à six semaines post-ligature et l'effet de l'inhibiteur ϵ V1-2 a été étudié par analyse en cœur perfusé isolé, en collaboration avec l'unité U644 de Rouen. Dans un premier temps, nous avons vérifié que la taille de l'IDM induit par la ligature coronaire était similaire dans les deux groupes (Table XXII).

Table XXII : Valeur de la mesure de la taille.

catégorie	numéro du rat	% IDM
IC	111	54,4
	112	74,7
	113	60,9
	116	65,5
	117	58,1
IC + εV1-2 200μM	311	62,3
	315	42,4
	317	59,2
	320	93,5

Nous avons observé une reproductibilité de la taille de l'IDM chez tous les rats. Le traitement court par l'inhibiteur εV1-2 (200μM, une heure) n'a eu aucun effet sur la taille de l'IDM (rats IC : $62,7 \pm 3,5$; rats IC traités à l'inhibiteur εV1-2 ; $64,4 \pm 10,5$).

Nous avons également contrôlé l'activité PKC par dosage enzymatique afin de vérifier l'efficacité de l'inhibiteur εV1-2 (Figure 63).

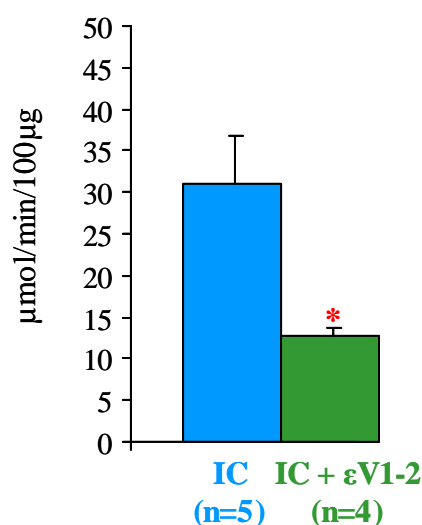


Figure 63 : Quantification de l'activité PKC dans le VG issu de cœurs isolés perfusés de rats IC et IC traités à l'inhibiteur εV1-2. L'activité PKC a été quantifiée dans le VG (1 μg) de rats IC (n=5) et IC traités avec l'inhibiteur εV1-2 (n=4). Les résultats sont exprimés en pmol/min/100 μg de protéines ± sem. * p < 0.05.

L'activité PKC est significativement diminuée dans le VG de rats IC traités avec l'inhibiteur εV1-2 comparé au VG de rats IC (p = 0.030). Ces résultats indiquent l'efficacité d'un traitement d'une heure avec l'inhibiteur sélectif de l'isoforme ε de la PKC avant de mesurer la fonction cardiaque sur cœur perfusé.

Nous avons alors analysé la fonction cardiaque sur cœur isolé perfusé et obtenus les résultats présentés en Table XXIII.

Table XXIII : Effet de l'inhibiteur εV1-2 sur la contractilité cardiaque.

	Témoin	IC	IC + εV1-2
n	8	5	4
Pression systolique du VG, mmHg	68±8	28±2 [†]	31±2
Pression diastolique du VG, mmHg	12±2	10±1	10±1
Pression développée du VG, mmHg	55±6	18±2 [†]	21±2
dP/dt max 10 ³ mmHg/s	16±2	20±2	21±4
dP/dt min 10 ³ mmHg/s	4±1	5±2	4±1
Flux coronaire, mL/min	12±1	15±1	16±3

Moyenne ± sem des paramètres de la fonction cardiaque mesurés en cœur perfusé isolé pour les animaux témoins, IC et IC traités avec l'inhibiteur εV1-2. [†] p < 0.01.

Le traitement de rats IC avec l'inhibiteur εV1-2 ne semble pas moduler la fonction cardiaque comparé aux rats IC.

Nous nous sommes intéressés aux modulations des niveaux de phosphorylation et de O-GlcNAcylation de la TnT dans le VG des rats IC et IC traités avec l'inhibiteur εV1-2 en utilisant les mêmes techniques d'immunoprécipitation et de western blot que précédemment (Figure 64).

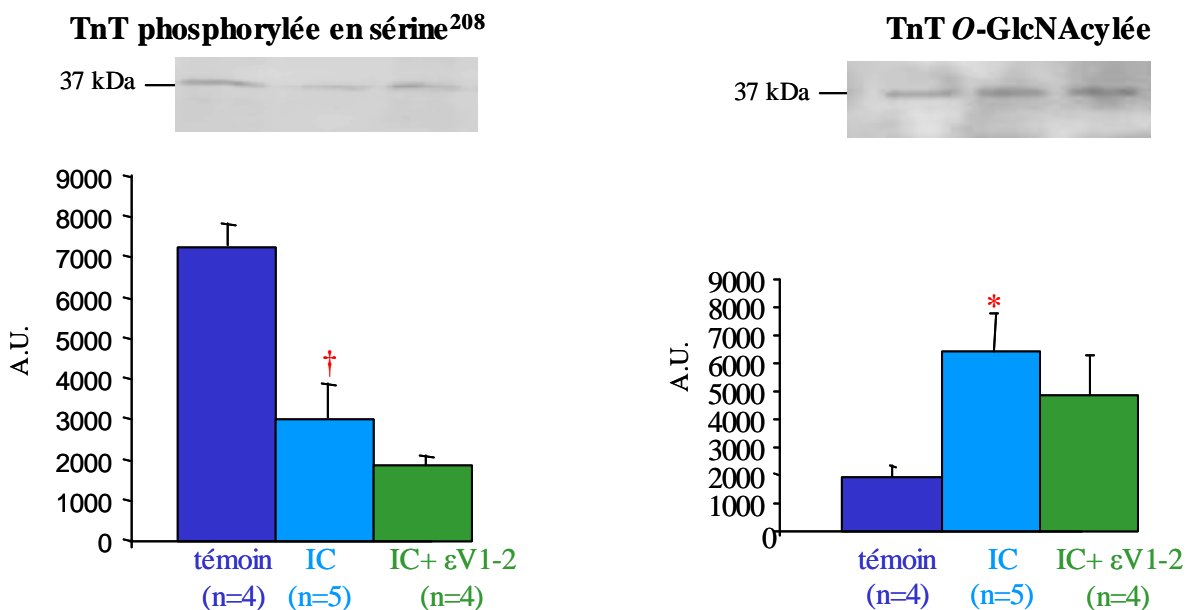


Figure 64 : Quantification de la TnT phosphorylée en sérine²⁰⁸ et O-GlcNAcylée dans le VG de rats témoins, IC et IC traités avec l'inhibiteur εV1-2. L'immunoprécipitation est réalisée à partir de 50 µg de protéines de VG et de 1 µg d'anticorps. Le Western blot est dirigé spécifiquement contre la TnT phosphorylée en sérine²⁰⁸ dilué au 1/1000 ou la TnT dilué en 1/100. Le poids moléculaire est indiqué sur la gauche. Les quantifications ont été effectuées chez les rats témoins (n=4), IC (n=5), IC traités avec l'inhibiteur εV1-2 (n=4) et sont exprimés en moyenne ± sem. * p < 0.05, [†] p < 0.01.

De manière intéressante, nous retrouvons une diminution significative de la TnT phosphorylée en sérine²⁰⁸ et une augmentation significative de la TnT O-GlcNAcylée dans le VG des rats IC comparé aux rats témoins. Par ailleurs, nous n'observons pas de modulation

de la TnT phosphorylée en sérine²⁰⁸ et de la TnT O-GlcNAcylée dans le VG des rats IC traités avec l'inhibiteur εV1-2 comparé aux rats IC.

3 Effet de la PUGNAc sur la balance phosphorylation / O-GlcNAc de la TnT

Nous avons montré dans une étude précédente que le traitement de rats sains ou IC avec la PUGNAc, un inhibiteur de la O-GlcNAcase, induit une augmentation significative des paramètres de contractilité cardiaque. Nous avons alors étudié l'effet de cet inhibiteur sur le niveau de la TnT phosphorylée en sérine²⁰⁸ et de la TnT O-GlcNAcylée dans le VG des animaux sains et IC non traités ou traités avec la PUGNAc. Pour cela, nous avons effectué un western blot dirigé spécifiquement contre la TnT et la TnT phosphorylée en sérine²⁰⁸. Pour la TnT O-GlcNAcylée, nous avons immunoprécipités les protéines O-GlcNAcylées à partir du VG puis effectué un western blot dirigé spécifiquement contre la TnT (Figure 65).

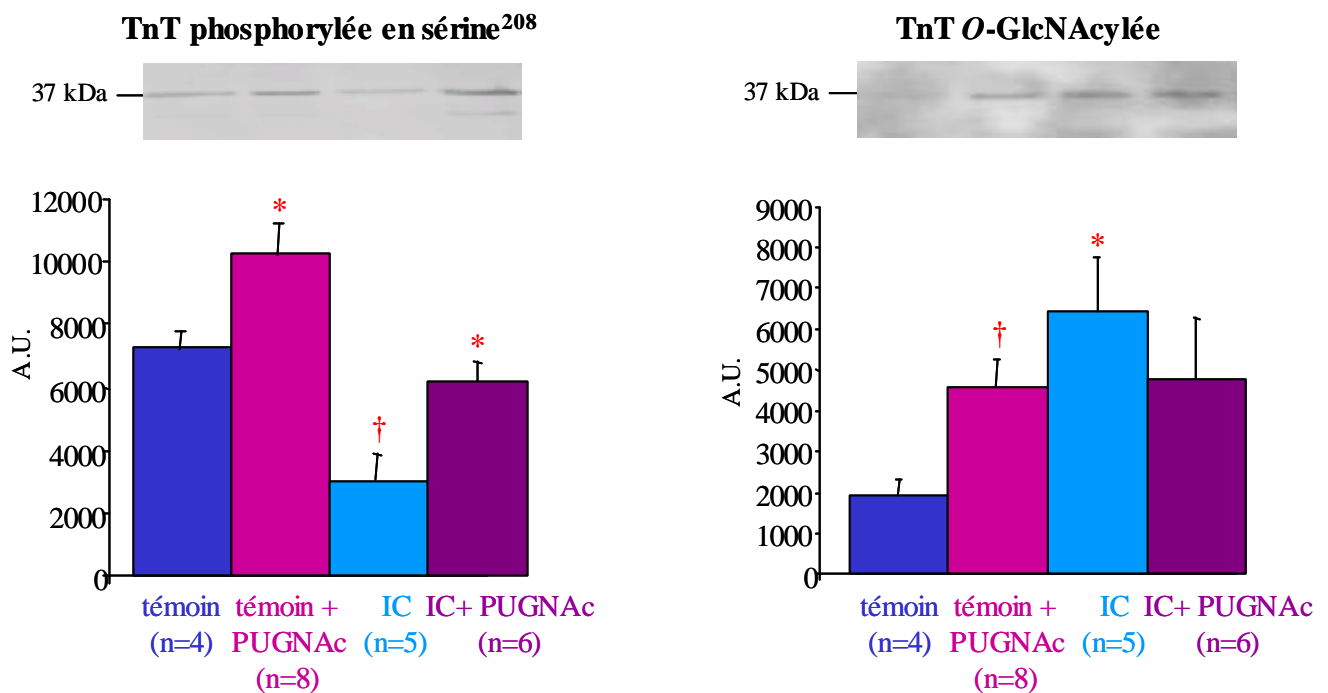


Figure 65 : Quantification de la TnT phosphorylée en sérine²⁰⁸ et O-GlcNAcylée dans le VG de rats témoins, témoins traités à la PUGNAc, IC et IC traités à la PUGNAc. L'immunoprécipitation est réalisée à partir de 50 µg de protéines de VG et de 1 µg d'anticorps. Le Western blot est dirigé spécifiquement contre la TnT phosphorylée en sérine²⁰⁸ dilué au 1/1000 ou la TnT dilué en 1/100. Le poids moléculaire est indiqué sur la gauche. Les quantifications ont été effectuées chez les rats témoins (n=4), témoins traités à la PUGNAc (n=8), IC (n=5) et IC traités à la PUGNAc (n=6) et sont exprimés en moyenne ± sem. * p < 0.05, † p < 0.01.

Nous observons que le traitement à la PUGNAc des rats témoins et IC induit une augmentation significative de la TnT phosphorylée en sérine²⁰⁸ par rapport aux rats témoins et IC non traités. De plus, cette modulation est inverse par rapport à la diminution de la TnT phosphorylée en sérine²⁰⁸ observée lors de l'IC, suggérant que l'effet bénéfique de la

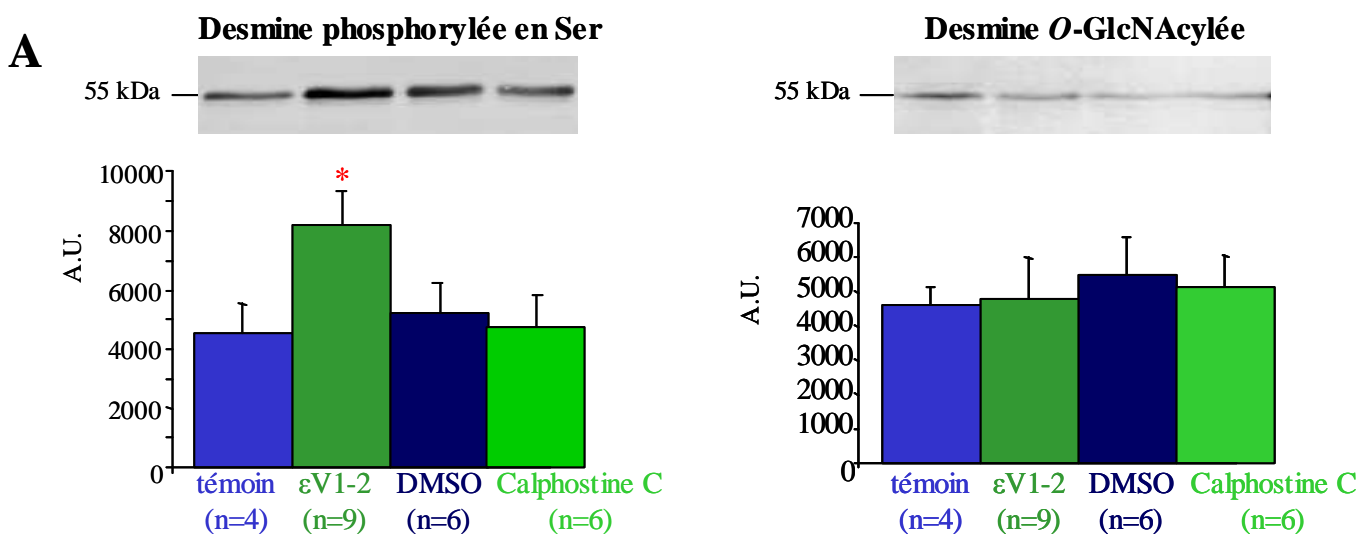
PUGNAc sur la contractilité cardiaque serait corrélé à l'augmentation de la phosphorylation de la TnT.

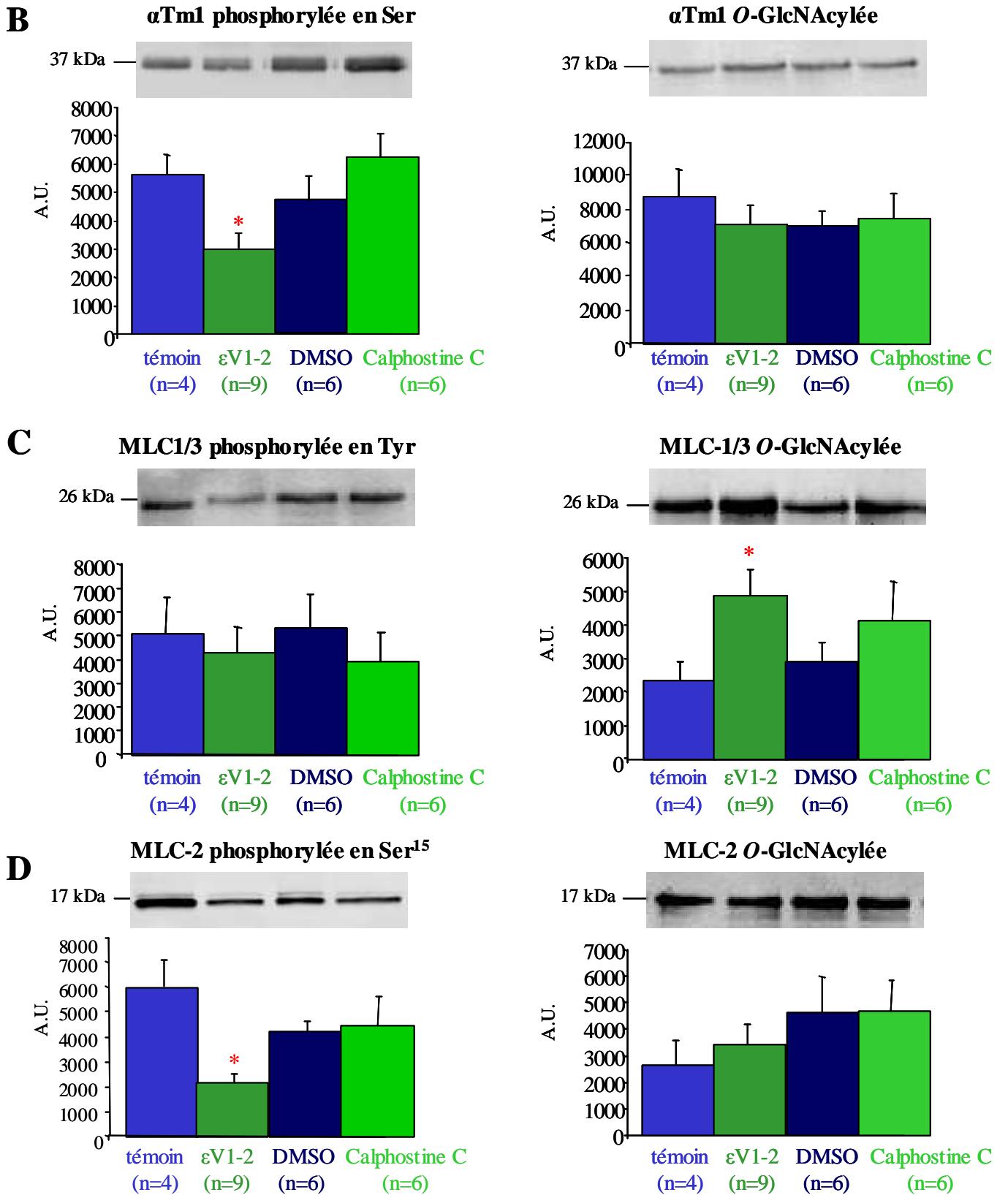
De plus, ce traitement semble également moduler la TnT O-GlcNAcylée. En effet, nous avons mis en évidence une augmentation significative de la TnT O-GlcNAcylée dans le VG des rats témoin traités à la PUGNAc comparé aux rats témoins non traités. Cependant, cette modulation n'est pas retrouvée chez les rats IC traités à la PUGNAc. Par ailleurs, nous observons une augmentation significative de la TnT O-GlcNAcylée dans le VG des rats IC comparé aux rats témoins.

4 Effet de l'inhibition de la PKC sur la balance phosphorylation / O-GlcNAc des protéines contractiles.

Nous avons montré dans cette étude que le traitement de rats sains avec l'inhibiteur sélectif pour l'isoforme ϵ de la PKC, ϵ V1-2, induit une diminution significative des paramètres de contractilité cardiaque. Nous avons montré que ce traitement entraîne une diminution du niveau de TnT phosphorylée en sérine²⁰⁸ et une augmentation de sa forme O-GlcNAcylée.

Dans une étude précédente (partie 3), nous avons mis en évidence une modulation de la balance phosphorylation / O-GlcNAcylation des protéines contractiles dans le VG des rats IC à deux mois post-IDM. Afin de compléter l'analyse de l'effet de l'inhibiteur ϵ V1-2, nous avons étudié le niveau de phosphorylation et de O-GlcNAcylation des protéines contractiles dans le VG de rats sains non traités, traités avec l'inhibiteur non sélectif des PKC Calphostine C, traités avec du DMSO1% ou traités avec l'inhibiteur ϵ V1-2 (Figure 66).





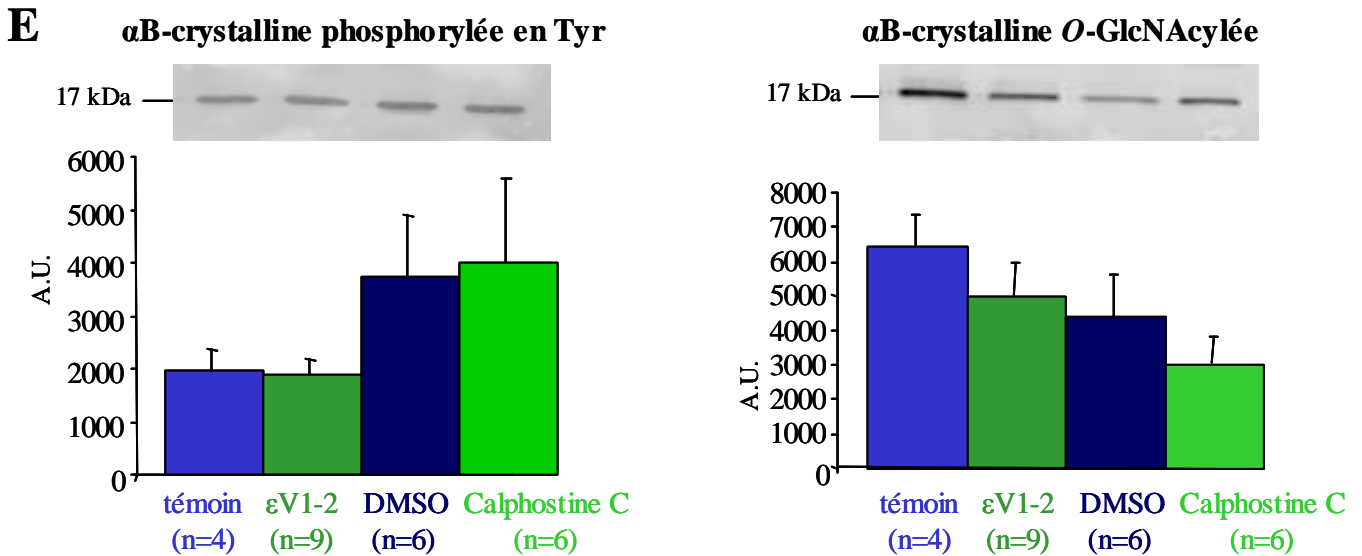
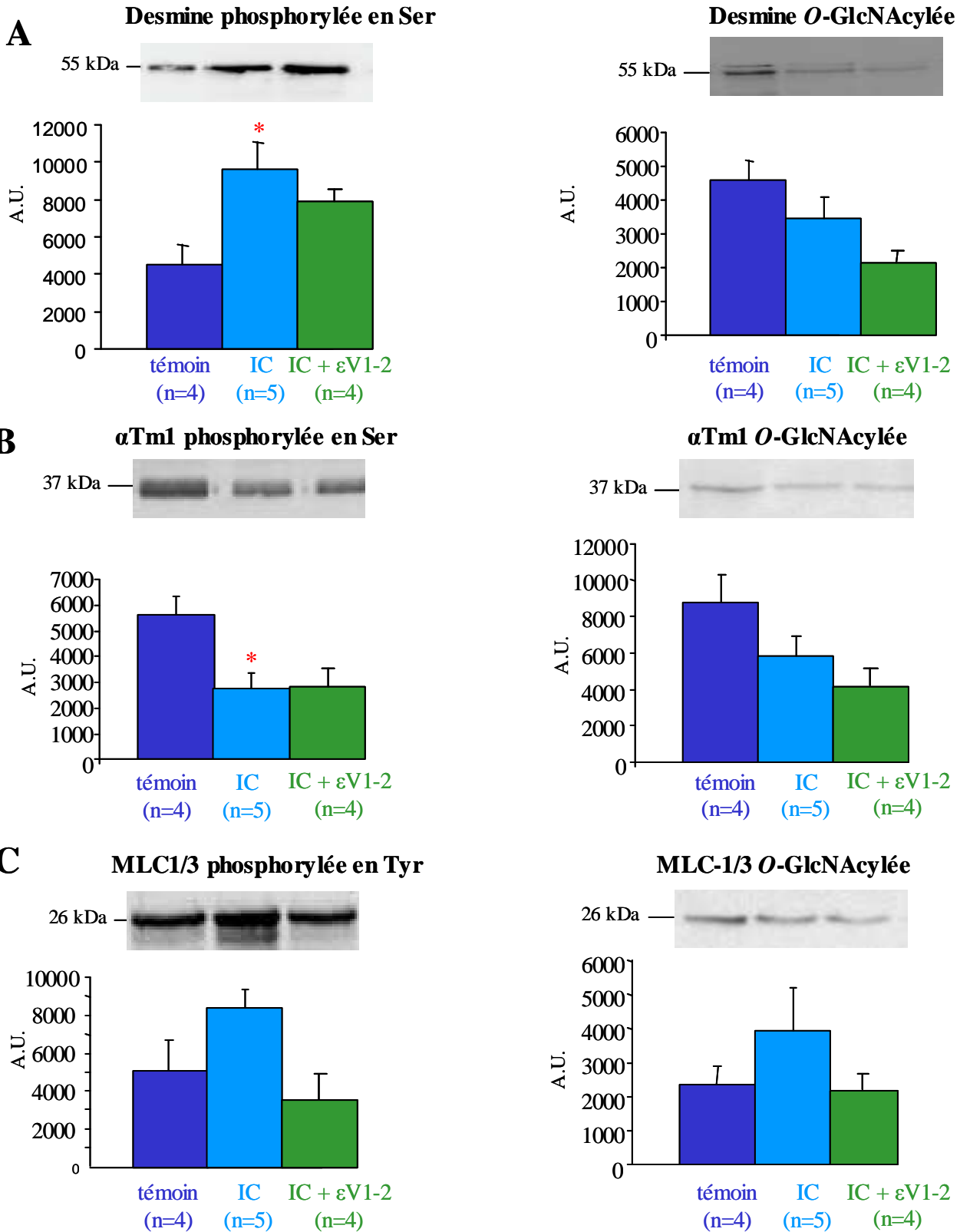


Figure 66 : Quantification de la phosphorylation et de la O-GlcNAcylation des protéines contractiles dans le VG de rats témoins et traités à la Calphostine C ou avec l'inhibiteur ϵ V1-2. L'immunoprécipitation est réalisée à partir de 50 μ g de protéines de VG et de 1 μ g d'anticorps. Le Western blot est dirigé spécifiquement contre les protéines d'intérêt. Le poids moléculaire est indiqué sur la gauche. Les quantifications ont été effectuées chez les rats témoins (n=4), traités avec l'inhibiteur ϵ V1-2 (n=9), traités au DMSO (n=6) et traités à la Calphostine C (n=6) et sont exprimés en moyenne \pm sem. * $p < 0.05$.

Par cette technique, nous avons mis en évidence une augmentation significative de la phosphorylation de la desmine ($p=0.039$) et une diminution significative de la phosphorylation de l' α -tropomyosine 1 ($p=0.026$) et de la MLC-2 ($p=0.035$) dans le VG des animaux traités avec l'inhibiteur sélectif de l'isoforme ϵ de la PKC, l'inhibiteur ϵ V1-2 par rapport aux animaux non traités sans modification du niveau de phosphorylation des autres protéines contractiles. Nous avons montré une augmentation significative seulement de la MLC-1/3 O-GlcNAcylée ($p=0.021$) dans le VG des animaux traités à l'inhibiteur ϵ V1-2 par rapport aux animaux non traités. Enfin, le niveau d'expression de ces protéines n'est pas modulé exceptée pour l' α B-crystalline, pour laquelle nous avons observé une augmentation d'expression significative dans le VG des animaux traités à l'inhibiteur ϵ V1-2 par rapport aux animaux non traités ($p=0.032$, non montré). De manière intéressante, ces résultats sont similaires à ceux observés dans le VG des animaux IC à deux mois post-IDM, corroborant l'hypothèse de l'implication de l'isoforme ϵ de la PKC dans les modifications de la balance phosphorylation / O-GlcNAcylation des protéines contractiles dans le RVG post-IDM. Par ailleurs, aucune modulation n'a été observée suite au traitement à la Calphostine C comparé aux rats traités au DMSO 1%.

Afin de compléter ces résultats, nous avons étudié les modulations des niveaux de phosphorylation et de *O*-GlcNAcylation de ces protéines dans le VG des rats IC et IC traités avec l'inhibiteur ϵ V1-2 (Figure 67).



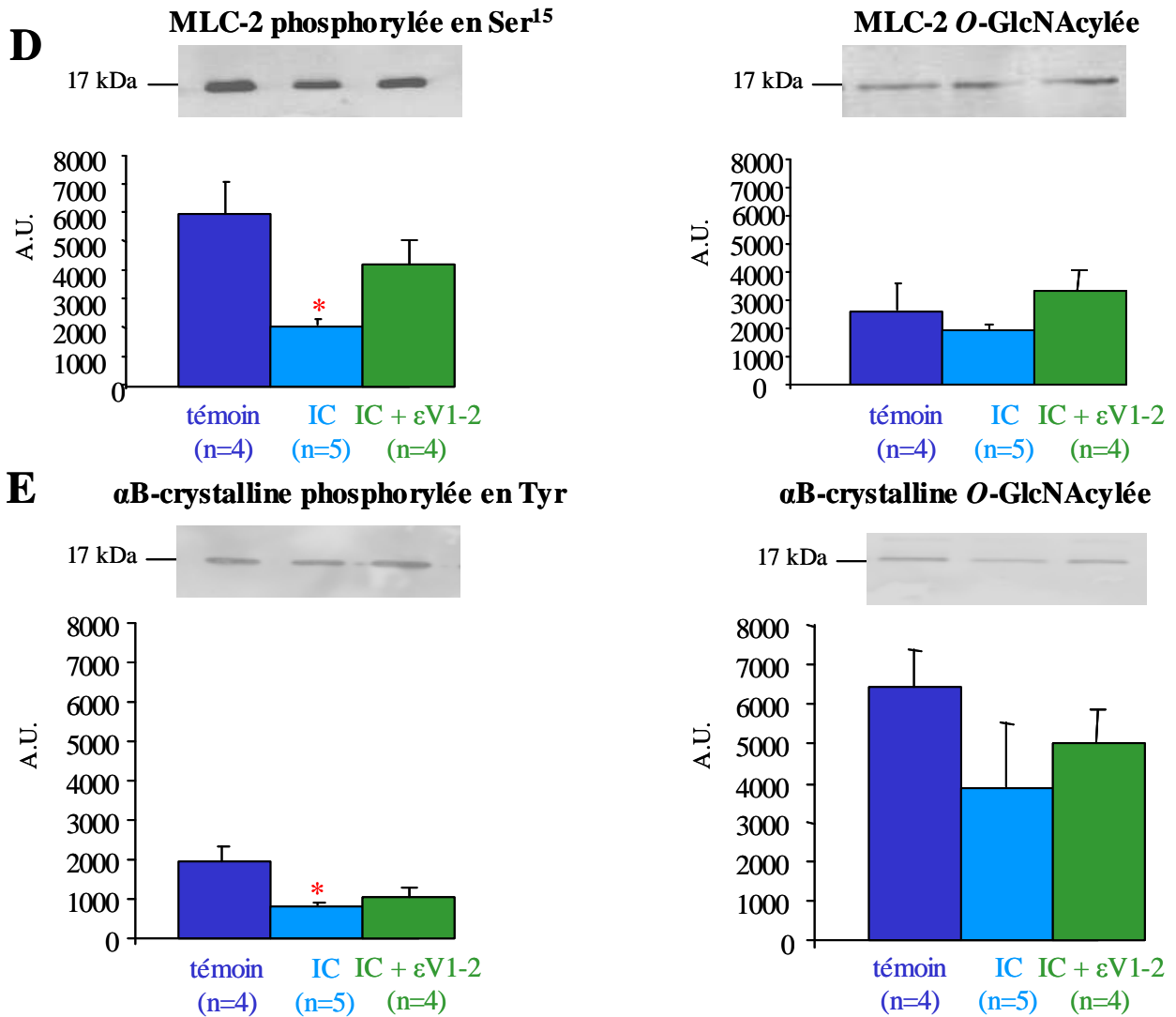


Figure 67 : Quantification de la phosphorylation et de la O-GlcNAcylation des protéines contractiles dans le VG de rats témoins, IC et IC traités avec l'inhibiteur εV1-2. L'immunoprécipitation est réalisée à partir de 50 µg de protéines de VG et de 1 µg d'anticorps. Le Western blot est dirigé spécifiquement contre les protéines d'intérêt. Le poids moléculaire est indiqué sur la gauche. Les quantifications ont été effectuées chez les rats témoins (n=4), IC (n=5) et IC traités avec l'inhibiteur εV1-2 (n=4) et sont exprimés en moyenne ± sem. * p < 0.05.

Nous n'avons pas mis en évidence de modulation des niveaux de phosphorylation et de O-GlcNAcylation des protéines contractiles dans le VG des animaux IC traités à l'inhibiteur εV1-2 par rapport aux animaux IC non traités.

IV) Discussion

1 Balance phosphorylation / O-GlcNAcylation de la TnT

Dans cette étude, nous avons montré, pour la première fois, l'existence d'une forme O-GlcNAcylée de la TnT. Par ailleurs, nous avons mis en évidence une augmentation significative de la TnT O-GlcNAcylée dans le VG et dans le plasma des rats IC à 2 mois post-ligature comparé aux rats témoins. Ces résultats confirment l'importance de la balance phosphorylation / O-GlcNAcylation lors du RVG post-IDM.

Au vu des premiers résultats obtenus concernant la diminution de la TnT phosphorylée dans le plasma de patients de l'étude REVE-1, il pourrait être intéressant d'analyser les modifications de la TnT O-GlcNAcylée dans le plasma de ces patients. Cependant, il n'existe pas actuellement de méthodes permettant d'obtenir des anticorps spécifiquement dirigés contre une protéine O-GlcNAcylée. La technique indirecte d'immunoprécipitation des protéines O-GlcNAcyées suivie d'un western blot dirigé contre la TnT est une technique semi-quantitative qui semble moins reproductible à partir d'échantillon plasmatiques.

Enfin, il faut préciser que cette modification est impliquée dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires, notamment dans le diabète de type 2 [Fulop *et al.* 2007]. En effet, le précurseur de la O-GlcNAcylation est un produit de la biosynthèse du glucose, ce qui pourrait compliquer l'analyse des résultats nécessitant une comparaison de patients appariés sur leur niveau de glycémie.

2 Effet de l'inhibiteur sélectif de l'isoforme ϵ de la PKC, ϵ V1-2 sur la balance phosphorylation / O-GlcNAcylation de la TnT

Dans cette étude, nous avons utilisé deux inhibiteurs ; un inhibiteur non sélectif des PKC et un inhibiteur sélectif de l'isoforme ϵ de la PKC, l'inhibiteur ϵ V1-2. Nous avons montré que le traitement par l'inhibiteur ϵ V1-2 induit une diminution des paramètres de la contractilité cardiaque. Cette diminution semble être corrélée au niveau de TnT phosphorylée en sérine²⁰⁸ dans le VG. Ces résultats semblent confirmer l'importance de la phosphorylation des protéines contractiles par l'isoforme ϵ de la PKC dans le mécanisme de contraction cardiaque. L'absence de modification dans le VG de rats traités à la Calphostine C semblent confirmer l'importance de l'isoforme ϵ de la PKC dans ce mécanisme.

Une étude a récemment décrit qu'un traitement avec l'inhibiteur ϵ V1-2 induisait un ralentissement du développement de l'IC [Inagaki *et al.* 2008]. Cependant, cette inhibition a été effectuée lors de la phase adaptative du RVG dans un modèle expérimental de rats Dahl salt-sensitive [Inagaki *et al.* 2008]. Nos résultats ne sont donc pas comparables puisque dans

notre modèle, l'inhibition sélective de l'isoforme ϵ de la PKC est effectuée plus tardivement lors du RVG. De plus, de nombreuses études montrent un effet cardioprotecteur de l'activation de l'isoforme ϵ de la PKC [Mayr *et al.* 2009].

3 Effet de la PUGNAc sur la balance phosphorylation / O-GlcNAc de la TnT

Nous avons ensuite étudié l'effet d'une augmentation du niveau de O-GlcNAcylation sur les modulations du niveau de phosphorylation et de O-GlcNAcylation de la TnT. De manière intéressante, nous avons mis en évidence une augmentation de la TnT phosphorylée en sérine²⁰⁸ dans le VG de rats témoins et IC traités à la PUGNAc. Ces résultats confirmant l'implication des modifications post-traductionnelles des protéines contractiles dans l'effet bénéfique sur la fonction cardiaque de l'inhibition de la O-GlcNAcylation.

4 Effet de l'inhibition des PKC sur la balance phosphorylation / O-GlcNAc des protéines contractiles

Nous avons mis en évidence des modulations du niveau de phosphorylation de la desmine, de l' α -tropomyosine 1 et de la MLC-2 et de O-GlcNAcylation uniquement de la MLC-1/3 dans le VG des animaux traités avec l'inhibiteur sélectif de l'isoforme ϵ de la PKC. Ces résultats suggèrent l'implication de l'isoforme ϵ de la PKC dans les modifications de la balance phosphorylation / O-GlcNAcylation des protéines contractiles. Cependant, l'inhibition de l'isoforme ϵ de la PKC n'explique pas toutes les modifications observées lors du RVG post-IDM, suggérant l'implication d'autres voies de signalisation dans ce processus.

*Partie 6 : Utilisation clinique de la troponine T
phosphorylée comme biomarqueur potentiel du
remodelage ventriculaire gauche*

I) Objectifs de l'étude

Nous avons mis en évidence une diminution de la TnT phosphorylée dans le VG et le plasma de rats IC. Cette diminution a également été retrouvée dans le plasma de patients de l'étude REVE-1, présentant un RVG post-IDM modéré à important [Dubois *et al.* 2010]. Ces résultats suggèrent que la diminution de la TnT phosphorylée peut être un nouveau biomarqueur du RVG post-IDM. Il est cependant essentiel de valider ces résultats à plus grande échelle par une technique rapide, reproductible et plus adaptée aux grandes populations telle que l'ELISA.

L'objectif de cette étude est la mise au point d'un dosage standardisé de la TnT phosphorylée à l'aide d'un anticorps monoclonal. Cette étude nous permettra de rechercher une association entre la diminution de la TnT phosphorylée et le RVG post-IDM ainsi qu'une association de cette modulation avec la sévérité et le pronostic de l'IC.

II) Pertinence de l'utilisation de la TnT phosphorylée comme biomarqueur du RVG

Afin de déterminer si la diminution de la TnT phosphorylée est un biomarqueur spécifique du RVG post-IDM et de l'IC, nous avons analysé cette protéine dans les différentes études cliniques disponibles au laboratoire.

1 Étude REVE-2

Dans un premier temps, nous avons analysé les patients de l'étude REVE-2. Il s'agit d'une étude régionale multicentrique ayant inclus 246 patients victime d'un IDM inaugural de topographie antérieure avec une atteinte significative de la FEVG inférieure à 50%. Les patients de cette étude bénéficient d'un prélèvement de sang périphérique le jour de l'échocardiographie, soit entre trois et cinq jours après leur IDM, mais également un mois, trois mois et un an après ce dernier. Le plasma et le sérum ont été conditionnés dans l'heure suivant le prélèvement pour limiter les modifications protéiques après prélèvements. Une échocardiographie de contrôle est effectuée à trois mois et à un an après l'IDM afin d'analyser le RVG post-IDM. Le critère de jugement principal est le RVG à un an défini comme la différence entre le volume télédiastolique du VG à un an et le volume télédiastolique du VG à l'inclusion. Les caractéristiques des patients ainsi que les détails du protocole ont récemment été publiés [Fertin *et al.* 2010b].

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur le prélèvement à l'inclusion. Nous avons ainsi quantifié dans cette population la TnT et la TnT phosphorylée par western blot à l'aide des anticorps polyclonaux développés au laboratoire (Figure 68).

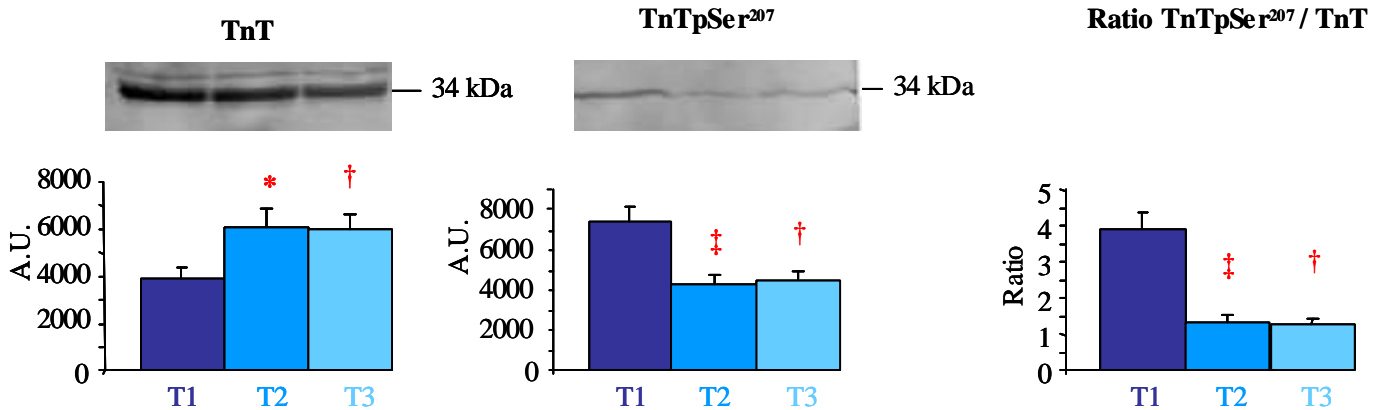


Figure 68 : Quantification de la TnT et de la TnT phosphorylée en sérine²⁰⁷ (TnTpSer²⁰⁷) dans le plasma des patients de l'étude REVE-2. Western blot dirigé spécifiquement contre la TnT ou la TnTpSer²⁰⁷ dilué au 1/1000, l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase est dilué au 1/5000. † $p < 0.01$, ‡ $p < 0.001$.

Nous avons ainsi mis en évidence une diminution significative de la TnT phosphorylée en sérine²⁰⁷ ainsi que du ratio TnT phosphorylée en sérine²⁰⁷ / TnT dans le plasma des patients présentant un RVG modéré à important de l'étude REVE-2, comparable à celle observée dans le plasma des patients de l'étude REVE-1 [Dubois *et al.* 2010]. Ces résultats semblent prometteurs et seront validés par l'utilisation du dosage ELISA. Ce dosage sera effectué à la fois sur le prélèvement effectué à l'inclusion des patients mais également à un mois après l'IDM pour s'affranchir des modulations dues à l'augmentation de la TnT lors de l'IDM [Moe *et al.* 2010].

2 Étude PTHF

Afin de déterminer si il existe une corrélation entre la diminution de la TnT phosphorylée en sérine²⁰⁷ et l'IC chronique, nous avons analysé le niveau d'expression de la TnT et de la TnT phosphorylée en sérine²⁰⁷ dans le plasma des patients de l'étude cas-témoin PTHF (*ProTeomic in Heart Failure*). Cette étude concerne cinquante-neuf patients, dont trente témoins volontaires sains et vingt-neuf patients présentant une IC avec dysfonction diastolique non ischémique (FEVG < 35%) (Figure 69).

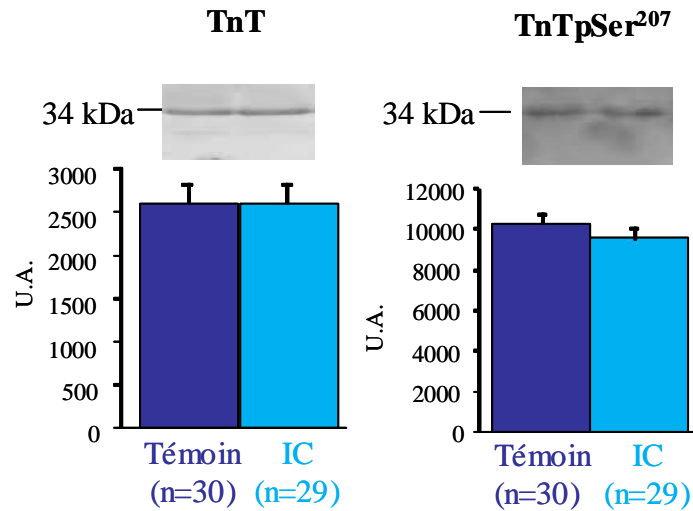


Figure 69: Quantification de la TnT et de la TnT phosphorylée en sérine²⁰⁷ (TnTpSer²⁰⁷) dans le plasma des patients de l'étude PTHF. Western blot dirigé spécifiquement contre la TnT ou la TnTpSer²⁰⁷ dilué au 1/1000, l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase est dilué au 1/5000.

Nous n'avons pas mis en évidence de variation de la TnT ou de sa forme phosphorylée en sérine²⁰⁷ dans le plasma des patients de l'étude PTHF. Cependant, il s'agit d'une petite cohorte dont les résultats nécessitent d'être validés sur une population indépendante et avec un plus grand effectif. Pour cela, les dosages ELISA de la TnT et de sa forme phosphorylée en sérine²⁰⁷ s'avèrent essentiels

III) Développement et caractérisation des anticorps monoclonaux

Afin de valider ces résultats sur une population plus importante, il est nécessaire de développer un dosage ELISA de la TnT phosphorylée. Pour cela, des anticorps monoclonaux de la forme phosphorylée de la troponine T ont été développés en utilisant les mêmes peptides que pour la synthèse des anticorps polyclonaux. Les souris ont été immunisées et nous avons obtenu huit anticorps monoclonaux différents que nous avons caractérisés. Pour cela, les mêmes contrôles que pour les anticorps polyclonaux précédemment développés ont été effectués. Nous avons ainsi contrôlé par western blot la spécificité de chaque anticorps contre le peptide phosphorylé et non phosphorylé et après traitement des échantillons par la phosphatase alcaline pour éliminer les résidus phosphate (Figure 70).

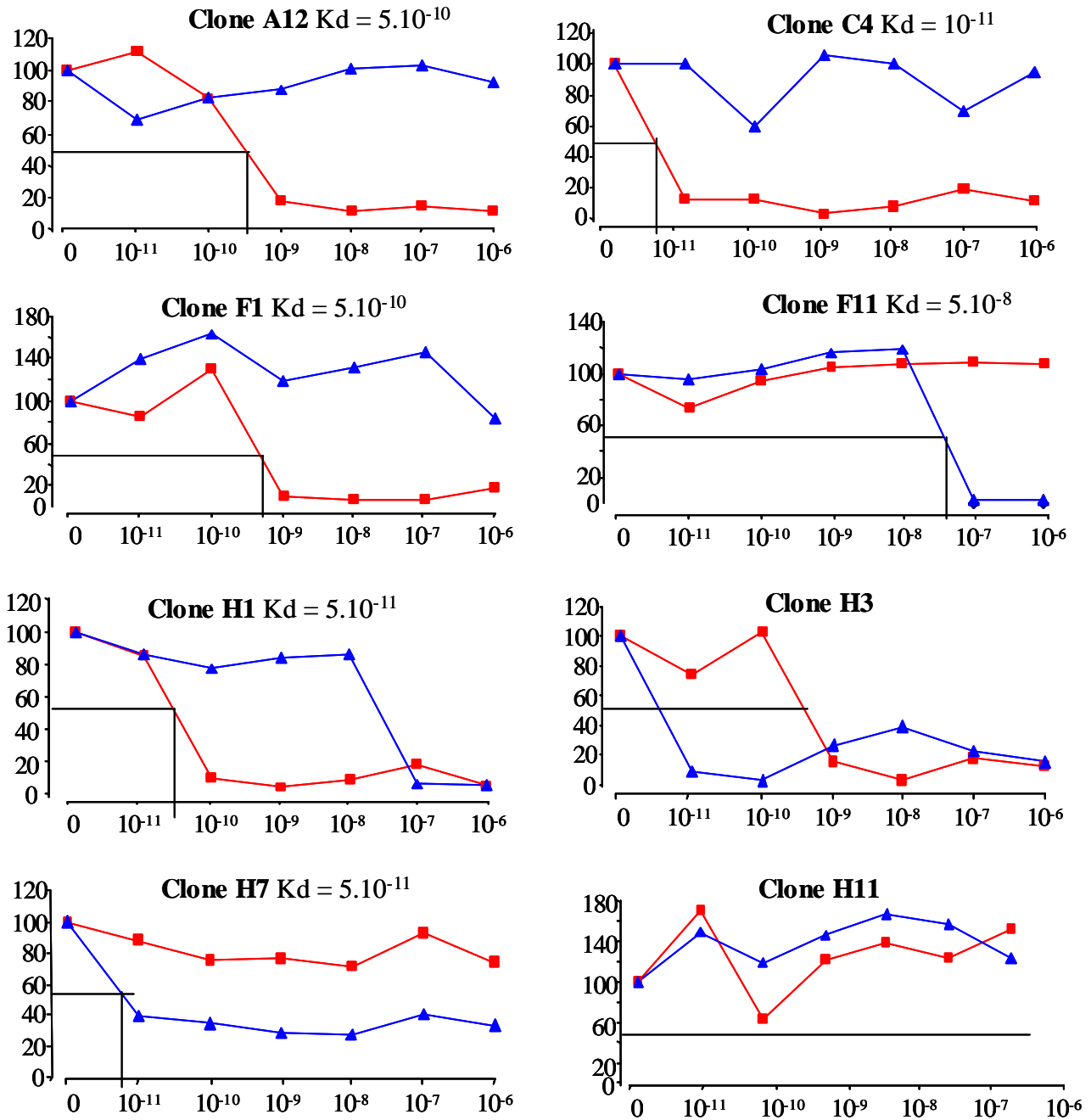


Figure 70 : Caractérisation des anticorps monoclonaux. Western blot effectué avec les anticorps monoclonaux dilués au 1/5000, l'anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxydase est dilué au 1/10000. La compétition avec le peptide dirigé contre la TnT non phosphorylée ou la TnT phosphorylée dilué aux différentes concentration se fait lors de l'incubation de la membrane avec l'anticorps. Les résultats de la compétition avec peptide dirigé contre la TnT non phosphorylée sont représentés en bleu, les résultats de la compétition avec le peptide dirigé contre la TnT phosphorylée sont représentés en rouge. Le Kd correspond à la constante de dissociation.

Ces premiers résultats nous montrent que les clones A12, C4, F1 et H1 seraient spécifiques de la TnT phosphorylée, bien qu'il y ait des différences d'affinité, alors que les clones H7 et F11 seraient spécifiques de la TnT non phosphorylée. Les clones H3 et H11 ne semblent pas spécifiques.

Le dosage ELISA est actuellement en cours de développement (Figure 71).

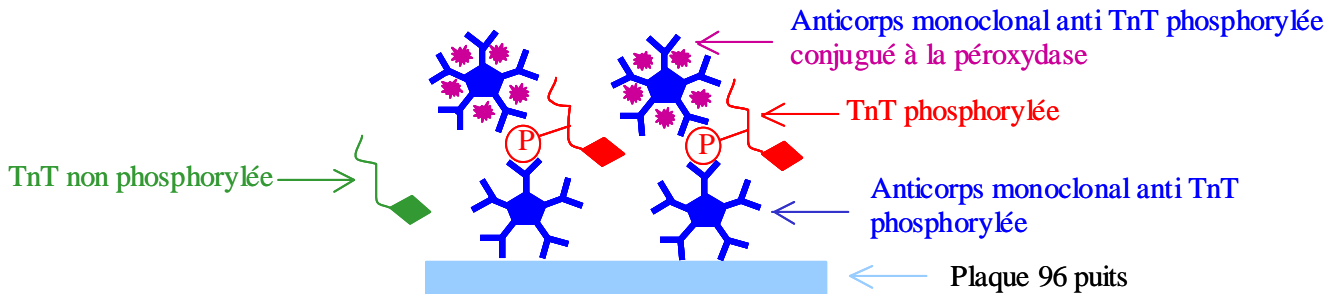


Figure 71 : Principe du dosage ELISA de la TnT phosphorylée dans le plasma humain.

Le dosage sera sous forme sandwich avec un anticorps de capture dirigé contre la TnT phosphorylée et l'anticorps de révélation couplé à la peroxydase dirigé spécifiquement contre la TnT phosphorylée.

IV) Perspectives

Nous avons mis en évidence une diminution de la TnT phosphorylée dans le plasma des patients des études REVE-1 et -2, présentant un RVG post-IDM modéré à important. Nous n'avons pas mis en évidence de modulation de la TnT phosphorylée dans le plasma des patients des études PTHF. Cependant, il s'agit d'une petite cohorte et les résultats concernant l'IC nécessitent d'être validés.

Pour cela, nous développons actuellement un dosage ELISA plasmatique de la TnT phosphorylée. Nous pourrions ainsi confirmer les résultats obtenus par western blot en quantifiant la TnT phosphorylée dans les populations précédentes. Par ailleurs, nous affinerons les résultats concernant l'IC par l'étude des patients de la cohorte INCA (Insuffisance Cardiaque). Il s'agit d'une cohorte de patient IC stables avec une fraction d'éjection du VG inférieure à 45%, débutée dans le service de cardiologie de Lille depuis 1998. Les modulations de la TnT phosphorylée seront analysées dans deux populations différentes issues de cette cohorte [Mizon-Gerard *et al.* 2004] ; [de Groote *et al.* 2004].

La première population, appelée INCA-phénotype, sera constituée de 300 patients (150 patients présentant une IC suite à un IDM et 150 patients présentant une IC non ischémique). Cette population nous permettra d'effectuer une étude d'association entre la TnT

phosphorylée et la gravité de l'IC évaluée grâce aux marqueurs pronostiques connus de l'IC tels que le BNP ou la fraction d'éjection du VG dans chacun des sous-groupes.

La seconde population, appelée INCA-mortalité, sera une étude cas-témoin comparant 100 patients décédés ou greffés en urgence dans les trois ans suivant leur inclusion à 100 patients vivants, appariés sur l'âge, le sexe et l'étiologie de l'IC.

Finalement, nous analyserons les patients de l'étude HFPEF (*Heart Failure with Preserved Ejection Fraction*). Cette étude concerne cinquante patients présentant une IC diastolique avec fraction d'éjection préservée, hospitalisés dans le département de cardiologie de l'hôpital de Rouen et vingt témoins.

Ces études devraient nous permettre :

- de tester si la diminution de la TnT phosphorylée est un marqueur permettant de prédire le RVG.
- de déterminer le seuil de la TnT phosphorylée à utiliser pour le diagnostic de l'IC
- de comparer le niveau de la TnT phosphorylée en fonction de la sévérité de l'IC
- de comparer la valeur pronostic (mortalité ou transplantation urgente) de la TnT phosphorylée à celle des marqueurs pronostiques usuellement utilisés.

*Discussion et
perspectives*

I) Le modèle expérimental d'insuffisance cardiaque

Dans le but de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs du RVG post-IDM, nous avons utilisé, en collaboration avec l'unité U644 de Rouen, un modèle expérimental d'IC chez lequel l'IDM est induit par ligature de l'ACG. Il s'agit du modèle expérimental le plus couramment utilisé. Cette procédure est associée à une mortalité postopératoire inférieure à 10% [Mulder *et al.* 1997]. Ce modèle est remarquable puisque tous les animaux ayant subi la ligature de l'ACG vont développer un RVG et une IC comparable à celle observée chez l'homme [Mulder *et al.* 1997]. Ce modèle nous a permis de mettre en évidence la diminution de la TnT phosphorylée comme biomarqueur potentiel du RVG, puisque cette modification est retrouvée à la fois dans le VG et dans le plasma des rats IC mais également dans le plasma de patients présentant un RVG modéré et important [Dubois *et al.* 2010]. Ces résultats valident l'utilisation de ce modèle expérimental dans le but de trouver de nouveaux biomarqueurs plasmatiques du RVG, puisque nous avons retrouvé chez l'homme des résultats similaires à ceux obtenus chez le rat.

L'intérêt de l'utilisation d'un modèle expérimental pour l'étude du RVG réside dans l'obtention d'échantillons sériés de tissus et de plasma. En effet, nous avons à notre disposition non seulement les échantillons de VG et de plasma préopératoire et prélevé à deux mois post-ligature, mais également des échantillons de VG et de plasma prélevé à sept jours post-ligature, correspondant à la phase précoce du RVG. Cette phase est constituée de l'expansion de la zone infarctée causée par la nécrose des cardiomyocytes, principalement dans la région apicale du VG, et conduit aux modifications géométriques et structurales du VG [Gaertner *et al.* 2004].

Lors de l'analyse du protéome du VG, les résultats obtenus par gels d'électrophorèse 2D ont été validés par western blot sur les échantillons à sept jours et deux mois post-ligature [Cieniewski-Bernard *et al.* 2008]. De manière intéressante, parmi les dix-sept protéines dont les modulations d'expression ont été validées à deux mois post-ligature, cinq protéines présentaient des modulations inversées à sept jours post-ligature : la *GAPDH*, la *protéine disulfide isomérase 1*, l'*ubiquitine C-terminale hydrolase*, la *superoxyde dismutase 2*, la *péroxirédoxine 2*

Il pourrait donc être intéressant d'analyser les modulations de la balance phosphorylation / O-GlcNAcylation des protéines contractiles dans le VG des animaux à sept jours post-ligature afin de déterminer si les mécanismes de la perte de contractilité mis en jeu sont identiques lors de la phase précoce et tardive du RVG.

Nous disposons également des prélèvements des autres compartiments cardiaques (ventricule droit et oreillettes droite et gauche) ainsi que des poumons pour tous les animaux inclus dans l'analyse du protéome. Les paramètres histomorphométriques de ces animaux montre une augmentation significative de la masse du VD à deux mois post-ligature, suggérant une atteinte de ce compartiment lors du RVG [Cieniewski-Bernard *et al.* 2008]. L'augmentation de la masse ventriculaire est principalement liée à une augmentation de la synthèse protéique et de la taille des cellules, notamment par ajout de sarcomères, suggérant l'intérêt de l'étude des protéines contractiles dans le VD [Bogaard *et al.* 2009]. Il pourrait alors être intéressant d'analyser les modulations de la balance phosphorylation / O-GlcNAcylation des protéines contractiles dans ces différents compartiments, notamment dans le VD, ce qui nous permettrait de mettre en évidence des mécanismes de compensations impliquées dans cette pathologie.

Enfin, il nous semble également important d'étudier des modulations dans un autre modèle expérimental. En effet, si le RVG post-IDM représente 60 à 70% des cas d'IC, il ne faut oublier l'importance de l'HTA qui représente 20 à 30% des cas d'IC [Hess 2003]. Pour cela, nous envisageons, en collaboration avec l'unité INSERM U644, le développement d'un modèle expérimental par constriction de l'aorte abdominale. Ce modèle permet d'étudier l'IC avec une fonction systolique préservée. En effet, ce modèle est caractérisé par une augmentation rapide de la pression artérielle, induisant une hypertrophie du VG [Derumeaux *et al.* 2002]. De plus, durant les deux premiers mois, cette hypertrophie est compensée et les paramètres de contractilité cardiaque ne sont donc pas modifiés, puis la fonction systolique s'altère progressivement [Derumeaux *et al.* 2002]. Il pourrait donc être intéressant d'étudier la corrélation entre la balance phosphorylation / O-GlcNAcylation des protéines contractiles et la fonction systolique. Ce modèle pourra nous permettre de déterminer si la diminution de la TnT phosphorylée en sérine²⁰⁸ observée lors du RVG post-IDM est spécifique des conditions ischémiques.

II) Analyse du protéome et du phosphoprotéome du VG

Nous avons effectué l'analyse du protéome puis du phosphoprotéome du VG lors du RVG post-IDM. De manière intéressante, parmi les vingt-sept protéines identifiées lors de l'analyse du protéome, neuf présentent également des modulations de leur niveau de phosphorylation (Table XXIV).

Table XXIV : Protéines présentant des modifications d'expression et de phosphorylation lors du RVG.

Nom	Modulation d'expression	Modulation de phosphorylation
α B-crystalline	x 6	/ 4,7
Péroxirédoxine-6	x 1,5	Induite
Glutathion peroxydase 1	Induite	/ 4,6
Acyl coenzyme A thioestérase 2	/ 1,6	Induite
Sous-unité α de l'isocitrate déshydrogénase	/ 1,5	Induite
Chaîne D de l'ATP synthase	x 3,3	/ 1,6
Sous-unité α de l'ATP synthase	x 4,7	Induite
Sous-unité β de l'ATP synthase	x 2	x 4,9
Inhibiteur de sérine protéase A3K	x 2,2	x 5,9

Il serait intéressant d'analyser les voies de signalisation communes à ces protéines afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le RVG post-IDM. Pour cela, de nombreux logiciels permettent de mettre en évidence les interactions protéines-protéines ainsi que les voies métaboliques dans lesquelles ces protéines sont impliquées. L'exemple de la voie de signalisation de l'endothéline est présentée en Figure 72.

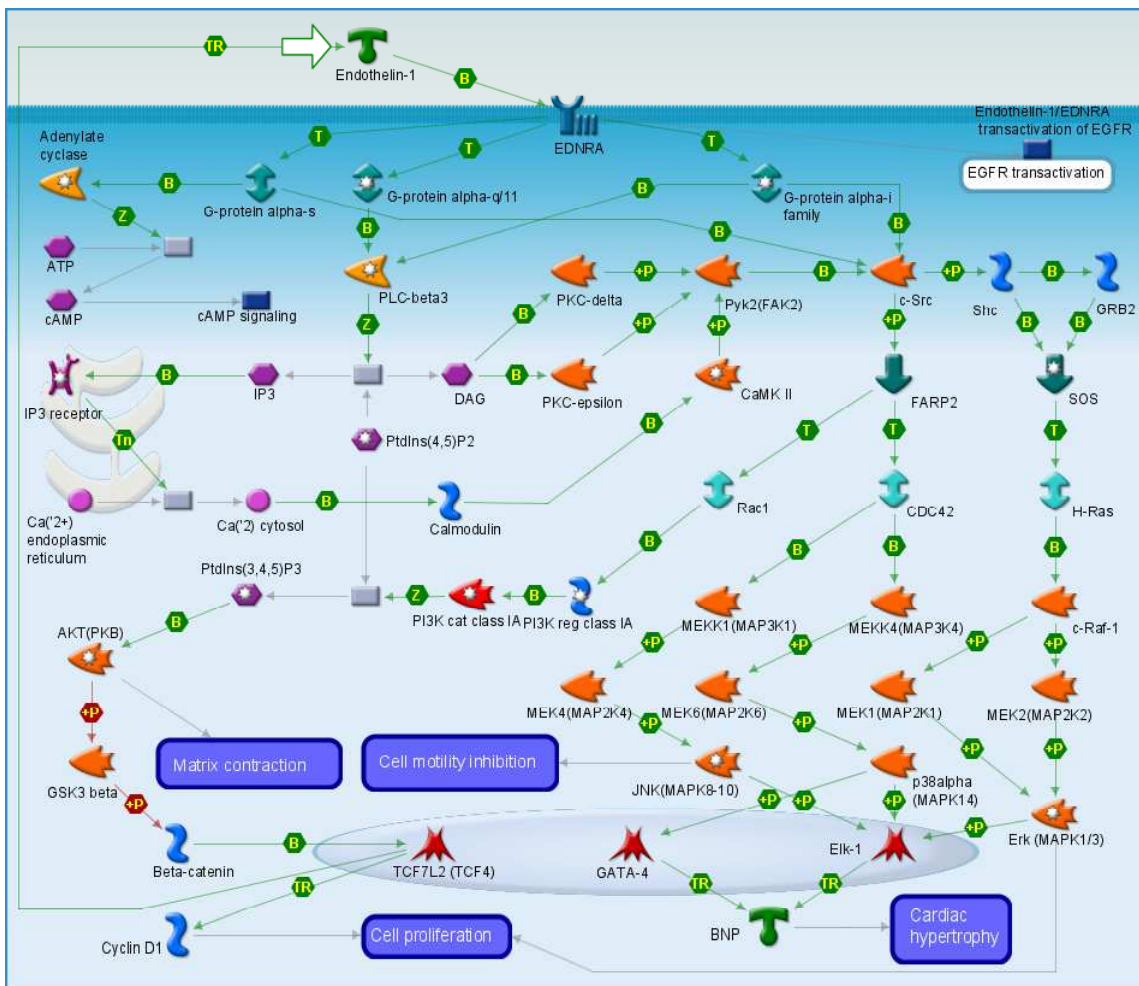


Figure 72 : Représentation schématique de la voie de l'endothéline lors du RVG.

Nous envisageons d'analyser les interactions possibles entre les protéines identifiées lors de l'analyse du protéome et du phosphoprotéome afin de mettre en évidence des protéines clés des voies métaboliques impliquées. Ces résultats devraient nous permettre de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le RVG post-IDM.

III) Intérêt de la TnT phosphorylée comme biomarqueur potentiel du RVG

Au cours de cette thèse, nous avons mis en évidence une diminution de la TnT phosphorylée dans le VG et dans le plasma des rats IC mais également dans le plasma de patients présentant un RVG modéré et important de l'étude REVE-1 [Dubois *et al.* 2010]. Ces premiers résultats suggèrent que cette diminution pourrait constituer un biomarqueur potentiel du RVG post-IDM. Afin de confirmer cette hypothèse, nous devons à la fois caractériser ce biomarqueur d'un point de vue physiopathologique pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques mis en jeu mais également valider ce biomarqueur pour l'utilisation clinique.

1 Caractérisation de la TnT phosphorylée comme potentiel biomarqueur du RVG

1.1 Balance phosphorylation / O-GlcNAcylation de la TnT

Dans cette étude, nous avons mis en évidence une augmentation significative de la TnT O-GlcNAcylée dans le VG et dans le plasma des rats IC à 2 mois post-ligature comparé aux témoins. Associés à la diminution de la TnT phosphorylée observée dans les mêmes animaux, ces résultats confirment l'importance de la balance phosphorylation / O-GlcNAcylation lors du RVG post-IDM.

Au vu des premiers résultats obtenus concernant la diminution de la TnT phosphorylée dans le plasma de patients de l'étude REVE-1, il pourrait être intéressant d'analyser les modifications de la TnT O-GlcNAcylée dans le plasma de ces patients. Cependant, il n'existe pas actuellement de méthodes permettant de quantifier facilement et de manière fiable une protéine O-GlcNAcylée. Nous espérons donc pouvoir continuer ce projet par la suite avec le développement de nouveaux outils.

Enfin, il faut préciser que cette modification est impliquée dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires, notamment dans le diabète de type 2 [Fulop *et al.* 2007]. En effet, le précurseur de la O-GlcNAcylation est un produit de la biosynthèse du glucose, ce qui pourrait compliquer l'analyse des résultats nécessitant une comparaison de patients appariés sur leur niveau de glycémie et la présence ou non d'un diabète.

1.2 Effets d'inhibiteurs de la PKC ϵ sur la contractilité cardiaque

Au cours de ce travail, nous avons montré une corrélation entre la diminution de l'expression de la PKC ϵ et la diminution de la TnT phosphorylée dans le VG des rats. De plus, nous avons mis en évidence que cette diminution était corrélée à une diminution de la contractilité cardiaque par des expériences de cœur isolé perfusé (Figure 73).

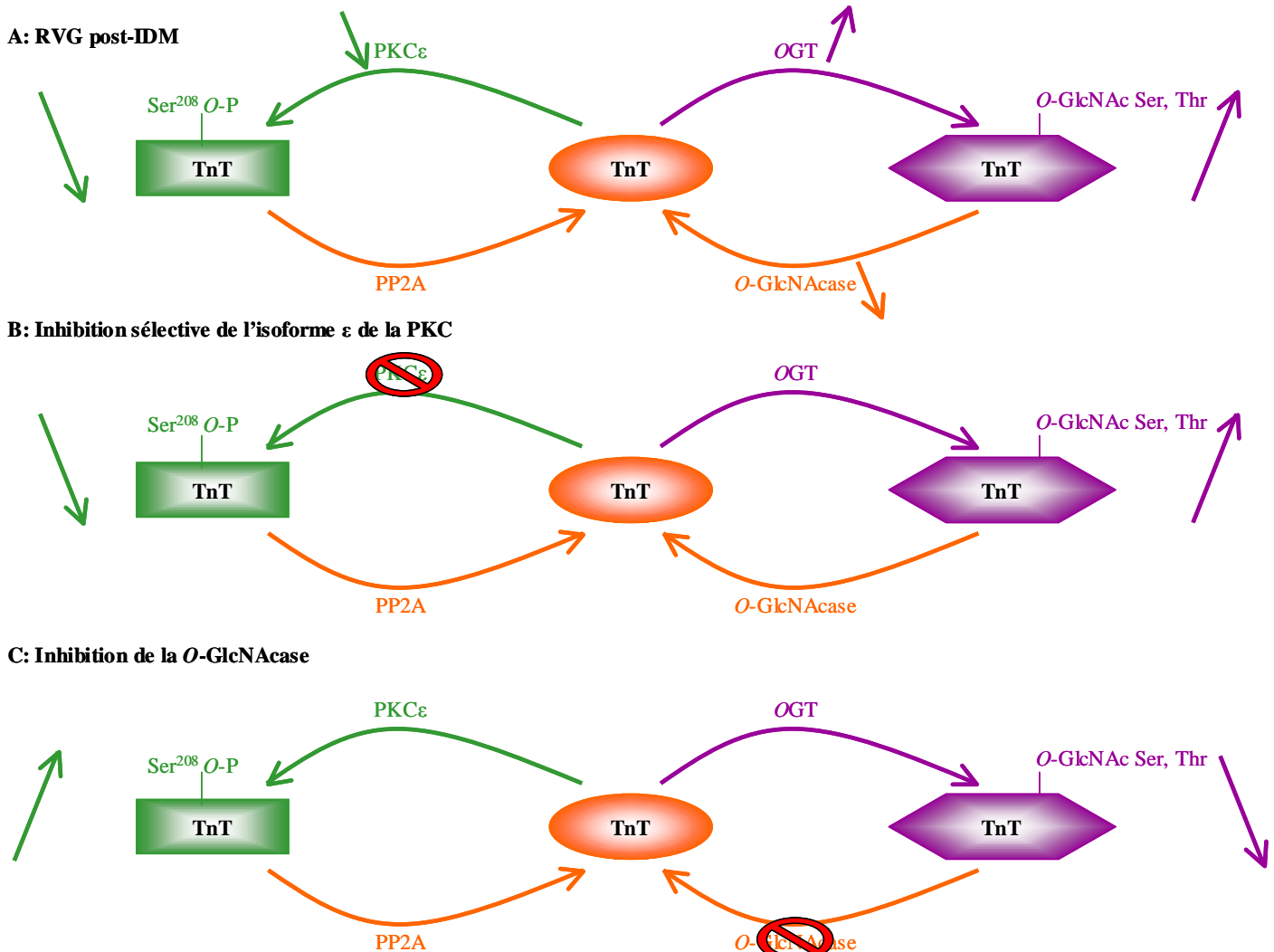


Figure 73 : Représentation schématique récapitulant les résultats obtenus par l'inhibition sélective de l'isoforme ϵ de la PKC et de la O-GlcNAcase.

Afin de poursuivre cette analyse, il nous semble important d'étudier l'effet d'activateurs de la PKC ϵ sur les paramètres de la contractilité cardiaque ainsi que sur la phosphorylation de la TnT et sur les modifications post-traductionnelles des autres protéines contractiles impliquées, notamment chez les animaux IC. En effet, de nombreuses études ont montré un effet bénéfique de cet activateur, appelé $\psi\epsilon$ RACK. Ce peptide induit une cardioprotection dans des modèles de cardiomyocytes en culture ou de cœur perfusé isolé lorsqu'il est administré avant l'ischémie [Inagaki *et al.* 2005].

Nous pourrions envisager d'administrer l'activateur $\psi\epsilon$ RACK à des animaux témoins et IC afin d'analyser les paramètres de la contractilité cardiaque et d'établir une corrélation avec le niveau de phosphorylation et de *O*-GlcNAcylation de la TnT et des autres protéines contractiles impliquées dans le RVG post-IDM. Actuellement, ce peptide n'est pas commercialisé et nous n'avons pas réussi à l'obtenir dans le cadre d'une collaboration.

1.3 Rôle de la phosphorylation de la TnT sur ces interactions avec les autres protéines contractiles

Afin de finaliser l'étude des mécanismes physiopathologiques du RVG, nous envisageons d'étudier les interactions entre la TnT phosphorylée et les autres protéines du myofilament par des techniques telles que la coimmunoprécipitation ou le FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Ces techniques nous permettront de savoir si la diminution de la TnT phosphorylée agit sur ses interactions avec d'autres protéines du myofilament. En effet, la TnT interagit directement à la fois avec les TnI et C mais également avec l' α -tropomyosine et l' α -actine [Sumandea *et al.* 2009]. Par ailleurs, nous avons montré une diminution de la phosphorylation de l' α -tropomyosine dans le VG des rats IC, pouvant également modifier cette interaction. Ces expériences devraient nous aider à comprendre l'altération de contractilité observée lors du RVG post-IDM.

2 Validation clinique de la TnT phosphorylée comme biomarqueur potentiel du RVG

Afin de valider les premiers résultats concernant la diminution de la TnT phosphorylée dans le plasma des patients présentant un RVG intermédiaire à modéré, nous développons actuellement des anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre la TnT phosphorylée afin d'établir un dosage ELISA plasmatique de cette protéine.

Par ailleurs, nous affinerons les résultats concernant l'IC par l'étude des patients de la cohorte INCA (Insuffisance Cardiaque) [Mizon-Gerard *et al.* 2004] ; [de Groote *et al.* 2004] et de l'étude HFPEF (*Heart Failure with Preserved Ejection Fraction*).

Finalement, nous comparerons la valeur pronostique de la TnT phosphorylée à celle des marqueurs pronostiques usuellement utilisés. En effet, nous envisageons d'établir une corrélation entre les biomarqueurs classiques de l'IC telles que le BNP, la CRP ou les troponines et le niveau de phosphorylation de la TnT. Pour cela, nous envisageons dans un premier temps de doser le BNP, la TnT et I et la CRP dans le plasma préopératoire et prélevé à 7 jours et à 2 mois post-IDM. Pour cela, nous avons à notre disposition un kit de dosage Milliplex® (Millipore) qui va nous permettre de réaliser ces quatre dosages en une prise d'essai selon le principe d'un dosage ELISA. De manière intéressante, nous comparerons ces

résultats avec les données de BNP, TnT ou I et CRP obtenus dans les différentes populations de patients étudiés, notamment les études REVE-2 [Fertin *et al.* 2010b] et INCA [Mizon-Gerard *et al.* 2004], [de Groot *et al.* 2004]. Nous pourrions ainsi établir une corrélation entre la valeur de la TnT phosphorylée et la gravité de l'IC.

IV) Conclusion générale

La découverte de ce nouveau marqueur associé au RVG et à l'IC, la forme phosphorylée de la TnT pourrait induire : **des progrès diagnostiques**, en permettant de faire le diagnostic d'évolution vers le RVG avec un bon rapport sensibilité/spécificité ; **des progrès dans l'évaluation pronostique**, il peut s'avérer un marqueur prédictif d'évolution défavorable à court et/ou moyen terme éventuellement utilisable en pratique quotidienne ; **des progrès physiopathologiques**, par la mise en évidence d'un système activé dans le RVG et non connu comme tel jusqu'à présent ; et **d'éventuels progrès thérapeutiques**, en mettant en évidence des systèmes à moduler, telles que la *O*-GlcNAcylation, ou au contraire à stimuler, telles que la PKC ϵ , pour prévenir l'évolution vers l'IC.

*Références
bibliographiques*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abbate A, Biondi-Zoccai GG, Baldi A. Pathophysiologic role of myocardial apoptosis in post-infarction left ventricular remodeling. *J Cell Physiol.* 2002; **193**: 145-153.
- Achar SA, Kundu S, Norcross WA. Diagnosis of acute coronary syndrome. *Am Fam.Physician.* 2005; **72**: 119-126.
- Acosta-Martin AE, Chwastyniak M, Beseme O, Drobecq H, Amouyel P, Pinet F. Impact of incomplete DNase I treatment on human macrophage proteome analysis. *Proteomics Clin Appl.* 2009; **3**: 1-11.
- Adamcova M, Pelouch V. Isoforms of troponin in normal and diseased myocardium. *Physiol Res.* 1999; **48**: 235-247.
- Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll.Cardiol.* 2004; **43**: 1731-1737.
- Arrell DK, Neverova I, Fraser H, Marban E, Van Eyk JE. Proteomic analysis of pharmacologically preconditioned cardiomyocytes reveals novel phosphorylation of myosin light chain 1. *Circ.Res.* 2001a; **89**: 480-487.
- Arrell DK, Neverova I, Van Eyk JE. Cardiovascular proteomics: evolution and potential. *Circ.Res.* 2001b; **88** : 763-773.
- Arruda-Olson AM, Pellikka PA, Bursi F, Jaffe AS, Santrach PJ, Kors JA, Killian JM, Weston SA, Roger VL. Left ventricular function and heart failure in myocardial infarction: impact of the new definition in the community. *Am Heart J.* 2008; **156**: 810-815.

B

- Banks RE, Stanley AJ, Cairns DA, Barrett JH, Clarke P, Thompson D, Selby PJ. Influences of blood sample processing on low-molecular-weight proteome identified by surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. *Clin Chem.* 2005; **51**: 1637-1649.
- Baroldi G, Bigi R, Cortigiani L. Ultrasound imaging versus morphopathology in cardiovascular diseases. Myocardial cell damage. *Cardiovasc Ultrasound.* 2005; **3:32**.: 32.
- Barry SP, Davidson SM, Townsend PA. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; **40**: 2023-2039.
- Bauters C, Lamblin N, Ennezat PV, Mycinski C, Tricot O, Nogue O, Segrestin B, Hannebicque G, Agraou B, Polge AS, de Groote P, Helbecque N, Amouyel P. A prospective evaluation of left ventricular remodeling after inaugural anterior myocardial infarction as a function of gene polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone, adrenergic, and metalloproteinase systems. *Am Heart J.* 2007; **153**: 641-648.
- Belin RJ, Sumandea MP, Allen EJ, Schoenfelt K, Wang H, Solaro RJ, de Tombe PP. Augmented protein kinase C-alpha-induced myofilament protein phosphorylation contributes to myofilament dysfunction in experimental congestive heart failure. *Circ.Res.* 2007; **101**: 195-204.
- Beseme O, Fertin M, Drobecq H, Amouyel P, Pinet F. Combinatorial peptide ligand library plasma treatment: Advantages for accessing low-abundance proteins. *Electrophoresis.* 2010; **31**: 2697-2704.

Beutler E, Yoshida A, Kuhl W, Lee JE. The subunits of human hexosaminidase A. *Biochem J.* 1976; **159**: 541-543.

Bianchi C, Miccoli R, Penno G, Del Prato S. Primary prevention of cardiovascular disease in people with dysglycemia. *Diabetes Care.* 2008; **31 Suppl 2:S208-14.**: S208-S214.

Bloom J, Cross FR. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; **8**: 149-160.

Bogaard HJ, Abe K, Vonk NA, Voelkel NF. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest.* 2009; **135**: 794-804.

Bogoyevitch MA. Signalling via stress-activated mitogen-activated protein kinases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res.* 2000; **45**: 826-842.

Bolognese L, Neskovic AN, Parodi G, Cerisano G, Buonamici P, Santoro GM, Antoniucci D. Left ventricular remodeling after primary coronary angioplasty: patterns of left ventricular dilation and long-term prognostic implications. *Circulation.* 2002; **106**: 2351-2357.

Bowling N, Walsh RA, Song G, Estridge T, Sandusky GE, Fouts RL, Mintze K, Pickard T, Roden R, Bristow MR, Sabbah HN, Mizrahi JL, Gromo G, King GL, Vlahos CJ. Increased protein kinase C activity and expression of Ca²⁺-sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation.* 1999; **99**: 384-391.

Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl.J Med.* 2008; **358**: 2148-2159.

Brutsaert DL. The indispensable role of cardiac endothelium in the structure and function of the heart. *Verh.K.Acad Geneesk.Belg.* 2003; **65**: 75-116.

C

Calaghan SC, Le Guennec JY, White E. Cytoskeletal modulation of electrical and mechanical activity in cardiac myocytes. *Prog.Biophys.Mol Biol.* 2004; **84**: 29-59.

Cambou JP. L'ischémie myocardique : économie de santé et données épidémiologiques. *Médecine Nucléaire* 2008; **32**: 425-430.

Chan J, Khafagi F, Young AA, Cowan BR, Thompson C, Marwick TH. Impact of coronary revascularization and transmural extent of scar on regional left ventricular remodelling. *Eur Heart J.* 2008; **29**: 1608-1617.

Chow CK, Lock K, Teo K, Subramanian SV, McKee M, Yusuf S. Environmental and societal influences acting on cardiovascular risk factors and disease at a population level: a review. *Int J Epidemiol.* 2009; **38**: 1580-1594.

Cieniewski-Bernard C, Mulder P, Henry JP, Drobecq H, Dubois E, Pottiez G, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F. Proteomic analysis of left ventricular remodeling in an experimental model of heart failure. *J Proteome.Res.* 2008; **7**: 5004-5016.

Collinson PO. Natriuretic peptide determinations in critical care medicine: part of routine clinical practice or research test only? *Crit Care.* 2009; **13**: 105.

D

de Graauw M, Hensbergen P, van de WB. Phospho-proteomic analysis of cellular signaling. *Electrophoresis*. 2006; **27**: 2676-2686.

de Groote P, Lamblin N, Mouquet F, Plichon D, McFadden E, Van Belle E, Bauters C. Impact of diabetes mellitus on long-term survival in patients with congestive heart failure. *Eur Heart J*. 2004; **25**: 656-662.

de Roos B, Duthie SJ, Polley AC, Mulholland F, Bouwman FG, Heim C, Rucklidge GJ, Johnson IT, Mariman EC, Daniel H, Elliott RM. Proteomic methodological recommendations for studies involving human plasma, platelets, and peripheral blood mononuclear cells. *J Proteome.Res.* 2008; **7**: 2280-2290.

Delom F, Chevet E. Phosphoprotein analysis: from proteins to proteomes. *Proteome.Sci.* 2006; **9**: 4:15.

Derumeaux G, Mulder P, Richard V, Chagraoui A, Nafeh C, Bauer F, Henry JP, Thuillez C. Tissue Doppler imaging differentiates physiological from pathological pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats. *Circulation*. 2002; **105**: 1602-1608.

Devin A, Rigoulet M. Mechanisms of mitochondrial response to variations in energy demand in eukaryotic cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007; **292**: C52-C58.

Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Stromberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K, Vahanian A, Camm J, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL, Tendera M, Auricchio A, Bax J, Bohm M, Corra U, della BP, Elliott PM, Follath F, Gheorghide M, Hasin Y, Hernborg A, Jaarsma T, Komajda M, Kornowski R, Piepoli M, Prendergast B, Tavazzi L, Vachieri JL, Verheugt FW, Zamorano JL, Zannad F. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail*. 2008; **10**: 933-989.

Dinh W, Futh R, Nickl W, Krahn T, Ellinghaus P, Scheffold T, Bansemir L, Bufe A, Barroso MC, Lankisch M. Elevated plasma levels of TNF-alpha and interleukin-6 in patients with diastolic dysfunction and glucose metabolism disorders. *Cardiovasc Diabetol*. 2009; **8**:58.: 58.

Djousse L, Gaziano JM. Alcohol consumption and heart failure: a systematic review. *Curr Atheroscler.Rep*. 2008; **10**: 117-120.

Dubois E, Richard V, Mulder P, Lamblin N, Drobecq H, Henry JP, Amouyel P, Thuillez C, Bauters C, Pinet F. Decreased Serine207 phosphorylation of troponin T as a biomarker for left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2010.

Dutt MJ, Lee KH. Proteomic analysis. *Curr Opin.Biotechnol*. 2000; **11**: 176-179.

E

Ertl G, Frantz S. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2005; **66**: 22-32.

F

Faber MJ, Agnetti G, Bezstarosti K, Lankhuizen IM, Dalinghaus M, Guarnieri C, Caldarera CM, Helbing WA, Lamers JM. Recent developments in proteomics: implications for the study of cardiac hypertrophy and failure. *Cell Biochem Biophys*. 2006; **44**: 11-29.

Ferrari R, Ceconi C, Campo G, Cangiano E, Cavazza C, Secchiero P, Tavazzi L. Mechanisms of remodelling: a question of life (stem cell production) and death (myocyte apoptosis). *Circ.J.* 2009; **73**: 1973-1982.

Fertin M, Beseme O, Duban S, Amouyel P, Bauters C, Pinet F. Deep plasma proteomic analysis of patients with left ventricular remodeling after a first myocardial infarction. *Proteomics Clin Appl*. 2010a; **4**: 1-20.

Fertin M, Hennache B, Hamon M, Ennezat PV, Biaisque F, Elkohen M, Nogue O, Tricot O, Lamblin N, Pinet F, Bauters C. Usefulness of Serial Assessment of B-Type Natriuretic peptide, Troponin I, and C-Reactive Protein to Predict Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction (From the REVE-2 Study). *Am J Cardiol*. 2010b, *in press*.

Franjic B, Marwick TH. The diabetic, hypertensive heart: epidemiology and mechanisms of a very high-risk situation. *J Hum Hypertens*. 2009; **23**: 709-717.

Fukuda N, Terui T, Ohtsuki I, Ishiwata S, Kurihara S. Titin and troponin: central players in the Frank-Starling mechanism of the heart. *Curr Cardiol Rev*. 2009; **5**: 119-124.

Fulop N, Marchase RB, Chatham JC. Role of protein O-linked N-acetyl-glucosamine in mediating cell function and survival in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 2007; **73**: 288-297.

G

Gaertner R, Logeart D, Michel JB, Mercadier JJ. [Early left ventricular remodelling following acute coronary accident]. *Med Sci (Paris)*. 2004; **20**: 643-650.

Gajos G. Optimal treatment for patients after myocardial infarction: some current concepts and controversies. *Pol. Arch Med Wewn*. 2008; **118**: 43-51.

Gerszten RE, Wang TJ. The search for new cardiovascular biomarkers. *Nature*. 2008; **451**: 949-952.

Giannuzzi P, Temporelli PL, Maggioni AP, Ceci V, Chieffo C, Gattone M, Griffo R, Marchioli R, Schweiger C, Tavazzi L, Urbinati S, Valagussa F. Global Secondary Prevention strategies to Limit event recurrence after myocardial infarction: the GOSPEL study. A trial from the Italian Cardiac Rehabilitation Network: rationale and design. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2005; **12**: 555-561.

Gupta MP. Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2007; **43**: 388-403.

H

Haltiwanger RS, Holt GD, Hart GW. Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:peptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem*. 1990; **265**: 2563-2568.

Hein S, Kostin S, Heling A, Maeno Y, Schaper J. The role of the cytoskeleton in heart failure. *Cardiovasc Res*. 2000; **45**: 273-278.

Hess OM. Insuffisance cardiaque: définition, étiologies et classifications. *Forum Med Suisse* 2003; **48**: 1158-1163.

I

Inada H, Goto H, Tanabe K, Nishi Y, Kaibuchi K, Inagaki M. Rho-associated kinase phosphorylates desmin, the myogenic intermediate filament protein, at unique amino-terminal sites. *Biochem Biophys. Res Commun.* 1998; **253**: 21-25.

Inagaki K, Begley R, Ikeno F, Mochly-Rosen D. Cardioprotection by epsilon-protein kinase C activation from ischemia: continuous delivery and antiarrhythmic effect of an epsilon-protein kinase C-activating peptide. *Circulation.* 2005; **111**: 44-50.

Inagaki K, Koyanagi T, Berry NC, Sun L, Mochly-Rosen D. Pharmacological inhibition of epsilon-protein kinase C attenuates cardiac fibrosis and dysfunction in hypertension-induced heart failure. *Hypertension.* 2008; **51**: 1565-1569.

Isobe M, Nagai R, Yamaoki K, Nakaoka H, Takaku F, Yazaki Y. Quantification of myocardial infarct size after coronary reperfusion by serum cardiac myosin light chain II in conscious dogs. *Circ. Res.* 1989; **65**: 684-694.

J

Jideama NM, Noland TA, Jr., Raynor RL, Blobe GC, Fabbro D, Kazanietz MG, Blumberg PM, Hannun YA, Kuo JF. Phosphorylation specificities of protein kinase C isozymes for bovine cardiac troponin I and troponin T and sites within these proteins and regulation of myofilament properties. *J Biol Chem.* 1996; **271**: 23277-23283.

K

Kasama S, Furuya M, Toyama T, Ichikawa S, Kurabayashi M. Effect of atrial natriuretic peptide on left ventricular remodelling in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2008; **29**: 1485-1494.

Kendler KS, Gardner CO, Fiske A, Gatz M. Major depression and coronary artery disease in the Swedish twin registry: phenotypic, genetic, and environmental sources of comorbidity. *Arch Gen. Psychiatry.* 2009; **66**: 857-863.

Kitamura S, Ando S, Shibata M, Tanabe K, Sato C, Inagaki M. Protein kinase C phosphorylation of desmin at four serine residues within the non-alpha-helical head domain. *J Biol Chem.* 1989; **264**: 5674-5678.

Kooij V, Boontje N, Zaremba R, Jaquet K, dos RC, Stienen GJ, van d, V. Protein kinase C alpha and epsilon phosphorylation of troponin and myosin binding protein C reduce Ca²⁺ sensitivity in human myocardium. *Basic Res Cardiol.* 2010; **105**: 289-300.

Krueger KE, Srivastava S. Posttranslational protein modifications: current implications for cancer detection, prevention, and therapeutics. *Mol Cell Proteomics.* 2006; **5**: 1799-1810.

L

Lal A, Veinot JP, Ganten D, Leenen FH. Prevention of cardiac remodeling after myocardial infarction in transgenic rats deficient in brain angiotensinogen. *J Mol Cell Cardiol.* 2005; **39**: 521-529.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la BM, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001; **409**: 860-921.

Lee DS, Vasan RS. Novel markers for heart failure diagnosis and prognosis. *Curr Opin. Cardiol*. 2005; **20**: 201-210.

Lescuyer P, Chevallet M, Rabilloud T. Concepts and therapeutic perspectives of proteomics. *Med Sci (Paris)*. 2004; **20**: 587-592.

Linke WA. Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovasc Res*. 2008; **77**: 637-648.

Liu X, Shu S, Hong MS, Levine RL, Korn ED. Phosphorylation of actin Tyr-53 inhibits filament nucleation and elongation and destabilizes filaments. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2006; **103**: 13694-13699.

Lund GK, Watzinger N, Saeed M, Reddy GP, Yang M, Araoz PA, Curatola D, Bedigian M, Higgins CB. Chronic heart failure: global left ventricular perfusion and coronary flow reserve with velocity-encoded cine MR imaging: initial results. *Radiology*. 2003; **227**: 209-215.

Luther PK. The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. *J Muscle Res Cell Motil*. 2009; **30**: 171-185.

M

- Maisel A, Mehra MR. Understanding B-type natriuretic peptide and its role in diagnosing and monitoring congestive heart failure. *Clin Cornerstone*. 2005; **7 Suppl 1:S7-17.**: S7-17.
- Maisel A, Mueller C, Adams K, Jr., Anker SD, Aspromonte N, Cleland JG, Cohen-Solal A, Dahlstrom U, DeMaria A, Di Somma S, Filippatos GS, Fonarow GC, Jourdain P, Komajda M, Liu PP, McDonagh T, McDonald K, Mebazaa A, Nieminen MS, Peacock WF, Tubaro M, Valle R, Vanderhyden M, Yancy CW, Zannad F, Braunwald E. State of the art: using natriuretic peptide levels in clinical practice. *Eur J Heart Fail*. 2008; **10**: 824-839.
- Mak A, Smillie LB, Barany M. Specific phosphorylation at serine-283 of alpha tropomyosin from frog skeletal and rabbit skeletal and cardiac muscle. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A*. 1978; **75**: 3588-3592.
- Marston SB, Redwood CS. Modulation of thin filament activation by breakdown or isoform switching of thin filament proteins: physiological and pathological implications. *Circ.Res*. 2003; **93**: 1170-1178.
- Martos R, Baugh J, Ledwidge M, O'Loughlin C, Murphy NF, Conlon C, Patle A, Donnelly SC, McDonald K. Diagnosis of heart failure with preserved ejection fraction: improved accuracy with the use of markers of collagen turnover. *Eur J Heart Fail*. 2009; **11**: 191-197.
- Mayr M, Liem D, Zhang J, Li X, Avliyakov NK, Yang JI, Young G, Vondriska TM, Ladroue C, Madhu B, Griffiths JR, Gomes A, Xu Q, Ping P. Proteomic and metabolomic analysis of cardioprotection: Interplay between protein kinase C epsilon and delta in regulating glucose metabolism of murine hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 2009; **46**: 268-277.
- Mayr M, Zhang J, Greene AS, Gutterman D, Perloff J, Ping P. Proteomics-based development of biomarkers in cardiovascular disease: mechanistic, clinical, and therapeutic insights. *Mol Cell Proteomics*. 2006; **5**: 1853-1864.
- McClain DA, Lubas WA, Cooksey RC, Hazel M, Parker GJ, Love DC, Hanover JA. Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A*. 2002; **99**: 10695-10699.
- McMurray JJ, Pfeffer MA. Heart failure. *Lancet*. 2005; **365**: 1877-1889.
- Melanson SF, Lewandrowski EL, Januzzi JL, Lewandrowski KB. Reevaluation of myoglobin for acute chest pain evaluation: would false-positive results on "first-draw" specimens lead to increased hospital admissions? *Am J Clin Pathol*. 2004; **121**: 804-808.
- Mischak H, Julian BA, Novak J. High-resolution proteome/peptidome analysis of peptides and low-molecular-weight proteins in urine. *Proteomics Clin Appl*. 2007; **1**: 792-804.
- Mizon-Gerard F, de Groote P, Lamblin N, Hermant X, Dallongeville J, Amouyel P, Bauters C, Helbecque N. Prognostic impact of matrix metalloproteinase gene polymorphisms in patients with heart failure according to the aetiology of left ventricular systolic dysfunction. *Eur Heart J*. 2004; **25**: 688-693.
- Moe KT, Wong P. Current trends in diagnostic biomarkers of acute coronary syndrome. *Ann Acad Med Singapore*. 2010; **39**: 210-215.
- Mudd JO, Kass DA. Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature*. 2008; **451**: 919-928.

Mulder P, Barbier S, Chagraoui A, Richard V, Henry JP, Lallemand F, Renet S, Lerebours G, Mahlberg-Gaudin F, Thuillez C. Long-term heart rate reduction induced by the selective I(f) current inhibitor ivabradine improves left ventricular function and intrinsic myocardial structure in congestive heart failure. *Circulation*. 2004; **109**: 1674-1679.

Mulder P, Richard V, Compagnon P, Henry JP, Lallemand F, Clozel JP, Koen R, Mace B, Thuillez C. Increased survival after long-term treatment with mibefradil, a selective T-channel calcium antagonist, in heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1997; **29**: 416-421.

N

Neubauer S. The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med*. 2007; **356**: 1140-1151.

Noguchi T, Hunlich M, Camp PC, Begin KJ, El Zaru M, Patten R, Leavitt BJ, Ittleman FP, Alpert NR, LeWinter MM, VanBuren P. Thin-filament-based modulation of contractile performance in human heart failure. *Circulation*. 2004; **110**: 982-987.

Noland TA, Jr., Kuo JF. Protein kinase C phosphorylation of cardiac troponin T decreases Ca(2+)-dependent actomyosin MgATPase activity and troponin T binding to tropomyosin-F-actin complex. *Biochem J*. 1992; **288**: 123-129.

O

Ong SE, Pandey A. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomol Eng*. 2001; **18**: 195-205.

P

Pantos C, Mourouzis I, Markakis K, Dimopoulos A, Xinaris C, Kokkinos AD, Panagiotou M, Cokkinos DV. Thyroid hormone attenuates cardiac remodeling and improves hemodynamics early after acute myocardial infarction in rats. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2007; **32**: 333-339.

Patten RD, Hall-Porter MR. Small animal models of heart failure: development of novel therapies, past and present. *Circ Heart Fail*. 2009; **2**: 138-144.

Perret-Guillaume C, Joly L, Benetos A. Heart rate as a risk factor for cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 2009; **52**: 6-10.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation*. 1985; **72**: 406-412.

Pinet F, Beseme O, Cieniewski-Bernard C, Drobecq H, Jourdain S, Lamblin N, Amouyel P, Bauters C. Predicting left ventricular remodeling after a first myocardial infarction by plasma proteome analysis. *Proteomics*. 2008; **8**: 1798-1808.

Pinet F, Cieniewski-Bernard C, Dubois E, Lamblin N, Beseme O, Chwastyniak M, Amouyel P, Bauters C. Protéomique et marqueurs cardiaques. *Médecine Nucléaire* 2007; **31**: 580-586.

Poulter N. Global risk of cardiovascular disease. *Heart*. 2003; **89 Suppl 2:ii2-5; discussion ii35-7.:** ii2-ii5.

Pruvot S, Galidie G, Bergmann JF, Mahe I. [Troponin and other markers of myocardial ischemia injury, what is the relevance in internal medicine?]. *Rev Med Interne*. 2006; **27**: 215-226.

Pyle WG. Searching for the missing link: a role for the actin capping protein in heart failure. *Can J Cardiol.* 2004; **20**: 1429-1432.

R

Rabilloud T. Detecting proteins separated by 2-D gel electrophoresis. *Anal.Chem.* 2000; **72**: 48A-55A.

Ramirez-Correa GA, Jin W, Wang Z, Zhong X, Gao WD, Dias WB, Vecoli C, Hart GW, Murphy AM. O-linked GlcNAc modification of cardiac myofilament proteins: a novel regulator of myocardial contractile function. *Circ.Res.* 2008; **103**: 1354-1358.

Rasoul S, Dambrink JH, Breeman A, Elvan A, 't Hof AW . The relation between myocardial blush grade and myocardial contrast echocardiography: which one is a better predictor of myocardial damage? *Neth.Heart J.* 2010; **18**: 25-30.

Reichlin T, Hochholzer W, Bassetti S, Steuer S, Stelzig C, Hartwiger S, Biedert S, Schaub N, Buerge C, Potocki M, Noveanu M, Breidthardt T, Twerenbold R, Winkler K, Bingisser R, Mueller C. Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. *N Engl.J Med.* 2009; **361**: 858-867.

Ritter O, Luther HP, Haase H, Baltas LG, Baumann G, Schulte HD, Morano I. Expression of atrial myosin light chains but not alpha-myosin heavy chains is correlated in vivo with increased ventricular function in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *J Mol Med.* 1999; **77**: 677-685.

S

Sanger JW, Ayoob JC, Chowrashi P, Zurawski D, Sanger JM. Assembly of myofibrils in cardiac muscle cells. *Adv.Exp Med Biol.* 2000; **481:89-102; discussion 103-5.**: 89-102.

Savoie C, Equine O, Tricot O, Nogue O, Segrestin B, Sautiere K, Elkohen M, Pretorian EM, Taghipour K, Philiat A, Aumegeat V, Decoulx E, Ennezat PV, Bauters C. Left ventricular remodeling after anterior wall acute myocardial infarction in modern clinical practice (from the REmodelage VEentriculaire [REVE] study group). *Am J Cardiol.* 2006; **98**: 1144-1149.

Schlitt A, Blankenberg S, Bickel C, Meyer J, Hafner G, Jiang XC, Rupprecht HJ. Prognostic value of lipoproteins and their relation to inflammatory markers among patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol.* 2005; **20:102**: 477-485.

Schneider HJ, Friedrich N, Klotsche J, Pieper L, Nauck M, John U, Dorr M, Felix S, Lehnert H, Pittrow D, Silber S, Volzke H, Stalla GK, Wallaschofski H, Wittchen HU. The predictive value of different measures of obesity for incident cardiovascular events and mortality. *J Clin Endocrinol.Metab.* 2010; **95**: 1777-1785.

Shchemelinin I, Sefc L, Necas E. Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases. *Folia Biol (Praha).* 2006; **52**: 81-100.

Singh BN, Rao KS, Ramakrishna T, Rangaraj N, Rao C. Association of alphaB-crystallin, a small heat shock protein, with actin: role in modulating actin filament dynamics in vivo. *J Mol Biol.* 2007; **366**: 756-767.

Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, Szelag A, Schulz R. Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium. *J Pharmacol.Toxicol.Methods.* 2007; **55**: 113-126.

Slawson C, Hart GW. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate: the sweet side of protein regulation. *Curr Opin.Struct.Biol.* 2003; **13**: 631-636.

Spinale FG. The extracellular matrix: summation. *J Card Fail.* 2002; **8**: S349-S350.

Steinberg TH, Agnew BJ, Gee KR, Leung WY, Goodman T, Schulenberg B, Hendrickson J, Beechem JM, Haugland RP, Patton WF. Global quantitative phosphoprotein analysis using Multiplexed Proteomics technology. *Proteomics.* 2003; **3**: 1128-1144.

Sumandea MP, Vahebi S, Sumandea CA, Garcia-Cazarin ML, Staidle J, Homsher E. Impact of cardiac troponin T N-terminal deletion and phosphorylation on myofilament function. *Biochemistry.* 2009; **48**: 7722-7731.

Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovasc Res.* 2009; **81**: 482-490.

Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation.* 2000; **101**: 2981-2988.

T

Taegtmeyer H, Sen S, Vela D. Return to the fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; **1188:191-8.**: 191-198.

Tang WH, Katz R, Brennan ML, Aviles RJ, Tracy RP, Psaty BM, Hazen SL. Usefulness of myeloperoxidase levels in healthy elderly subjects to predict risk of developing heart failure. *Am J Cardiol.* 2009; **103**: 1269-1274.

Thygesen K, Alpert JS, White HD. Universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll. Cardiol.* 2007; **50**: 2173-2195.

Tiyyagura SR, Pinney SP. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: past, present, and future. *Mt. Sinai J Med.* 2006; **73**: 840-851.

Torres CR, Hart GW. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem.* 1984; **259**: 3308-3317.

Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodeling. *Cardiovasc Res.* 2009; **81**: 449-456.

Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, Tolonen H, Ruokokoski E, Amouyel P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet.* 1999; **353**: 1547-1557.

V

Vahebi S, Solaro RJ. Cardiac sarcomeric function, small G-protein signaling, and heart failure. *Panminerva Med.* 2005; **47**: 133-142.

van Empel VP, Bertrand AT, Hofstra L, Crijns HJ, Doevendans PA, De Windt LJ. Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2005; **67**: 21-29.

van d, V, Papp Z, Zaremba R, Boontje NM, de Jong JW, Owen VJ, Burton PB, Goldmann P, Jaquet K, Stienen GJ. Increased Ca²⁺-sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc Res.* 2003; **57**: 37-47.

Vanhoutte D, Heymans S. TIMPs and cardiac remodeling: 'Embracing the MMP-independent-side of the family'. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; **48**: 445-453.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di F, V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M. The sequence of the human genome. *Science.* 2001; **291**: 1304-1351.

Ventura-Clapier R, De Sousa E, Veksler V. Metabolic myopathy in heart failure. *News Physiol Sci.* 2002; **17**:191-6.: 191-196.

Vercauteren M, Remy E, Devaux C, Dautreux B, Henry JP, Bauer F, Mulder P, Hooft vH, Bombrun A, Thuillez C, Richard V. Improvement of peripheral endothelial dysfunction by protein tyrosine phosphatase inhibitors in heart failure. *Circulation.* 2006; **114**: 2498-2507.

Voors AA, von Haehling S, Anker SD, Hillege HL, Struck J, Hartmann O, Bergmann A, Squire I, van Veldhuisen DJ, Dickstein K. C-terminal proasopressin (copeptin) is a strong prognostic marker in patients with heart failure after an acute myocardial infarction: results from the OPTIMAAL study. *Eur Heart J.* 2009; **30**: 1187-1194.

W

Wells L, Whelan SA, Hart GW. O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification. *Biochem Biophys. Res Commun.* 2003; **302**: 435-441.

Wheeler-Jones CP. Cell signalling in the cardiovascular system: an overview. *Heart.* 2005; **91**: 1366-1374.

White CN, Hamilton EJ, Garcia A, Wang D, Chia KK, Figtree GA, Rasmussen HH. Opposing effects of coupled and uncoupled NOS activity on the Na⁺-K⁺ pump in cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008; **294**: C572-C578.

Wilkins MR, Appel RD, Van Eyk JE, Chung MC, Gorg A, Hecker M, Huber LA, Langen H, Link AJ, Paik YK, Patterson SD, Pennington SR, Rabilloud T, Simpson RJ, Weiss W, Dunn MJ. Guidelines for the next 10 years of proteomics. *Proteomics.* 2006; **6**: 4-8.

Willenheimer R. Left ventricular remodelling and dysfunction. Can the process be prevented? *Int J Cardiol.* 2000; **72**: 143-150.

Y

Yki-Jarvinen H. Diabetes mellitus and heart disease. *IDrugs.* 1999; **2**: 576-578.

Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet.* 2004; **364**: 937-952.

Z

Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD, Hart GW. Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *J Biol Chem.* 2004; **279**: 30133-30142.

Zornoff LA, Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, Campana AO, Paiva SA. Effects of beta-carotene and smoking on heart remodeling after myocardial infarction. *Arq Bras. Cardiol.* 2007; **89**: 135-137.

Résumé

Le remodelage ventriculaire gauche (RVG) est un processus complexe qui intervient après un infarctus du myocarde (IDM) chez 30% des patients en dépit des meilleurs traitements connus actuellement. Le but de ma thèse consistait à identifier les déterminants moléculaires du RVG afin de mieux en comprendre les mécanismes physiopathologiques. Nous avons étudié les modifications post-traductionnelles des protéines contractiles du VG, en particulier, la phosphorylation et la *O-N*-acétylglucosamylation (*O*-GlcNAcylation).

Nous avons travaillé en collaboration avec l'unité INSERM U644 de Rouen sur un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque (IC) chez lequel l'IDM est induit par ligature de l'artère coronaire gauche, les rats témoins subissant l'intervention mais sans ligature. Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude globale du phosphoprotéome du VG en phase tardive du RVG. Nous avons mis en évidence trente protéines présentant des modulations de leur niveau de phosphorylation. Nous avons ensuite choisi d'étudier les protéines contractiles : la troponine T (TnT), l'alpha-tropomyosine 1 (α -Tm 1), la desmine, l' α B-crystalline et les chaînes légères de myosine 1 et 2 (MLC). Pour chacune de ces protéines, nous avons validé les résultats obtenus en électrophorèse bidimensionnelle.

Afin de compléter l'analyse des modifications post-traductionnelles, nous avons étudié les modifications de *O*-GlcNAcylation de ces protéines. Nous avons ainsi observé une diminution de la *O*-GlcNAcylation de l' α -Tm 1, de la desmine et l' α B-crystalline ainsi qu'une augmentation de la *O*-GlcNAcylation de la MLC-3 et de la TnT. Par ailleurs, nous avons corrélé les modulations des niveaux de phosphorylation et de *O*-GlcNAcylation avec l'activité des enzymes impliquées dans ces modulations.

Par la suite, nous nous sommes particulièrement intéressés à une des protéines contractiles identifiées, la TnT. L'objectif était de déterminer si la forme phosphorylée de la TnT pourrait être un biomarqueur du RVG post-IDM. Pour cela, nous devons à la fois caractériser ce biomarqueur dans notre modèle expérimental d'IC mais également valider ce biomarqueur dans différentes populations de patients.

Dans le but de caractériser les mécanismes impliqués dans la phosphorylation de la TnT en sérine²⁰⁸, nous avons développé au laboratoire des anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés spécifiquement contre la TnT phosphorylée en sérine²⁰⁸ et la TnT non phosphorylée pour pouvoir la quantifier aisément. Nous avons mis au point les dosages des différentes enzymes impliquées dans les modifications post-traductionnelles de la TnT. Nous avons étudié l'effet d'inhibiteurs ou d'activateurs de ces enzymes sur la contractilité cardiaque dans un modèle de cœur perfusé isolé.

Parallèlement, un dosage ELISA pour quantifier la TnT phosphorylée en sérine²⁰⁸ dans le plasma de patients est actuellement en cours de développement afin de nous permettre de valider la pertinence de l'utilisation de ce biomarqueur en clinique.