

## Rôle du facteur de transcription Bcl11b dans l'homéostasie et le remodelage cardiaque

Marie Thérèse Daher

### ▶ To cite this version:

Marie Thérèse Daher. Rôle du facteur de transcription Bcl11b dans l'homéostasie et le remodelage cardiaque. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS064 . tel-03020424

## HAL Id: tel-03020424 https://theses.hal.science/tel-03020424

Submitted on 23 Nov 2020

**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.





# Sorbonne Université

Ecole doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Laboratoire Adaptation biologique et vieillissement Equipe Cellules Souches, Physiopathologie Cardiovasculaire et Biothérapies « CARTHER »

# Rôle du facteur de transcription Bcl11b dans l'homéostasie et le remodelage cardiaque

Par Marie Thérèse Daher

Thèse de doctorat de Biologie

Dirigée par Zhenlin Li et Ara Parlakian

Présentée et soutenue publiquement le 26 Septembre 2019

Devant un jury composé de :

Pr Sonia Karabina	Présidente du jury
Dr Florence Pinet	Rapporteur
Dr Stéphane Zaffran	Rapporteur
Pr Olivier Rohr	Examinateur
Dr Zhenlin Li	Directeur de thèse
Dr Ara Parlakian	Co-directeur de thèse



### Remerciements

En préambule à ce travail de thèse, j'aimerais prendre quelques lignes pour exprimer ma gratitude aux membres du jury, les docteurs Florence Pinet et Stéphane Zaffran, ainsi que les professeurs Sonia Karabina et Olivier Rohr, et à l'ensemble des personnes qui ont été là pour moi durant ces quatre années de thèse.

J'aimerais commencer par remercier mes directeurs de thèse, les docteurs Zhenlin Li et Ara Parlakian, et tous les membres de l'équipe, ma famille scientifique.

Tout a commencé quand le docteur Ara Parlakian a accepté de m'accueillir pendant cinq mois pour mon stage de M2, il y a plus de quatre ans. Ara, merci pour tout ! Merci pour m'avoir encadrée depuis mon arrivée au laboratoire. Merci pour ton temps, ta patience, tes conseils, ta confiance et ta bienveillance. Ton encadrement m'a permis de grandir scientifiquement et personnellement. Tu étais toujours là pour me guider quand je commençais à me sentir un peu perdue. Tu étais patient quand je prenais le temps d'analyser et d'étudier les nouvelles hypothèses et stratégies mises en place au fur et à mesure de l'avancement du projet. Tu étais à l'écoute quand j'avais des doutes, et toujours disponible pour m'aider dans les démarches scientifiques et personnelles.

Zhenlin, merci pour m'avoir pris sous ton aile pour ma thèse. Ta patience, tes conseils, ton soutien et ta bienveillance ont été primordiaux pour moi, surtout au cours de mes troisième et quatrième années. Tu étais toujours prêt à m'aider dans mes expériences et à passer du temps à discuter de nos résultats et développer des hypothèses qui m'ont aidées à mieux avancer dans mon projet. Ce fut agréable de passer quatre ans et demi dans ton équipe. L'ambiance familiale que tu as créée, a rendu la vie au labo plaisante, surtout pour les étrangers comme moi qui sont loin de leur famille. Ta passion pour le travail et la recherche était contagieuse. Ton optimisme et ta volonté, même après de mauvais résultats, m'ont encouragés à ne pas baisser les bras, même quand je commençais à être fatiguée en fin de thèse.

Je tiens à remercier très chaleureusement Mme la professeur Denise Paulin pour son soutien et sa bienveillance tout au long de ma thèse. Les jeunes scientifiques comme moi ont besoin de votre sagesse et de votre expérience dans le monde scientifique. Vous avez su me pousser quand il fallait. Vous étiez à l'écoute et toujours prête à m'aider au niveau personnel. Pour cela je vous serai toujours reconnaissante.

Jeff, mon voisin de bureau. Merci pour tous ces moments sympas que nous avons partagé. Je suis sûre que je ne trouverai pas un voisin de bureau comme toi. Nos petites discussions sur le cinéma ainsi que les séances privées de visionnage de court métrage vont me manquer. Tu étais aussi toujours disponible pour répondre à mes petites questions techniques et me corriger mon français quand il le fallait.

Jocelyne, tu ne te rappelles probablement pas, mais le fait que tu m'as dit que tu seras toujours disponible si jamais j'ai besoin de quoi que ce soit le premier jour où je suis arrivée au labo m'a tellement réconfortée et rassurée. J'ai toujours apprécié discuter avec toi. Notre petit weekend chez toi à Avallon restera un des meilleurs souvenirs de mon séjour en France.

Zhigang, Dario, Jie, toujours souriants et bienveillants, merci pour tous ces moments et ces discussions partagés pendant mes passages de votre côté du labo et en prenant ma petite pause-café.

Au cours de ces quatre ans que j'ai passées dans le labo, notre équipe a grandi et celle du Professeur Onnik Agbulut nous a rejoints. Je n'oublie donc pas de te remercier Onnik pour tes conseils et ta bonne humeur, même avant que tu ne deviennes mon chef. Je remercie aussi Katia, Pierre, Maria, Yeranuhi, et Gaëlle pour leurs conseils et leur disponibilité. Je tiens à remercier aussi Alexandre, toujours souriant et disponible. Dorota, tu es arrivée au bon moment ! Merci pour ta présence et pour toutes ces petites anecdotes/expériences/conseils que tu as partagés avec moi.

Je n'oublie pas mes collègues thésards, la Team Li : Cynthia, Alexandra, Robin (le revenant !) et Medhi, qui sont devenus aussi mes amis. Avoir des personnes qui savent et qui comprennent ce qu'on vit pendant une thèse est très important pour pouvoir continuer, et j'étais chanceuse que ces personnes soient vous ! Tout le monde a remarqué que je me sentais un peu seule quand vous étiez tous partis ! Mais le fait que l'on n'ait pas perdu contact m'était réconfortant et rassurant.

Un grand merci à tous les membres de l'unité Adaptation Biologique et Vieillissement, spécialement à l'équipe dirigée par le directeur Mr le Professeur Bertrand Friguet, qui étaient mes voisin(e)s de couloirs toujours souriant(e)s.

Je n'aurais jamais pu arriver là où je suis maintenant sans le soutien de ma grande famille et mes amis, au Liban et en France.

Julie et Claudia, merci pour avoir été mon repère à Paris. Vous êtes devenues un peu ma petite famille parisienne. Notre amitié m'est très chère.

Cosette, Michael, Rafi et Lysou, merci pour avoir été toujours là pour moi depuis le tout début. Vous m'avez accueillie dans votre famille Libano-française où je me suis sentie toujours chez moi.

Christina et Clarita, mes petites (mais pas trop petites enfin) sœurs, ce n'était pas très facile des fois, mais nos heures de discussions au téléphone m'ont été nécessaires et vitales. Je vous aime beaucoup.

Maman, je sais que ce n'était pas facile au début de me laisser partir, ça ne l'est toujours pas probablement, mais merci pour avoir cru en moi. Merci pour m'avoir fait confiance, pour tous tes sacrifices et pour tes prières. J'espère un jour avoir la force dont tu fais preuve au quotidien.

## Sommaire

I.	In	troduction	8
1	4.	Maladies cardiovasculaires et remodelage cardiaque	9
	1.	La mort cellulaire des cardiomyocytes	. 11
	2.	Réponse immunitaire : Inflammation et Réparation	. 14
	3.	Remodelage morphologique	. 16
	4.	Défaillance cardiaque	. 23
I	3.	Rythme circadien et cœur	. 24
	1.	Présentation générale	. 24
	2.	Mécanismes moléculaires	. 24
	3.	Rythme circadien, physiologie et physiopathologie cardiovasculaire	. 27
	4.	Rythme circadien, stress et mort cellulaire	. 29
(	2.	Bcl11b : Un nouvel acteur dans l'homéostasie cardiaque	. 31
	1.	Présentation générale et caractéristiques de Bcl11b	. 31
	2.	Bcl11b : un inhibiteur/activateur transcriptionnel	. 35
	3.	Réarrangements chromosomiques et mutations de BCL11B chez l'humain	. 37
	4.	Rôles de Bcl11b chez la souris	. 40
	5.	Bcl11b dans le système cardiovasculaire	.41
	6.	Bcl11b et rythme circadien	. 43
II.	O	bjectifs	. 44
III.		Matériel et méthodes	45
	1.	Modèle animal : Génération des souris Bcl11b-HKO	. 45
	2.	Echocardiographie.	. 45
	3.	Analyses histologiques	. 45
	4.	Analyses transcriptomiques	. 47
	5.	Analyses protéiques	. 48
	6.	Induction de l'hypertrophie par l'Angiotensine II et la Phényléphrine	. 50
	7.	ChIP-qPCR	. 51
	8.	Dissociation et isolement des cardiomyocytes de souris adultes	. 51
	9.	Dissociation, isolement et culture des cardiomyocytes de souris nouveau-nées	. 54

	10.	Traitement des cardiomyocytes en culture par de la doxorubicine	. 55
	11.	Evaluation de la cyto-toxicité des cardiomyocytes	. 55
	12.	Analyses statistiques	. 56
IV.	Ré	sultats	. 59
A	A. Ca	ractérisation des souris adultes déficientes en Bcl11b cardiaque (Bcl11b-HKO) a	u
C	ours d	u temps	. 59
	1.	Inactivation de Bcl11b dans les cardiomyocytes de souris adultes (Bcl11b Hear	t
	Knoc	k out: Bcl11b-HKO)	. 59
	2.	L'inactivation de Bcl11b dans les cardiomyocytes modifie la fonction contracti	le
	du co	eur et l'homéostasie du tissu cardiaque	. 61
	3.	L'inactivation cardiaque de Bcl11b induit une hypertrophie des cardiomyocytes	\$1,
	2 et 5	5 semaines après l'inactivation	. 65
	4.	L'inactivation cardiaque de Bcl11b favorise le développement de la fibrose	. 67
	5.	L'inactivation cardiaque de Bcl11b provoque une mort cellulaire et une réponse	3
	inflaı	mmatoire 1 semaine après inactivation	.71
	6.	Les cardiomyocytes Bcl11b-KO présentent une cyto-toxicité à l'état basal et so	nt
	plus	sensibles au traitement par la doxorubicine	. 74
	7.	Conclusion	.75
В	B. Rô	e de Bcl11b dans la régulation du rythme circadien	.76
	1.	Dérégulation de l'expression des gènes du rythme circadien chez les souris	
	Bcl1	1ь-нко	. 76
	2.	Décalage de l'expression cyclique des gènes du rythme circadien chez les souri	S
	Bcl1	1b-HKO : suivi sur 24h	. 81
	3.	Conclusion	. 81
C	C. Ett	ude de la réponse des souris Bcl11b-HKO à un stress hypertrophique	. 84
	1.	Détermination des gènes cibles de la protéine Bcl11b in vivo	. 84
	2.	Les souris Bcl11b-HKO répondent au stress hypertrophique induit par un	
	traite	ment par de l'Angiotensine II.	. 87
	3.	Conclusion	. 90
V.	Discu	ussion	. 91
A	A. Bc	l11b et l'induction de la mort cellulaire	.91
	1.	Bcl11b et l'apoptose	. 92
	2.	Bcl11b et l'effet cardio-toxique de la doxorubicine	. 92
	3.	Lien entre Bcl11b et les disques intercalaires	. 93

4.	Bcl11b et survie suite à un infarctus du myocarde94
B. E	cl11b, rythme circadien et mort cellulaire95
1.	Bcl11b et régulation du rythme circadien95
2.	Rythme circadien et cardiomyopathies
3.	Bcl11b et régulation du rythme circadien périphérique cardiaque
C. L	implication de Bcl11b dans la régulation des mécanismes d'hypertrophie cardiaque.
9	8
1.	La régulation différentielle des gènes impliqués dans la réponse hypertrophique
par	Bcl11b
2.	Réponse des souris Bcl11b-HKO à un stress hypertrophique
Concl	usion
VI. E	ibliographie
Liste des	Figures
Liste des	tableaux
Liste des	abréviations119

### I. Introduction

Les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de morbidité et mortalité dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de Santé (OMS), 17.5 millions de personnes sont décédées de maladies cardio-vasculaires, représentant 30% de l'ensemble des décès dans le monde (chiffres de 2012). Les maladies cardiovasculaires regroupent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins comme l'infarctus du myocarde, l'hypertension artérielle, les cardiopathies coronariennes et les cardiomyopathies génétiques et acquises. Malgré les avancées dans la prise en charge des patients atteints de cardiomyopathies et les traitements pharmacologiques proposés, l'avènement de la défaillance cardiaque reste souvent inévitable. Pour cela, il est de plus en plus important de caractériser de nouvelles stratégies thérapeutiques en explorant de nouvelles cibles moléculaires. Mon travail de thèse porte sur le phénomène de remodelage cardiaque, conséquence de plusieurs formes de cardiomyopathies. Mon étude se focalise sur l'éventuel rôle du facteur de transcription Bcl11b dans l'homéostasie et le remodelage cardiaque. Pour commencer, la première partie de mon introduction évoquera les mécanismes de remodelage cardiaque survenus suite à un infarctus du myocarde, exemple de trouble cardiaque induisant une mort des cardiomyocytes et suivie par une réponse inflammatoire. La chronothérapie étant de plus en plus prise en compte dans les traitements des maladies cardiovasculaires (coordination du traitement au rythme circadien), la relation entre le rythme circadien, la mort cellulaire et les maladies cardiovasculaires sera évoquée en deuxième partie. La dernière partie de mon introduction forme une vue d'ensemble des caractéristiques et des rôles identifiés du facteur de transcription Bcl11b.

#### A. Maladies cardiovasculaires et remodelage cardiaque

Le cœur, organe vital en contraction/relâchement continu depuis le stade embryonnaire, se compose de plusieurs types cellulaires : Les cardiomyocytes (cellules contractiles cardiaques) (~32.6%), les cellules endothéliales (~55%), les fibroblastes (~12.7%), les leucocytes (~8.5%) et les cellules musculaires lisses vasculaires (~5.7%) (Pinto et al. 2016). Les cardiomyocytes représentent la plus grande partie du volume cardiaque (~70-85%) (Zhou and Pu 2016), ils sont différentiés et possèdent une capacité proliférative faible.

Tout au long de la vie, le cœur subit différents types de stress qui affectent son fonctionnement. Certains sont physiologiques, comme l'activité physique, la grossesse chez les femmes, et d'autres sont pathologiques comme l'hypertension et l'infarctus du myocarde. Le cœur doit remédier à des surcharges de pression, des stimuli de types endocriniens et des lésions (mort cellulaire) en initiant un programme de remodelage cardiaque.

Le remodelage cardiaque fait référence à l'ensemble des mécanismes initiés par le cœur pour répondre, surmonter, s'adapter et retrouver son homéostasie suite à un stress, de type mécanique ou moléculaire. Ce remodelage se caractérise par des altérations au niveau morphologique (hypertrophie, altération du profil d'expression des protéines de la matrice extracellulaire) (Figure 1), moléculaire (réactivation de l'expression des gènes cardiaques fœtaux) et fonctionnel (augmentation de la fréquence cardiaque) (Olson 2004). En présence de stress chronique, les altérations survenues suite au remodelage peuvent devenir pathologiques (dilatation ventriculaire, fibrose, diminution de la fonction contractile) ayant comme conséquence une défaillance cardiaque qui peut induire la mort.



# Figure 1: Représentation schématique des différents phénomènes contribuant au remodelage cardiaque.

Des stimuli pathophysiologiques activent les voies de remodelage cardiaque, engendrant ainsi des modifications moléculaires, morphologiques (hypertrophie, fibrose) et fonctionnelles (dysfonctionnement ventriculaire). En présence de stress chronique, ce remodelage peut avoir comme conséquence une défaillance cardiaque.

#### 1. La mort cellulaire des cardiomyocytes

Une mort cellulaire des cardiomyocytes est le plus souvent observée dans le tissu cardiaque suite à un infarctus du myocarde, généralement dûe à l'hypoxie causée par une occlusion thrombotique d'une artère coronaire. L'ischémie induit de profondes perturbations métaboliques et ioniques dans le myocarde affecté et provoque une dépression rapide de la fonction systolique. L'ischémie myocardique prolongée induit des altérations mitochondriales provoquant ainsi l'activation des mécanismes de mort cellulaire dans les cardiomyocytes : nécrose, nécroptose (nécrose programmée), autophagie et apoptose (Figure 2).

La nécrose et la nécroptose sont caractérisées par un gonflement cellulaire et une perte de l'intégrité de la membrane interne mitochondriale (IMM), menant à la libération des molécules associés aux dégâts (DAMPs : Damage-associated molecular patterns) qui activent une réponse inflammatoire. La nécrose est provoquée par une transition de la perméabilité mitochondriale (Galluzzi et al. 2018). L'entrée de Ca<sup>2+</sup> dans les mitochondries des cardiomyocytes déclenchera l'ouverture du pore de transition de perméabilité (mPTP), causant ainsi une perte brutale du potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta \psi m$ ), un arrêt de la synthèse d'ATP et un afflux d'eau dans la matrice mitochondriale induisant un gonflement cellulaire. Cette entrée non contrôlée de l'eau peut causer la rupture de la membrane externe mitochondriale (OMM), libérant ainsi les apoptogènes (comme Cytochrome c) et activant les voies des caspases (Biala and Kirshenbaum 2014; Frangogiannis 2015). La nécroptose est initiée par l'activation des récepteurs de mort cellulaire comme TNF-a et Fas induisant la formation du complexe II qui contient entre autre les kinases RIP1 et RIP3. En l'absence de la caspase 8, RIP1 et RIP3 s'autophosphorylent pour former le nécrosome (complexe II). Celuici active la protéine pro-nécroptotique MLKL (pseudokinase mixed lineage kinase domainlike) par phosphorylation. MLKL s'insère dans les membranes bilipidiques des organites et de la membrane plasmique entrainant ainsi l'expulsion du contenu cellulaire dans l'espace extracellulaire (Vanden Berghe et al. 2014; Galluzzi et al. 2018).

L'apoptose est une forme « propre » d'élimination de cellules mourantes sans induire une réponse inflammatoire. Les voies biochimiques de la mort cellulaire apoptotique dans le cœur infarci impliquent à la fois une voie de récepteur de mort extrinsèque (TNF- $\alpha$ ) et une voie intrinsèque régulée par les mitochondries. L'élément clé de l'activation de l'apoptose est la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (OMM), un processus qui implique des interactions entre les membres de la famille Bcl-2. La famille Bcl-2 comprend des molécules anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1) qui stabilisent l'OMM, des molécules multi-domaines (Bax, Bak) qui perméabilisent l'OMM et qui peuvent être inhibées par Bcl-2, et des protéines BH3-only (Bad, Bnip3, Bid) qui activent Bax. La perméabilisation de l'OMM libère le cytochrome C dans le cytoplasme où ce dernier se liera à l'adaptateur protéique Apaf-1 (apoptotic protéase activating factor 1) qui va s'oligomériser et initier la cascade d'activation des caspases (9, 7, 3), protéases qui activent des endonucléases et catalysent des protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire (Frangogiannis 2015).

Des études suggèrent que l'apoptose et la nécrose sont impliquées dans la mort des cardiomyocytes suite à un infarctus du myocarde. Des analyses morphologiques montrent un gonflement cellulaire et une perturbation de la membrane des cardiomyocytes, ainsi qu'une réaction inflammatoire intense suite à un infarctus, suggérant une abondance de cardiomyocytes nécrotiques. D'autre part, un grand nombre de cardiomyocytes apoptotiques ont été identifiés dans les cœurs suite à un infarctus (Bialik et al. 1997; Kajstura et al. 1996; Frangogiannis 2015). D'autres études suggèrent que lors d'une ischémie, la plupart des cardiomyocytes au niveau de la zone touchée subissent une nécrose, tandis que la reperfusion pourrait activer des voies pro-apoptotiques (R. A. Gottlieb et al. 1994; R. A. Gottlieb 2011).

L'autophagie dans le cœur est essentielle pour le maintien de son homéostasie et sa fonction. Elle régule la dégradation des protéines, le renouvellement des organelles ainsi que le recyclage des composants cellulaires pendant un stress (Sridhar et al. 2012). L'autophagie dans les cardiomyocytes est activée suite à une ischémie du myocarde et cela en activant la voie AMPK (5' AMP-activated protein kinase, capteur d'énergie cellulaire répondant à de faibles niveaux d'ATP). D'autre part, l'activation de l'autophagie pendant la reperfusion implique la protéine beclin-1. Des études suggèrent que l'autophagie protège les cardiomyocytes de la mort cellulaire pendant l'ischémie (Kanamori et al. 2011). En revanche, le rôle de l'autophagie suite à une ischémie-reperfusion reste controversé (Lavandero et al. 2013).



Figure 2: Interactions des voies de signalisation de la mort cellulaire.

(Biala and Kirshenbaum 2014). L'apoptose et la nécrose sont médiées par les voies du récepteur de mort (extrinsèque) et par la voie mitochondriale (intrinsèque). Dans la voie du récepteur de mort, TNF- $\alpha$  stimule la formation du complexe I comprenant TRADD, TRAF2, TRAF5, RIP1 et cIAP. Le complexe I active la signalisation NF-κB et favorise la survie cellulaire. La dissociation du complexe I du récepteur de TNF $\alpha$  entraîne la deubiquitination de RIP1, qui, avec FADD et RIP3, forme le complexe II. La caspase-8 active peut inactiver le complexe RIP1 / RIP3 en clivant RIP1. Cela libère la caspase-8 du complexe II et déclenche l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose mitochondriale. La signalisation apoptotique activée par la caspase-8 favorise le clivage protéolytique de Bid à t-Bid et le recrutement de protéines Bax / Bak à la membrane externe mitochondriale (OMM). L'oligomérisation de Bax / Bak entraine la perméabilisation de l'OMM, permettant ainsi la libération de cytochrome c et d'autres protéines apoptotiques de la mitochondrie, entraînant une activation accrue des caspases 9, 7 et 3 et une apoptose. D'autre part, l'inhibition de la caspase-8 entraîne la formation du complexe III, qui contient les protéines RIP1 et RIP3 phosphorylées et des protéines adaptatrices de nécrose programmée. Le complexe III favorise la glycolyse et la glutaminolyse, la production de ROS, la surcharge des mitochondries en Ca<sup>2+</sup>, la perte de l'intégrité de la membrane mitochondriale interne (IMM), l'ouverture des pores de transition de perméabilité (mPTP) et la nécrose. Mst-1 régule la réponse au stress, favorisant l'apoptose ou l'autophagie en phosphorylant Beclin-1. En effet, la phosphorylation de Beclin-1 par Mst-1 pendant le stress cellulaire augmente l'affinité du complexe Beclin-1 - Bcl-2, relachant ainsi Bax de Bcl-2 et entraînant une apoptose; alternativement, la phosphorylation de Beclin-1 diminue l'affinité du complexe de Beclin-1-Vps34–Atg14L et inhibe l'autophagie.

#### 2. Réponse immunitaire : Inflammation et Réparation

Suite à un infarctus, les cardiomyocytes nécrotiques libèrent des molécules DAMPs (HSPs, HMGB1 (high mobility group box 1), ATP, ADN). Celles-ci activent les voies de signalisation médiées par IL-1, les récepteurs Toll-like (TLR) et les récepteurs des produits de la glycation (RAGE) dans les fibroblastes, les cellules vasculaires, les leucocytes et les cardiomyocytes survivants à l'ischémie. Le système du complément est aussi activé dans le cœur infarci et contribue à la réponse pro-inflammatoire en accentuant la nécrose et en induisant la réponse pro-inflammatoire via le recrutement des leucocytes (Dreyer et al. 1992). D'autre part, la génération des radicaux libres ROS (reactive oxygen species) est pro-inflammatoire et favorise le chimiotactisme des leucocytes (Hensley et al. 2000). La stimulation des voies de signalisation médiées par IL-1, TLR et RAGE, ainsi que la génération des radicaux libres, activent le facteur nucléaire NF- $\kappa$ B qui induit la transcription des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires.

Ces phénomènes pro-inflammatoires déclenchent une cascade inflammatoire (Figure 3) qui démarre par le recrutement des monocytes de type Ly-6C<sup>high</sup> (CD16<sup>-</sup> chez les humains), attirés par la chimiokine MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) dans la zone affectée où ils vont se différencier en macrophages. Cela marquera le début de la phase proinflammatoire, qui dure en moyenne 4 jours chez la souris. Les macrophages Ly-6C<sup>high</sup> ont une activité phagocytaire, protéolytique et inflammatoire (sécrétion de TNF- $\alpha$  et IL-1b). Elles phagocytent les cellules mortes et digèrent les débris nécrotiques. Le cœur infarci module son profil d'expression de chimiokines au fil du temps suite à la phagocytose des cellules mortes et des débris matriciels. La sécrétion de la Fractalkine permettra le recrutement des monocytes de type Ly-6C<sup>low</sup> (CD16<sup>+</sup> chez les humains) dans la zone affectée. Les monocytes de type Ly-6C<sup>low</sup> initient la phase réparatrice en exprimant IL-10, TGF- $\beta$  et le facteur pro-angiogénique VEGF, induisant ainsi la conversion des fibroblastes en myofibroblastes (activation du programme fibrotique). (Cleutjens et al. 1999; Ertl and Frantz 2005; Frangogiannis, Smith, and Entman 2002; Frantz, Bauersachs, and Ertl 2009; Nahrendorf, Pittet, and Swirski 2010).



Figure 3: Réponse immunitaire après une infarction du myoarde chez la souris.

Suite à un infarctus du myocarde, les lésions tissulaires et la nécrose provoquent la libération de DAMPs qui initient la phase inflammatoire caractérisée par le recrutement de plusieurs sous-types de cellules immunitaires, notamment les neutrophiles et les monocytes Ly- $6C^{high}$ / macrophages M1. Après environ 4 jours, une phase réparatrice commence, caractérisée par un recrutement de monocytes Ly- $6C^{low}$ / macrophages M2.

#### 3. Remodelage morphologique

#### a) L'hypertrophie cardiaque

Durant le stade fœtal de développement, la structuration et la croissance du cœur sont principalement dues à la prolifération des cardiomyocytes. Après la naissance, cette prolifération est fortement ralentie et la croissance du cœur sera le résultat d'une hypertrophie. Il existe deux formes d'hypertrophie cardiaque. La première forme est physiologique, elle peut survenir, lors de la période de croissance post-natale, suite à l'exercice et chez les femmes enceintes (Eghbali et al. 2006; Frey et al. 2004). La deuxième forme est pathologique et peut survenir suite à une surcharge de pression, des perturbations endocrines, un infarctus du myocarde ou un dysfonctionnement contractile résultat des mutations héritées au niveau des protéines sarcomériques ou du cytosquelette (Olson and Schneider 2003). Ce remodelage cardiaque se caractérise par la réactivation des gènes cardiaques fœtaux et l'augmentation de la taille des cardiomyocytes (Olson 2004).

Suite à un infarctus, le cœur compense la dépression rapide de la fonction systolique par une augmentation de la pression et de la surcharge volumique. La détection de ses changements fonctionnels par les disques intercalaires, les connections matrice extracellulaire-sarcomères (exemple : intégrine) (Figure 4) et les canaux ioniques mécanosensitifs active, par mécano-transduction, des voies de signalisation visant à :

- réduire le volume sanguin
- ajouter des sarcomères de façon parallèle (hypertrophie concentrique) pour augmenter la capacité contractile des cardiomyocytes survivants
- modifier le métabolisme énergétique afin de générer plus d'énergie : oxydation des lipides gras pendant la phase compensatoire, change en métabolisme glycolytique vers la fin de la phase compensatoire (Hirota et al. 1999; Harvey and Leinwand 2011).



#### Figure 4: Composition d'un sarcomère cardiaque et d'un disque intercalaire.

(A) Organisation de base d'un sarcomère. Le sarcomère forme l'unité contractile basique dans les cardiomyocytes. Des filaments fins d'actine accrochés à la ligne Z forment des interactions glissantes transitoires avec des filaments épais composés de myosine. La ligne M, la bande I et la bande A sont des caractéristiques anatomiques définies par leurs composants (actine, myosine et protéines du cytosquelette) et par leur apparence en lumière polarisée. La titine relie la ligne Z à la ligne M et contribue aux propriétés élastiques et à la production de force du sarcomère à travers sa région extensible dans la bande I. Le raccourcissement coordonné du sarcomère crée une contraction du cardiomyocyte.

(B) Représentation des composants protéiques majeurs du sarcomère. L'attachement à la matrice extracellulaire est médié par des costamères composés du complexe dystroglycane-glycoprotéine et de l'intégrine. Le rôle de chacune de ces protéines est essentiel pour un bon fonctionnement du cœur. T-cap, titin cap; MyBP-C, myosin-binding protein C; NOS, nitric oxide synthase (Harvey and Leinwand 2011).

(C) Représentation schématique d'un disque intercalaire. Le disque intercalaire se situe au niveau de la ligne Z. Il est constitué de trois types de jonctions qui permettent l'attachement intra-cardiomyocytes, la transduction de la force et la signalisation intracellulaire. Les desmosomes relient les membranes plasmiques aux filaments intermédiaires. Les gap junctions relient le cytoplasme des cardiomyocytes et permettent le passage des ions, permettant ainsi aux potentiels d'action de se propager dans le myocarde. Les fascia adherens constituent des sites d'ancrage de l'actine, reliant ainsi le réseau d'actine entre les cardiomyocytes, et se connectent au sarcomère le plus proche.

Sur le plan moléculaire (Figure 5), une stimulation des voies de signalisation intracellulaires spécifiques est observée. Elle conduit à l'altération de l'expression de gènes impliqués dans la contractilité, l'homéostasie cardiaque, le métabolisme énergétique ainsi que l'induction de l'expression des gènes fœtaux ou néonataux : les gènes codants pour la  $\beta$ -MHC, l'actine  $\alpha$  squelettique, l' « Atrial Natriuretic Factor » (ANF) et le « brain natriuretic factor » (BNP) (Lips et al. 2003). L'ensemble de ces altérations passe par la réactivation de facteurs de transcription cardiaques (GATA4, NFAT, MEF2, SRF...) ainsi qu'une activité accrue de l'ARN polymérase II médiée par l'activation du complexe pTEFb formé par la cycline T et CDK9. A noter que Bcl11b est impliqué dans la régulation de l'activité de CDK9 (cf. I.C.2.b). Les facteurs déclenchant sont le plus souvent d'origine biomécanique et neurohormonale, comme l'adrénaline sécrétée par les médullosurrénales et l'angiotensine II sécrétée par le système rénine-angiotensine. Les principales voies de signalisation impliquées dans le remodelage cardiaque sont celles de l'Akt, des MAPK qui passent par la signalisation des protéines G (M. Li et al. 2005), et de la voie de la calcineurine activée par une augmentation de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (Oka, Dai, and Molkentin 2005).

L'activation de ces voies de signalisation conduit à des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, SUMOylation...) des facteurs de transcription et modifie ainsi leur localisation et leur comportement. Par exemple, la phosphorylation du facteur de transcription NFAT permet sa localisation cytoplasmique. Sa déphosphorylation, suite à l'activation de la voie calcium/calmoduline, entraine sa translocation nucléaire et sa participation à la réponse hypertrophique à travers l'activation de gènes cibles (Wilkins et al. 2004). La sumoylation d'un autre facteur de transcription GATA4 impliqué dans la réponse hypertrophique augmente sa capacité activatrice et participe à sa localisation nucléaire (J. Wang, Feng, and Schwartz 2004). La sumoylation/désumoylation du facteur de transcription Mef2C dans l'hypertrophie cardiaque contribue à la dérégulation de la synthèse des gènes mitochondriaux (Cai et al. 2015).



Figure 5: Voies de signalisation associées à l'hypertrophie cardiaque.

(Harvey and Leinwand 2011). La voie associée aux récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) (en rouge foncé) peut être activée par l'endothéline 1 (ET-1) et l'angiotensine II (AngII), qui sont libérées en réponse à une fonction contractile réduite. Elle facilite l'adaptation de la fonction contractile en augmentant la libération de calcium du réticulum sarcoplasmique. Une augmentation du calcium intracellulaire active la calmoduline et induit l'activation du facteur de transcription MEF2. Dans les cardiomyopathies congénitales, l'incorporation de protéines mutantes dans le sarcomère inhibe la séquestration du calcium à partir du cytosol et augmente davantage l'élévation de la concentration de calcium intracellulaire. La signalisation par GPCR est également associée à l'activation de la voie de signalisation Akt (vert clair) qui induit l'expression des gènes fœtaux et la réponse hypertrophique cardiaque par inhibition de GSK3β. Les voies apoptotiques (bleu clair) sont induites par la libération de cytochrome c (Cyt C) des mitochondries et par l'activation des récepteurs de mort (comme le FasR) par une cytokine telle que le TNF. La surcharge en calcium et la perte de cardiomyocytes contribuent de manière significative à la réduction de la contractilité dans de nombreuses formes de cardiomyopathies. ET-1, endothelin-1; HDAC, histone deacetylase; NFAT, nuclear factor of activated T cells; MEF-2, myocyte enhancer factor 2; SERCA, sarco/endoplasmic reticulum calcium- ATPase; cFLIP, cellular FLICE-inhibitory protein; AngII, angiotensin II; FasR, Fas receptor.

#### b) La fibrose

La fibrose est caractéristique du remodelage cardiaque pathologique. C'est l'accumulation excessive des protéines de la matrice extracellulaire comme les collagènes et la fibronectine. La fibrose peut initialement avoir des fonctions de préservation cardiaque, mais une réponse fibrotique soutenue, observée dans les maladies cardiovasculaires, conduit à la diminution de la fonction cardiaque : l'accumulation persistante de collagènes affecte la morphologie du tissu cardiaque, perturbe la fonction systolique et diastolique et contribue aux arythmies (Piek, de Boer, and Silljé 2016). La fibrose est caractérisée par l'activation des fibroblastes et leur différentiation en myofibroblastes, exprimant et sécrétant une quantité importante de protéines de la matrice extracellulaire.

La matrice extracellulaire est principalement formée de collagène fibrillaire. Le réseau de collagène du myocarde est constitué en majorité de collagène de types I et III (85 et 10%, respectivement, chez le cœur de rongeur normal). Le collagène de type I a une résistance à la traction qui fournit une rigidité au myocarde. Le collagène de type III forme un réseau réticulaire fin, est plus extensible que le collagène de type I et contribue à l'élasticité (Segura, Frazier, and Buja 2014). Minoritaires en terme d'expression mais indispensables, d'autres isoformes de collagène sont présentes dans la matrice extracellulaire comme les collagènes de type V et de type VIII. Pendant la fibrillogenèse, le collagène de type V s'assemble avec le collagène de type I pour former des fibrilles de collagène hétérotypiques (Mak, Png, and Lee 2016). Une étude transcriptomique a montré une association entre l'expression de l'isoforme  $Col5\alpha 2$  et l'ischémie cardiaque (Azuaje et al. 2013). D'autre part, le collagène de type VIII est non fibrillaire et sert comme pont moléculaire entre les différents composants de la matrice extracellulaire (Sutmuller, Bruijn, and de Heer 1997). Une étude sur des souris dépourvues de collagène de type VIII a montré qu'elles présentaient une signalisation du TGF-β atténuée perturbant la différenciation normale des myofibroblastes et la formation de fibrose en réponse à une surcharge de pression (Skrbic et al. 2015).

Au niveau moléculaire, plusieurs voies sont impliquées dans ce processus notamment la voie TGF $\beta$ /Smad (Figure 6). En se liant à ses récepteurs cellulaires, TGF $\beta$  (Transforming Growth factor  $\beta$ ) induit la phophorylation des facteurs de transcription de la famille SMAD (Sma- and Mad-related protein), ce qui entraîne leur délocalisation dans le noyau pour réguler la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la fibrose comme CTGF (Connective Tissue Growth Factor), les collagènes et la fibronectine (Dobaczewski, Chen, and Frangogiannis 2011).

Les protéines SMADs exercent des fonctions distinctes, voire opposées, dans la régulation de la fibrose. SMAD3 est le seul à pouvoir se lier directement aux promoteurs de gènes cibles. Le récepteur TGF $\beta$  activé phophoryle SMAD2 et SMAD3. Ces derniers forment un complexe avec SMAD4 entrainant ainsi leur délocalisation dans le noyau pour induire la transcription des gènes cibles (Figure 4). Plusieurs co-activateurs non-Smad (tels que l'histone acétyltransférase p300 et la protéine CBP : CREB binding protein) et co-suppresseurs (tels que le proto-oncogène Ski et la Smad nuclear-interacting protein-1) se lient aux complexes contenant Smad3 et influencent ainsi la régulation de la transcription. D'autre part, SMAD7 est un régulateur négatif de Smad2/3 et inhibe la fibrose (Meng, Nikolic-Paterson, and Lan 2016). Des études ont montré que les SMADs peuvent être phosphorylés par CDK9. Cette kinase fait partie du complexe pTEFb qui régule l'activité d'élongation de l'ARN polymérase II (Qu et al. 2015). Ces phosphorylations favorisent l'action transcriptionnelle des SMADs et contribuent à leur recyclage.(Alarcón et al. 2009).



#### Figure 6 : Voie TGFβ/SMAD pro-fibrotique.

Suite à leur activation par TGF $\beta$ , les récepteurs TGF $\beta$  phosphorylent SMAD2 et SMAD3. SMAD2 et SMAD3 phosphorylés forment un complexe avec SMAD4. Ce complexe délocalise dans le noyau pour réguler la transcription des gènes pro-fibrotiques.

#### 4. Défaillance cardiaque

Les mécanismes décrits dans les paragraphes précédents, comme l'hypertrophie compensatoire concentrique, visent à compenser la perte des cardiomyocytes et à s'adapter aux changements contractiles suite à l'infarctus du myocarde. Un stress continu induira (1) une dérégulation chronique de la fonction contractile du cœur, (2) un réarrangement de bout en bout de la position des sarcomères (hypertrophie excentrique) qui diminuera la force contractile des cardiomyocytes, et (3) une utilisation chronique du glucose comme source d'énergie qui produit trois fois moins d'ATP que le métabolisme lipidique : développement d'une cardiomyopathie dilatée qui engendre une défaillance cardiaque.

Différents traitements sont appliqués lors de la prise en charge des patients présentant une cardiomyopathie. Des traitements pharmacologiques sont administrés (comme les bétabloquants, les inhibiteurs calciques, les anticoagulants, les inhibiteurs ACE de l'enzyme de conversion de l'Angiotensine...). Cependant, ces traitements ne sont pas suffisamment efficaces pour empêcher l'avènement de la défaillance cardiaque. Des interventions, souvent invasives peuvent être appliquées dans certains cas (myomectomie, installation d'un stimulateur cardiaque, dispositifs d'assistance ventriculaire...). Ces interventions peuvent aller jusqu'à la transplantation cardiaque, d'où l'importance d'optimiser d'avantage la prise en charge des patients avant d'arriver au point de la défaillance cardiaque. Caractériser de nouvelles cibles moléculaires facilitera le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

#### **B.** Rythme circadien et cœur

#### 1. Présentation générale

Le lever et le coucher journaliers du soleil, causés par la rotation de la terre autour de son axe central, provoquent des changements rythmés et prévisibles des facteurs environnementaux comme l'intensité de la lumière, la température et la disponibilité de la nourriture. Pour s'adapter à ces changements, la plupart des espèces sur terre ont mis au point des systèmes de chronométrage biologique endogènes d'une durée d'environ 24 heures (M. W. Young and Kay 2001). Ces horloges circadiennes (24h) anticipent les cycles environnementaux et contrôlent les rythmes quotidiens au niveau biochimique, physiologique et comportemental. Les premières études sur le rythme circadien chez les mammifères ont eu lieu en 1985 quand Ralph et Menaker ont identifié une mutation spontanée, appelée par la suite tau, chez le hamster doré (Ralph and Menaker 1988). Ce mutant présente un rythme circadien de 22h au lieu de 24h. Le hamster doré n'étant pas un modèle génétiquement bien connu, plusieurs études ont suivi dans les années 1990s et 2000s pour identifier les principaux composants du rythme circadien (Clock, Per1, Per2, Per3 et Bmal1) en utilisant des modèles transgéniques de souris (Vitaterna et al. 1994; 1999; Antoch et al. 1997; King et al. 1997; P. L. Lowrey and Takahashi 2000; Phillip L. Lowrey and Takahashi 2004; Reppert and Weaver 2002; M. W. Young and Kay 2001).

#### 2. Mécanismes moléculaires

Un des résultats les plus importants obtenu grâce au modèle *tau* est la démonstration par le biais d'expériences de transplantation que le noyau supra-chiasmatique (NSC) de l'hypothalamus abrite le stimulateur circadien central chez les mammifères (Ralph et al. 1990). Celui-ci, appelé aussi horloge centrale, coordonne le rythme des oscillateurs circadiens périphériques des différents organes du corps. Un oscillateur circadien est le terme utilisé pour décrire un système à différents composants qui interagissent pour créer un rythme à durée définie, et qui a besoin d'un pacemaker (oscillateur spécialisé) pour son bon fonctionnement (Bell-Pedersen et al. 2005). Le NSC reçoit des informations en provenance des photorécepteurs de la rétine et le transmet aux oscillateurs périphériques à travers une combinaison de signaux neuronaux et humoraux. Au niveau de chaque organe existent aussi des rythmes circadiens intrinsèques contrôlés par les gènes et les protéines circadiens intracellulaires, appelés horloges périphériques. Ces horloges périphériques sont responsables de l'adaptation de l'activité des organes aux différents changements de situations comme l'activité physique intense, le travail de nuit ou bien l'alimentation riche. Ils sont synchronisés par l'horloge centrale et sont constitués par les mêmes mécanismes moléculaires que l'horloge centrale, mais agissent sur les gènes et les processus biologiques spécifiques aux organes (Bell-Pedersen et al. 2005).

Les mécanismes moléculaires du rythme circadien sont hautement conservés (Bell-Pedersen et al. 2005) et présents dans la majorité des types cellulaires. Ils se caractérisent par des boucles de régulations à rétrocontrôle négatif (Figure 7). Les éléments centraux de ces mécanismes sont les protéines Bmal1 (brain and muscle ARNT-Like1) et CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) codés par les gènes Arntl et Clock respectivement. Ces molécules se dimérisent pour activer la transcription d'autres gènes du rythme circadien comme Period (Per1, 2, 3) et Cryptochrome (Cry1, 2), et cela en se fixant sur les E-boxes (CANNTG) à proximité de leurs promoteurs. Suite à leur accumulation et leur dimérisation dans le cytoplasme, le complexe formé par Per et Cry rentre dans le noyau pour bloquer la transcription des gènes initiée par le complexe Bmal1-CLOCK, et donc inhiber leur propre transcription : première boucle de rétrocontrôle négative (Yagita et al. 2000; Kume et al. 1999; Griffin, Staknis, and Weitz 1999; Brown, Kowalska, and Dallmann 2012). D'autre part, la deuxième boucle de rétrocontrôle implique les récepteurs nucléaires ROR (RAR-related orphan receptor,) et REV-ERB (codé par le gène Nr1d1 : nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1), dont la transcription est initiée par le complexe Bmal1-CLOCK. ROR et REV-ERB régulent à leur tour l'expression de Bmall en se fixant sur sa séquence régulatrice (Y. Zhang et al. 2015). La régulation de ces mécanismes peut être raffinée par d'autres gènes contrôlés par le rythme circadien, comme CHRONO (ChIP-derived Repressor of Network Oscillator) qui peut interagir avec Bmal1 pour inhiber sa fixation sur les E-boxes (Goriki et al. 2014; Anafi et al. 2014).



#### Figure 7 : Mécanismes moléculaires du rythme circadien.

Les mécanismes du rythme circadien sont initiés par la transmission des signaux lumineux, absorbés par les photorécepteurs localisés dans la rétine, au noyau supra-chiasmatique du l'hypothalamus. Celui-ci synchronise les différentes horloges périphériques du corps. Les éléments moléculaires centraux circadiens sont régulés par des boucles de rétrocontrôle, initiées par le complexe Bmal1-CLOCK qui va se fixer sur les séquences régulatrices E-boxes des gènes du rythme circadien comme *Per*, *Cry*, *Ror* et *Rev-Erb*...

#### 3. Rythme circadien, physiologie et physiopathologie cardiovasculaire

Le rythme circadien cardiaque est un régulateur important de la physiologie cardiovasculaire journalière. Des horloges circadiennes périphériques existent dans les différents types cellulaires du système cardiovasculaire : cellules endothéliales, cellules musculaires lisses vasculaires, fibroblastes et cardiomyocytes. Ces horloges périphériques sont responsables de la synchronisation des processus biologiques indispensables du système cardiovasculaire : pression artérielle, fréquence cardiaque, contractilité et métabolisme énergétique.

Des études sur des modèles murins dont le rythme circadien a été perturbé spécifiquement dans le cœur montrent que celui-ci agit sur le métabolisme du glucose et des acides gras (Bray et al. 2008), et sur l'électrophysiologie cardiaque affectant ainsi les propriétés contractiles oscillatoires (M. E. Young 2016; P. S. Podobed et al. 2014; Jeyaraj et al. 2012). D'autre part, des gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif ont été identifiés comme cibles directes du complexe Bmal1-CLOCK (Figure 8). Le tableau 1 résume les études effectuées sur des modèles de souris dont le rythme circadien est affecté et qui présentent un phénotype cardiovasculaire.



#### Figure 8: Processus biologiques contrôlés par le rythme circadien cardiaque.

Des études ont montré l'expression rythmique, contrôlée par le rythme circadien cardiaque, des gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif, les propriétés contractiles oscillatoires et le métabolisme du glucose et des acides gras.

Modèle animal	Effet
Pmall knockout	Perte des rythmes physiologiques de la fréquence cardiaque et de
Dmail-Knockout	la tension artérielle (Curtis et al. 2007)
Per2-knockout	Dysfonctionnement endothélial (Viswambharan et al. 2007)
Csnk1e-mutant	Cardiomyopathie, fibrose cardiaque et rénale, altération de
(phosphoryle Per)	contractilité cardiaque et maladie rénale. (Martino et al. 2008)
Mutant cardiomyocyte	Perturbation de l'expression de 10% du transcriptome ;
spécifique de Clock	bradycardie, perturbation de la fréquence cardiaque,
specifique de Clock	dysfonctionnement mitochondrial. (Bray et al. 2008)
<i>Bmal1</i> -knockout et mutant	Dysfonctionnement endothélial et remodelage vasculaire
Clock	pathologique (Anea et al. 2009)
	Cardiomyopathie, hypertrophie cardiaque, dysfonctionnement du
Dbp <sup>-/-</sup> Hlf <sup>-/-</sup> Tef <sup>-/-</sup>	ventricule droit et niveaux bas d'aldostérone (Q. Wang et al.
	2010)
Mutant cardiomyocyte-	Tolérance atténuée à l'ischémie-reperfusion (Durgan et al. 2010)
spécifique de Clock	Tolerance attenuee a Tischenne-repertusion (Durgan et al. 2010)
Mutant cardiomyocyte-	
spécifique de <i>Clock</i> et	Cardiomyopathie hypertrophique induite suite à un stimulus
cardiomyocyte-spécifique	hypertrophique (Durgan et al. 2011)
Bmal1-knockout	
<i>Klf15</i> -knockout ( <i>Klf15</i> est	Perte du rythme physiologique de la durée de la repolarisation
régulé par les gènes du	ventriculaire et augmentation de la susceptibilité à des arythmies
rythme circadien)	(Jeyaraj et al. 2012)
Bmal1-knockout	Cardiomyopathie dilatée (Lefta et al. 2012)
Disruption de Bmal1	Bradycardie durée ORS prolongée arythmies ventriculaires
inductible, cardiomyocyte-	(Schroder et al. 2013)
spécifique	(Bellioder et al. 2013)
Mutant cardiomyocyte-	Perturbation de l'expression de 8% du protéome (P. Podobed et
spécifique de <i>Clock</i>	al. 2014)
	Perturbation de l'expression de 10% du transcriptome,
Bmal1-knockout	changements au niveau du métabolisme cardiaque,
cardiomyocyte-spécifique	cardiomyopathie dilatée et mort prématurée (M. E. Young et al.
	2014)
Bmal1-knockout spécifique	Diminution du rythme de 24h de la pression artérielle et
aux cellules musculaires	changement du timing du pic de la pression artérielle (Xie et al.
lisses vasculaires	2015)

Tableau 1 : Dérégulation du rythme circadien cardiaque: Etudes sur des modèles animaux d'après (Crnko et al. 2019).

Chez l'humain, plusieurs études ont établi une association entre les facteurs environnementaux, le mode de vie et le risque accru de subir un infarctus du myocarde. La probabilité de subir un infarctus du myocarde est plus grande le matin, pendant la transition sommeil-réveil (Durgan and Young 2010). Ceci correspond au pic de pression artérielle ainsi qu'à l'augmentation de la fréquence cardiaque. Une étude basée sur six méta-analyses montre une association entre les changements heure d'hiver / heure d'été et une augmentation du risque dans l'avènement d'accidents cardiovasculaires (Manfredini et al. 2018). Ce risque est différent entre les hommes et les femmes et dépend du sens du changement de l'heure (Janszky and Ljung 2008). D'autre part, les patients admis dans des unités de soins intensifs subissent une altération de leur rythme circadien et de leur sommeil, causée par la lumière artificielle durant la nuit, le bruit et les interventions thérapeutiques (Chan et al. 2012). Ces perturbations affectent la pression artérielle et la fréquence cardiaque et augmentent le risque des accidents cardiovasculaires chez les patients (Lim et al. 2005). Cet impact qu'a l'altération du rythme circadien sur le risque accrue de maladies cardiovasculaires est le mieux illustré chez les travailleurs de nuit et les voyageurs qui subissent des décalages horaires (Arendt et al. 1997). La première étude qui a documenté cette relation date de 1986, et a suivi l'état cardiaque des travailleurs de nuit pendant plus que 15 ans (Knutsson et al. 1986). En les comparant à des travailleurs de jour, les travailleurs de nuit avaient une incidence de cardiomyopathie ischémique plus élevée. Toutes ces données ont permis d'adapter et d'optimiser l'administration des traitements pour les maladies cardiovasculaires. L'effet positif de la chronothérapie (coordination du traitement au rythme circadien) dans la prise en charge des maladies cardiovasculaires est de plus en plus pris en considération (Rabinovich-Nikitin et al. 2019).

#### 4. **Rythme circadien, stress et mort cellulaire**

Dans leur revue publiée dans Circulation en Février 2019, Rabinovich-Nikitin et ses collègues abordent les mécanismes de mort cellulaire et de réponse au stress régulés par le rythme circadien ainsi que leurs relations avec les maladies cardiovasculaires (Rabinovich-Nikitin et al. 2019). Les mécanismes caractérisés dans le cœur sont l'autophagie, l'apoptose et la nécrose.

Le lien entre l'autophagie dans les cellules cardiaques et le rythme circadien a été établi dans les années 80s, grâce à une étude qui montre que le volume et la densité numérique des vacuoles autophagiques dans le cœur suivait un rythme diurne qui atteint son niveau maximal pendant la phase tardive de lumière et diminue ensuite pendant le début de la phase obscure (Pfeifer and Strauss 1981). Au niveau moléculaire, plusieurs facteurs régulant l'autophagie sont exprimés d'une manière cyclique: *C/EBP* $\beta$ , impliqué dans l'induction de l'autophagie en réponse à la faim (Ma, Panda, and Lin 2011) ; AMPK, kinase impliquée dans l'activation de plusieurs voies cataboliques, et de l'inhibition de plusieurs processus anaboliques, phosphoryle Cry1 (Lamia et al. 2009) ; ULK1, kinase activée par AMPK, impliquée dans l'initiation de l'autophagie et la régulation de l'homéostasie mitochondriale des cardiomyocytes (J. Kim et al. 2011; Shang et al. 2011) ; PGC1- $\alpha$ , régulateur de l'énergie métabolique et du renouvellement des mitochondries, stimule la transcription de Bmal1 et Rev-Erb $\alpha$  (C. Liu et al. 2007).

Des études dans l'intestin grêle de souris dans les années 80s ont démontré la relation entre le rythme circadien et la mort cellulaire apoptotique après exposition à l'irradiation. Le pic d'induction de l'apoptose était plus élevé le matin que le soir (Ijiri and Potten 1988). Au niveau moléculaire, l'expression de TNF $\alpha$ , activateur de la voie extrinsèque de l'apoptose, dépend du rythme circadien (Keller et al. 2009). D'autre part, p53, qui est activé par la voie intrinsèque de l'apoptose, peut être régulé par Bmal1 et Cry (Rabinovich-Nikitin et al. 2019).

Concernant la nécrose, des études chez la drosophile ont montré la dérégulation de l'expression de RIP1 et PARP1 chez le mutant Clock (McDonald and Rosbash 2001; McDonald, Rosbash, and Emery 2001). PARP1 et RIP1 sont activés dans le myocarde après l'ischémie-reperfusion, parallèlement à la diminution de la fonction contractile et de la teneur en NAD+ et en ATP (Pacher and Szabó 2007; Oerlemans et al. 2012).

Une meilleure compréhension du lien entre le rythme circadien, la réponse au stress (autophagie, mort cellulaire) et la fonction cardiovasculaire pourrait conduire à une optimisation des traitements des maladies cardiovasculaires et de la cardio-protection.

#### C. Bcl11b : Un nouvel acteur dans l'homéostasie cardiaque

#### 1. Présentation générale et caractéristiques de Bcl11b

Bcl11b (B-cell CLL/lymphoma 11B) est une protéine à doigt de zinc impliquée dans la répression de la transcription et dans la régulation du devenir des cellules souches (P. Liu, Li, and Burke 2010). Elle a été initialement décrite comme partenaire du facteur de transcription COUP-TF et est connue sous le nom de Ctip2 (COUP-TF interacting protein 2) (Avram et al. 2000).

Le gène codant pour Bcl11b se situe sur le chromosome 14 q32.2 humain dans une zone qui contient une région de 2,2Mpb non codante, et sur le chromosome 12 murin dans une zone qui contient une région de 1,9Mpb non codante, et est constitué de 4 exons et 3 introns (Figure 9-A).

L'exon 4 code pour la plus grande partie de la protéine Bcl11b, incluant les 6 doigts de zinc C2H2 impliqués dans l'accrochage de Bcl11b sur l'ADN. Un nouveau doigt de zinc de type CCHC a été récemment identifié dans le domaine N-terminal de Bcl11b (Piotr Grabarczyk et al. 2018) et sera impliqué dans la dimérisation de Bcl11b et dans l'interaction entre Bcl11b et les complexes régulateurs de transcription (Figure 9-B).

Bcl11b est exprimé chez les vertébrés. On peut compter 169 homologues répartis sur différentes classes. Un alignement de séquences des protéines Bcl11b humaine, murine, du poisson zèbre et du xénope a montré que 60% des acides aminés sont conservés entre les quatre espèces (Figure 10). Nous pouvons remarquer que les domaines à doigts de zinc, domaines importants pour l'accrochage de Bcl11b sur l'ADN, sont conservés.

Le tableau 2 récapitule les étapes clés dans la recherche sur Bcl11b.



# Figure 9: Représentation schématique de la localisation du gène *BCL11B* chez l'humain et de la protéine Bcl11b.

(A) Chromosome 14 humain comportant *BCL11B*. La région régulatrice non codante en 3' de *BCL11B* fait 2.2Mpb. (B) Représentation des exons de *BCL11B* ainsi que la protéine Bcl11b. Les doigts de zincs ainsi que les domaines de liaison protéiques et les sites de SUMOylation sont présentés dans ce schéma. L'exon 4 du gène *BCL11B* code pour la grande partie de la protéine.

Human Mouse Zebrafish Xenopus	MSRRKQGNPQHLSQRELITPEADHVEAAILEEDEG-LEIEEPSGL-GL <b>MVGGPDPDLL</b> MSRRKQGNPQHLSQRELITPEADHVEATILEEDEG-LEIEEPSSL-GL <b>MVGGPDPDLL</b> MSRRKQGNPQHLSQREIITPEAEHVDAGLAVADLHSHPHPLLDPSMPGPL <b>PPGLGDHDLL</b> MSRRKQGNPQHLLQRDVIAPQDHHHHLETVITDEEEA-IAIPEPGAI-SL <mark>NSSGSDPDLL</mark> ***********************************	56 56 60 58
HUMAN MOUSE ZEBRAFISH XENOPUS	TCGQCQMNFPLGDILVFIEHKRKQCGGSLGACYDKALDKDSPPPSSRSELRKVSEPVE TCGQCQMNFPLGDILVFIEHKKKQCGGLGPCYDKVLDKSSPPPSSRSELRRVSEPVE TCGQCQLTFFLGDILLFIEHKKKQCQALTSGHGCYDKMADRNSPSP-PRAELRKVVEPVE TCGQCQMNFPLGDILVFIEHKKKQCSGPSGVCYEKRMDKSSPPPSTRSELRKVAEPVE ******:.******************************	114 113 119 116
HUMAN MOUSE ZEBRAFISH XENOPUS	IGIQVTPDED-DHLLSPTKGICPKQENIAGPCRPAQLPAVAPIAAS-SHPHSSVITSPLR IGIQVTPDED-DHLLSPTKGICPKQENIAGPCRPAQLPSMAPIAASSSHPPTSVITSPLR IGIQVTPEEEDERLLTPPKGICPKQESG	172 172 147 144
HUMAN MOUSE ZEBRAFISH XENOPUS	ALGALPPCLPLPCCSARPVSGDGTQGEGQTEAPFGCQCQLSGKDEPSS <mark>YICTTCKQPFNS</mark> ALGVLPPCFPLPCCGARPISGDGTQGEGQMEAPFGCQCELSGKDEPSS <mark>YICTTCKQPFNS</mark> LAGRDEPSS <mark>YICTTCKQPFNS</mark> GKDEPSS <mark>YICTTCKQPFNS</mark> *:***************	232 232 168 163
HUMAN MOUSE ZEBRAFISH XENOPUS	AWFLLQHAQNTHGFRIYLEPGPASSSLTPRLTIPPLGPEAVAQSPLMNFLGDSNPFNLL AWFLLQHAQNTHGFRIYLEPGPASTSLTPRLTIPPLGPETVAQSPLMNFLGDSNPFNLL AWFLLQHAQNTHGIRIYLE TNSSNTSLTPRITIPPIGAESIPQSPLTNFLGDNNPFHLL AWFLLQHAQNTHGFRIYLE TSPSSNSLTPRITIPPLGPETVVPSPLMNFLGDNNPFNLL ***************	292 292 228 223
HUMAN MOUSE ZEBRAFISH XENOPUS	RMTGPILRDH-PGFGEGRLPGTPPLFSPPPRHHLDPHRLSAEEMGLVAQHPSAFDRV RMTGPILRDH-PGFGEGRLPGTPPLFSPPPRHHLDPHRLSAEEMGLVAQHPSAFDRV RMTGPLLREPPPGFVENRIPNTPPFVSPPPRHHLDPHRLERLSAEEMGLISQHPSAFERV RMTGPILRDH-PGFGEARLPNTPPLFSPPPRHHLDPHRLSAEEMGLVAQHPSAFDRV *****:**: *** * *:****:	348 348 288 279
HUMAN MOUSE ZEBRAFISH XENOPUS	MRLNPMAIDSPAMDFSRRLRELAGNSSTPPPVSPGRGNPMHRLLNPFQPSPKSPFLST MRLNPMAIDSPAMDFSRRLRELAGNSSTPPPVSPGRGNPMHRLLNPFQPSPKSPFLST MRMTPMAMESQSMDFSRRLRELAGNNSTPPLSPSRANPMHRLLNPNPFQPSPKSPFLST MRLNPMTIESPAMDFSRRLRELAGNNST-PPVSPNRGNPMHRLLNPYQSSPKSPFIST **:.**::: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :	406 406 348 336
HUMAN MOUSE ZEBRAFISH XENOPUS	PPLPPMPPGGTPPPQPPAKS <mark>KSCEFCGKTFKFQSNLIVHRRSHTGEKPYKCQLCDHACSQ</mark> PPLPPMPA-GTPPPQPPAKSKSCEFCGKTFKFQSNLIVHRRSHTGEKPYKCQLCDHACSQ PPLPPMPPNSTTPPQTQGKSKSCEFCGKTFKFQSNLVVHRSHTGEKPYKCQLCDHACSQ PPLPPMPPSSTTPPQTQTKSKSCEFCGKTFKFQSNLIVHRSHTGEKPYKCKLCDHACSQ ******* * *** ****	466 465 408 396
HUMAN MOUSE ZEBRAFISH XENOPUS	ASKLKRHMKTHMHKAGSLAGRSDDGLSAASSPEPGTSELAGEGLKAADGDFRHHESDPSL ASKLKRHMKTHMHKAGSLAGRSDDGLSAASSPEPGTSELPGD-LKAADGDFRHHESDPSL ASKLKRHMKTHMHKSGSMTGRSDDGLSTTSSPEPGTSDVTGEGIKNRDGDFKGEGM ASKLKRHMKTHMHKAGSMTGRSDDGLSATSSPEPGTSELTGEGVKSNETDFRN-ESDPSL ****************	526 524 464 455
HUMAN MOUSE ZEBRAFISH XENOPUS	GHEPEEEDEEEEEEELLLENESRPESSFSMDSELSRNRENGGGGVPGVPGAGGGAAKA GPEPEDDED-EEEEEELLENESRPESSFSMDSELGRGRENGGVPPGVAGAGA-AAA LQDNEEEEEEEEEEEEEEEESRPESNFSMDSEFCRNRENGSKP CHENEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE	586 582 506 501
HUMAN MOUSE ZEBRAFISH XENOPUS	LADEKALVLGKVMENVGLGALPQYGELLADKQKRGAFLKRAAGGGD-AGDDDDAGGCG LADEKALALGKVMEDAGLGALPQYGEKRGAFLKRAGDTGD-AGAVGCG PSDEKTLSLGKMVENVGLSSIQQYNNLIVDNRKRIFSKRISEVQREVGDDDSVVGEMD- IHDEKSLVLGKVMDNVNLASMQAYNDMLHEKHKRSHFMKRSSDPRD-LCQRIPVHEDTVE ***:* ***::::: *:: *:: ** * **.	643 629 565 560
HUMAN MOUSE ZEBRAFISH XENOPUS	DAGAGGAVNGRGGGFAPGTEPFPGLFPRKPAPLPSPGLNSAAKRIKVEKDLELPPA DAGAPGAVNGRGGAFAPGAEPFPALFPRKPAPLPSPGLGGPALHAAKRIKVEKDLELPPA QVERATVNGRNCGSGDSFSGLFPRKPTPITSPSLSNSSNKRIKIEKDLDIPPA REMIPNDEGTVNGNFGP-GEPFPVLLPRKPMPITSSGLNNSSKRIKIEKDLDLPPT .* :* *:**** *: *.*. : ****:****	699 689 618 615
HUMAN MOUSE ZEBRAFISH XENOPUS	ALIPSENVYSQWLVGYAASRHFMKDPFLGFTDARQSPFATSSEHSSENGSLRFSTPPGDL ALIPSENVYSQWLVGYAASRHFMKDPFLGFTDARQSPFATSSEHSSENGSLRFSTPPGDL PLIPSENVYSQWLVGYAASRHFIKDPFLGFTDSRQSPFATSSEHSSENGSLRFSTPPGDL SIIPSENVYSQWLVGYAASRHFMKDPFLGFTDSRQSPFATSSEHSSENGSLRFSTPPGDM :************************	759 749 678 675
HUMAN MOUSE ZEBRAFISH XENOPUS	LDGGLSGRSGTASGGSTPHLG-GPGPGRPSSKEGRRSD <mark>TCEYCGKVFKNCSNLTVHRRSH</mark> LDGGLSGRSGTASGGSTPHLG-GPGPGRPSSKEGRRSD <mark>TCEYCGKVFKNCSNLTVHRRSH</mark> LDGGLSGRSGTASGGSTPHLGGGPGPGRPSSKESRRSD <mark>TCEYCGKVFKNCSNLTVHRRSH</mark> LDGGFSGRSGTASGGSTPHIS-GPGPGRPSSKEGRRSD <mark>TCEYCGKVFKNCSNLTVHRRSH</mark> ****:****************	818 808 738 734
HUMAN MOUSE ZEBRAFISH XENOPUS	TGERPYKCELCNYACAQSSKLTRHMKTHGQIGKEVYRCDICQMPFSVYSTLEKHMKKWHG TGERPYKCELCNYACAQSSKLTRHMKTHGQIGKEVYRCDICQMPFSVYSTLEKHMKKWHG TGERPYKCELCNYACAQSSKLTRHMKTHGQLGKEVYRCDICQMPFSVYSTLEKHMKKWHG ************************************	878 868 798 794
HUMAN MOUSE ZEBRAFISH XENOPUS	EHLLTNDVKIEQAERS 894 EHLLTNDVKIEQAERS 884 EHLMTNEVKIEQAERS 814 EHLLTNDVKIEQAERS 810	

\*:\*\*:\*\*\*\*

\*\*\*\*

Figure 10: Alignement des séquences de la protéine Bcl11b chez l'homme, la souris, le poisson zèbre et le xénope selon le logiciel Clustal O (1.2.4).

60% de similitude a été observé (\*marque les mêmes acides aminés chez les 4 espèces). Doigts de zinc C2H2. Doigt de zinc CCHC.

Dates	Résultats
2000	Découverte et caractérisation de Bcl11b comme facteur répresseur de la transcription(Avram et al. 2000).
2003	Implication dans la différenciation et la survie des lymphocytes T (Wakabayashi, Watanabe, et al. 2003).
2006	Bcl11b favorise la formation d'hétérochromatine en recrutant le complexe répresseur NuRD dans les lymphocytes T (Topark-Ngarm et al. 2006).
2006	Bcl11b favorise la formation d'euchromatine en recrutant le complexe activateur P300 dans les lymphocytes T activés (Cismasiu et al. 2006).
2007	Activité anti-apoptotique dans les lymphocytes T (P. Grabarczyk et al. 2007).
2007	Bcl11b favorise la formation d'hétérochromatine en recrutant le complexe répresseur HDAC/SuV39H1 dans les cellules microgliales. Établissement de la latence du VIH-1(Marban et al. 2007).
2008	Bcl11b est exprimé dans le cerveau et contrôle la différentiation des neurones épineux du striatum (Arlotta et al. 2008).
2009	Bcl11b contrôle la formation des améloblastes pendant l'odontogenèse chez les mammifères (Golonzhka, Metzger, et al. 2009)
2010	Bcl11b favorise l'engagement des cellules souches hématopoïétiques en lymphocytes T (L. Li, Leid, and Rothenberg 2010) (Ikawa et al. 2010) (P. Li et al. 2010).
2012	Association des variations de séquences (SNPs) dans le désert génomique à 3' de <i>BCL11B</i> avec une susceptibilité accrue aux maladies cardiovasculaires (Mitchell et al. 2012)
2013	Bcl11b est un inhibiteur du complexe positif d'élongation P-TEFb (Thomas Cherrier et al. 2013).
2013	Bcl11b régule le métabolisme lipidique de la peau au cours du développement (Z. Wang et al. 2013)
2016- 2017	Bcl11b est un régulateur de l'adipogenèse (Inoue et al. 2016) et de l'énergie métabolique (Inoue et al. 2017)
2017	Bcl11b régule la différentiation des cellules épithéliales dentaires pendant le développement (Z. Li et al. 2017)
2018	Association des variations de séquences (SNPs) dans le désert génomique à 3' de <i>BCL11B</i> avec la variation de pression artérielle nocturne (Rimpelä et al. 2018)

Tableau 2: Étapes clés dans la recherche sur Bcl11b (mise à jour de Le Douce et al. 2014)

#### 2. Bcl11b : un inhibiteur/activateur transcriptionnel

Bcl11b peut réguler la transcription de différentes manières (Figure 11). En se fixant directement sur le promoteur du gène cible via les doigts de zinc (régions riches en G/C : ACCACA, TGCTTG, AGTGCT, AG[AT]GTG, GGATCA (Tang et al. 2011)), Bcl11b sert de plateforme pour le recrutement d'autres complexes protéiques qui varient d'un type cellulaire à l'autre. Bcl11b peut aussi faire partie de complexes protéiques régulant indirectement la transcription, comme le complexe contrôlant l'activité d'élongation de l'ARN polymérase II.

Dans leur étude sur des cellules striatales, Tang et al ont montré que Bcl11b se fixe non seulement sur des régions proximales des gènes cibles à -1000 pb du site d'initiation de transcription, mais aussi dans des régions plus éloignées des sites d'initiation de transcription (-10 000 pb) pouvant correspondre à des zones introniques. Bcl11b peut se fixer sur l'exon 1 de son propre gène, suggérant une possibilité d'autorégulation.

#### a) Compaction de la chromatine

L'état de la conformation de la chromatine est important pour l'initiation ou l'inhibition de la transcription. Il dépend souvent des modifications post traductionnelles au niveau des histones. Ces modifications comprennent : la méthylation des résidus d'arginine (R); la méthylation, l'acétylation, l'ubiquitination, l'ADP-ribosylation et la SUMOylation de lysines (K); la phosphorylation de sérines et de thréonines. Elles peuvent être associées à une transcription active, telles que l'acétylation de l'histone 3 et de l'histone 4 (H3 et H4) et la diou tri-méthylation de H3K4, et engendrent la formation de l'euchromatine. D'autres sont associées à une transcription inactive, telles que la méthylation de H3K9 et H3K27, et engendrent la formation de l'hétérochromatine. Les modifications des histones sont menées par des complexes transcriptionnels co-activateurs (comme p300 ou CBP (Creb-Binding Protein) qui sont des acétyl-transférases) et corépresseurs (comme le complexe NuRD qui est formé en partie de déacétylases HDAC1 et HDAC2, ou SuV39H1 qui est une méthyl-transférase) (B. Li, Carey, and Workman 2007; Koster, Snel, and Timmers 2015; Basta and Rauchman 2015; Ogryzko et al. 1996).

Il a été montré que dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, la fixation de Bcl11b sur le promoteur de gènes cibles conduit à un recrutement du complexe inhibiteur NuRD, engendrant la formation de l'hétérochromatine et une inhibition de la transcription (Cismasiu
et al. 2005). D'autre part, dans les cellules microgliales, la fixation de Bcl11b sur le promoteur du gène *p21* (p21 est une protéine qui favorise l'arrêt du cycle cellulaire) entraîne une inhibition de sa transcription via le recrutement des HDAC1 et 2 et la méthyl-transférase SuV39H1 (Cherrier et al. 2009).

#### b) Complexe CyclinT/CDK9

La transcription est souvent régulée au moment où l'activité d'élongation de l'ARN polymérase II est suspendue à environ 30–60 nucléotides en aval du site de départ de la transcription (TSS), par l'intermédiaire du facteur d'élongation négatif. A ce stade, l'ARN polymérase II attend le recrutement du facteur d'élongation positif de la transcription p-TEFb. pTEFb est un complexe formé de la kinase CDK9 couplée à la cycline T1. p-TEFb libère l'ARN polymérase II et active l'élongation de l'ARNm en phosphorylant le facteur d'élongation négatif et le domaine C-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II (Jonkers and Lis 2015). L'activité de p-TEFb est inhibée par un complexe formé d'HEXIM1 et du snRNA (small nuclear RNA) 7SK (Sano Motoaki and Schneider Michael D. 2004).

En 2013, l'équipe du Pr. Olivier Rhor à Strasbourg a montré que Bcl11b participe à la séquestration du complexe P-TEFb en interagissant avec la protéine HEXIM1, inhibant ainsi la phosphorylation au niveau du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II, phosphorylation nécessaire pour assurer l'élongation des ARN messagers (Cherrier et al. 2013).

#### c) Modification post traductionnelle : la SUMOylation

La SUMOylation est un processus durant lequel un polypeptide appelé SUMO (Small ubiquitin-like modifier) d'environ 11 kDa est greffé de façon covalente aux résidus lysine d'une protéine. Cette modification post traductionnelle peut réguler divers fonctions comme, la transcription, la localisation subcellulaire, la réparation de l'ADN et le cycle cellulaire (Maejima and Sadoshima 2014). Il a été démontré que la sumoylation de Bcl11b au niveau des résidus Lysine K679 et K877 dans les thymocytes modifie son rôle de répresseur transcriptionnel. Plus spécifiquement, la sumoylation de Bcl11b permet le recrutement du co-activateur transcriptionnel p300 au niveau du promoteur d'un des gènes cible de Bcl11b, le gène *Id2* (Ling-juan Zhang et al. 2012).



#### Figure 11: Bcl11b: Un facteur de transcription à double fonction.

Bcl11b peut réguler la transcription de différentes manières :

1) en interagissant avec les HDACs et les méthyltransférases, ce qui va compacter la chromatine et réprimer la transcription ; 2) grâce à la modification post-traductionnelle de Bcl11b, la sumoylation le co-activateur de transcription p300 est recruté, ce qui active la transcription du gène cible ; 3) Bcl11b interagit avec le complexe CyclinT-CDK9 en le réprimant, ce qui induit une diminution de l'activité d'élongation de l'ARN polymérase II.

#### 3. Réarrangements chromosomiques et mutations de BCL11B chez l'humain

A partir des années 2000s, plusieurs études ont décrit des réarrangements chromosomiques au niveau de la région 3' du gène *BCL11B*, ainsi que des mutations au niveau du gène *BCL11B*, chez des patients atteints de leucémie lymphoblastique aiguë des cellules T (T-ALL) (Tableau 3). Ces études ont montré l'implication de Bcl11b dans cette maladie, indirectement ou directement.

Grace à des analyses cytogénétiques (FISH : hybridation in situ en fluorescence) et moléculaires chez des patients T-ALL, Bernard *et al* ont caractérisé le réarrangement chromosomique t(5 ; 14)(q35 ; q32) chez 22% des patients (enfants et adolescents) étudiés. Ce réarrangement a permis l'activation de la transcription du gène proto-oncogène *TLX3* par les éléments régulateurs des cellules-T situés en aval de *BCL11B*. Nagel et al ont identifié un variant de ce réarrangement où l'expression ectopique du gène *NKX2.5* est activée à la place

de *TLX3* (Bernard et al. 2001; Van Vlierberghe et al. 2008; Nagel et al. 2007; Su et al. 2006; Nagel et al. 2003).

L'inversion inv(14)(q11.2q32.31) a été aussi caractérisée chez des patients T-ALL (Przybylski et al. 2005). Ce réarrangement conduit à la création de transcrits fusionnés entre *BCL11B* et des récepteurs de cellules T (segments du gène *TCR*).

Gutierrez *et al* ont montré que 9% des cas de T-ALL étudiés présentent des délétions (microdélétion au niveau des exons 2 et 3 de Bcl11b, délétion impliquant tout le gène *BCL11B* et 6 autres gènes, délétion du bras distal du chromosome 14) ou bien des mutations faux-sens monoalléliques (11 mutations identifiées) de *BCL11B*, suggérant que *BCL11B* est un suppresseur de tumeur haplo-insuffisant (Gutierrez et al. 2011).

D'autre part, des mutations de *BCL11B* ont été aussi décrites chez des patients non T-ALL qui présentent des déficits immunitaires ou des anomalies neurologiques (Tableau 3). Punwani *et al* ont caractérisé une mutation faux-sens hétérozygote de Bcl11b, p.N441K, chez un enfant atteint d'un déficit immunitaire combiné sévère (DICS), avec un degré minimal de fonction immunitaire préservée. Ce patient ne présente aucune autre mutation caractéristique d'un DICS (Punwani et al. 2016). Cette protéine mutée agit probablement comme un dominant négatif et empêcherait l'accrochage de la protéine non mutée à l'ADN. Des anomalies neurologiques, dermatologiques, craniofaciales et un retard mental sont aussi constatés chez le patient. Ce phénotype ressemble aux phénotypes observés chez les souris déficientes en Bcl11b (décrits par la suite).

Plus récemment, sur un groupe de 13 enfants atteints de troubles neurodéveloppementaux avec un nombre réduit de cellules lymphoïdes innées de type 2, Lessel *et al* ont identifiés 10 mutations hétérozygotes de *BCL11B* supplémentaires et 2 réarrangements chromosomiques impliquant le locus de *BCL11B* (t(4;14)(p15;q32.1)) et t(4;14)(q31.1;q32.2)) (Lessel et al. 2018).

Une nouvelle mutation de substitution au niveau du gène *BCL11B* a été identifiée récemment chez un patient atteint d'une cranio-synostose (Goos et al. 2019). Cette mutation affecte un motif conservé au niveau N-terminal de la protéine et réduit l'interaction de Bcl11b avec le complexe trancriptionnel NuRD.

Maladie et Symptômes des natients	Mutations	Type de Mutation	Site affecté de Bcl11b
Leucémie lymphoblastique aigue des cellules T (T-ALL) (Gutierrez et al. 2011)	Ala360Thr His445Tyr Arg447His Glu452Lys	Faux-sens	Doigt de zinc C2H2 affecté (position 427-454) Problèmes de recrutement sur les gènes cibles
	Arg472His His479Tyr		Doigt de zinc C2H2 affecté (position 455-482) Problèmes de recrutement sur les gènes cibles
	Gly596Ser Lys617Glu		Site riche en Glycine
	Gly847Arg		Doigt de zinc C2H2 affecté (position 824-854) Problèmes de recrutement sur les gènes cibles
Déficit immunitaire combiné sévère (DICS), anomalies neurologiques, dermatologiques, craniofaciales et retard mental (Punwani et al. 2016)	Asn441Lys	Faux-sens	Doigt de zinc C2H2 affecté (position 427-454). Problèmes de recrutement sur les gènes cibles (possibilités de nouvelles cibles)
Troubles neuro- développementaux Nombre réduit de cellules	Cys81Leu	Décalage du cadre de lecture	Haplo-insuffisance
lymphoïdes innées de type 2 (Lessel et al. 2018)	Tyr455 Glu499 Thr502His Arg518Ala Asp534Thr Gly649Ala Gly820Ala		Perte des 2 derniers doigts de zinc C2H2 en C-terminal
	Asn807Lys		Doigt de zinc C2H2 affecté (position 796-823). Problèmes de recrutement sur les gènes cibles
	Ala891Pro	0.1	Extension de la protéine (+103 aa)
(Goos et al. 2019)	Arg3Ser	Silencieuse	Domaine N-terminal attecté. Réduction des interactions protéine- protéine

Tableau 3: Mutations de Bcl11b chez l'Homme

#### 4. Rôles de Bcl11b chez la souris

Chez la souris, Bcl11b a été identifié comme suppresseur de tumeur (Wakabayashi, Inoue, et al. 2003); l'absence d'un allèle de *Bcl11b* chez la souris la rend susceptible à un lymphome thymique (Wakabayashi, Inoue, et al. 2003), alors que l'absence des 2 allèles induit la mort des souris juste après la naissance due à des défauts du système immunitaire, du système nerveux central et de la peau (Golonzhka et al. 2007; Golonzhka, Liang, et al. 2009).

#### (1) Différentiation des cellules T

Dans les thymocytes, Bcl11b est un facteur de transcription essentiel qui va atténuer les caractéristiques prolifératives des précurseurs hématopoïétiques et les conduire vers l'engagement en cellules T tout en réprimant leur différenciation en autres lignées alternatives comme les cellules Natural Killer (Di Santo 2010).

#### (2) Développement du cerveau

Bcl11b contrôle la différentiation des neurones épineux moyens du striatum (Arlotta et al. 2008). Elle est exprimé dans les neurones sensoriels de l'organe voméronasal postmitotique ainsi que dans les neurones de projection et les interneurones GABAergiques du bulbe olfactif accessoire (Enomoto et al. 2011). Bcl11b contrôle aussi le développement postnatal du gyrus denté (gyrus du lobe limbique du cortex cérébral) : l'absence de Bcl11b augmente l'apoptose des neurones post-mitotiques et induit l'arrêt de la différentiation des neurones des souris nouveau-nées (Simon et al. 2012). Simon et ses collègues ont aussi étudié les cibles potentielles de Bcl11b dans les neurones du gyrus denté. Le gène codant la desmoplakine a été identifié comme cible de Bcl11b.

## (3) Différenciation des kératinocytes et développement de la barrière de perméabilité épidermique

Bcl11b participe à la régulation de la prolifération et la différenciation des kératinocytes, en régulant l'expression d'EGFR et de Notch1 (L'activation du récepteur de l'EGF (EGFR) stimule la prolifération des kératinocytes dans l'épiderme pendant le développement ; l'activation de la signalisation Notch1 favorise la sortie des kératinocytes du cycle cellulaire et l'entrée dans le programme de différenciation) (Golonzhka, Liang, et al. 2009) (L.-j. Zhang et al. 2012). Bcl11b est aussi indispensable au développement de la barrière de perméabilité épidermique chez la souris (Golonzhka, Liang, et al. 2009) en

contrôlant l'expression, la synthèse et le métabolisme des lipides faisant partie de la couche externe de la peau qui est responsable de la formation et l'entretien de la barrière épidermique (Z. Wang et al. 2013). D'autre part, l'inactivation sélective de Bcl11b dans les kératinocytes déclenche des réactions inflammatoires cutanées semblables à la dermatite atopique chez la souris adulte (Z. Wang et al. 2012).

#### (4) Développement des sutures cranio-faciales

Bcl11b est exprimée pendant le développement embryonnaire des os cranio-faciaux chez la souris (Holmes et al. 2015), et est fortement exprimée au niveau du mésenchyme des sutures. Les souris déficientes en *Bcl11b* souffrent d'une cranio-synostose, due à l'augmentation de la prolifération des ostéoprogéniteurs et de la différentiation prématurée des ostéoblastes (Kyrylkova et al. 2016).

#### (5) Développement asymétrique des incisives : double rôle de Bcl11b

Les souris Bcl11b-KO ont des molaires et des incisives légèrement plus petits que les souris contrôles (Golonzhka, Metzger, et al. 2009). Bcl11b contrôle le développement asymétrique des incisives de la souris en induisant, d'une part, la prolifération et le développement de la niche des cellules souches épithéliales du côté labiale, tout en inhibant, d'autre part, le développement et la prolifération de la même population de cellules du côté lingual (Kyrylkova et al. 2012).

#### 5. Bcl11b dans le système cardiovasculaire

A ce jour, le rôle de Bcl11b dans le système cardiovasculaire n'est pas connu. Aucune donnée n'est rapportée concernant le système cardiovasculaire chez les patients portant des mutations au niveau du gène *BCL11B* et chez le modèle de souris déficiente en *Bcl11b*. Une étude génétique sur un groupe de 20 634 participants a permis d'établir une association entre les variations de séquences (SNPs) en 3' du locus comportant le gène *BCL11B* (locus rs7152623) et une susceptibilité accrue aux maladies cardiovasculaires, et cela en mesurant la rigidité artérielle (Mitchell et al. 2012) (Figure 12). Une deuxième étude génétique a permis d'établir une association des SNPs dans le locus rs4905794 (toujours en 3' du gène *BCL11B*) à la baisse de la pression artérielle nocturne (Rimpelä et al. 2018), suggérant un rôle de Bcl11b dans la régulation de la pression artérielle nocturne, et de ce fait son implication possible dans les maladies cardiovasculaires. Cette région non codante située à 3' du gène

*BCL11B* contient des éléments régulateurs qui peuvent affecter l'expression de *BCL11B*. A noter que cette région est sujette à des réarrangements chromosomiques caractérisés chez les patients T-ALL (Nagel et al. 2007) (Figure 12).

D'autre part, COUP-TF II, partenaire de Bcl11b, joue un rôle important dans le développement cardiaque et ceci en favorisant l'expression des gènes auriculaires (Tbx5) tout en réprimant les gènes ventriculaires (Hey2, Irx) (Wu et al. 2013).

Comme mentionné dans la partie I.C.2.b, Bcl11b interagit avec le complexe CyclinT-CDK9 en le réprimant, ce qui va induire une diminution de l'activité d'élongation de l'ARN polymérase II. Ce complexe pTefb est impliqué dans les mécanismes de l'hypertrophie cardiaque (Sano Motoaki and Schneider Michael D. 2004).

Ces données suggèrent que l'étude de la fonction de Bcl11b dans l'homéostasie cardiaque ainsi que dans les cardiomyopathies hypertrophiques présente un intérêt majeur.



## Figure 12: Représentation schématique du locus comportant le gène *BCL11B* sur le chromosome 14 q32.2 humain.

Les flèches représentent les SNPs associés à un risque accru de maladies cardiovasculaires (Mitchell et al. 2012) et à la baisse de la pression artérielle nocturne (Rimpelä et al. 2018). Les SNPs sont localisés dans la région non codante en 3' de *BCL11B* reconnue par les éléments régulateurs de transcription de *BCL11B*.

### 6. Bcl11b et rythme circadien

Aucun lien n'est établi entre l'expression de *BCL11B* et le rythme circadien à ce jour. Cependant, l'association des SNPs dans le locus rs4905794 (3' du gène *BCL11B*) à la baisse de la pression artérielle nocturne (Rimpelä et al. 2018), a amené les auteurs à considérer une possibilité d'implication de Bcl11b dans la régulation du rythme circadien. En effet, des études ont montré que les partenaires de Bcl11b, HDAC1 et NuRD, participent à la régulation de l'expression du gène du rythme circadien *Per* (Duong et al. 2011) (J. Y. Kim, Kwak, and Weitz 2014).

### II. Objectifs

Préalablement à mon travail de thèse, l'équipe d'Olivier Rohr a montré l'implication de Bcl11b dans la séquestration du complexe P-TEFb, responsable de la régulation de l'activité d'élongation de l'ARN polymérase II (Cherrier et al. 2013). En collaboration avec notre équipe et à travers l'analyse comparative de « microarray », cette étude a suggéré que Bcl11b pourrait réguler l'expression d'une série de gènes impliqués dans l'hypertrophie et le remodelage cardiaque. Cette étude a permis de mettre en évidence, *via* des expériences de ChIP-qPCR réalisées dans des cellules HEK293, la fixation de Bcl11b au niveau du promoteur du gène de la βMHC, un gène induit au cours du remodelage cardiaque. C'est dans cette optique que j'ai réalisé mon stage de Master2 sur l'implication de Bcl11b dans les mécanismes de remodelage hypertrophique cardiaque. J'ai mis en évidence pour la première fois l'expression de Bcl11b dans le cœur de souris adultes et en période post-natale. J'ai aussi mis en évidence la forme SUMOylée de Bcl11b chez des souris nouveau-nées. Mon projet de thèse visait à poursuivre et approfondir l'étude initiée: étudier le rôle de Bcl11b dans l'homéostasie et le remodelage cardiaque en utilisant un modèle de souris qui n'exprime pas Bcl11b et ceci spécifiquement dans les cardiomyocytes.

Dans ce but, nous nous sommes fixés les objectifs suivants:

Caractériser le phénotype des souris adultes déficientes en Bcl11b cardiaque (Bcl11b-HKO) au cours du temps. Des analyses fonctionnelles, morphologiques, et moléculaires ont été effectuées sur des souris Bcl11b-HKO plusieurs temps après l'inactivation de Bcl11b : 1,
 5 semaines et 2, 6 mois. Nous avons aussi étudié l'expression de Bcl11b et l'effet de son activation en utilisant des cardiomyocytes isolés, adultes et nouveau-nés.

2) Mettre en évidence le rôle de Bcl11b dans la régulation du rythme circadien cardiaque. Nous avons suivi l'expression des gènes régulant le rythme circadien sur 24h chez des souris contrôles et Bcl11b-HKO. L'expression des gènes régulant le rythme circadien a été aussi étudiée dans des cultures primaires de cardiomyocytes.

**3) Etudier la réponse des souris Bcl11b-HKO à un stress hypertrophique.** Nous avons déterminé les sites de fixation de Bcl11b sur les promoteurs des gènes impliqués dans l'hypertrophie cardiaque. Ensuite, la réponse des souris Bcl11b-HKO suite à un stress hypertrophiant a été étudiée.

### III. Matériel et méthodes

#### 1. Modèle animal : Génération des souris Bcl11b-HKO

Les souris doubles transgéniques ( $\alpha$ -MHC-MerCreMer: Bcl11b<sup>flox/flox</sup>) ont été obtenues en croisant des souris homozygotes ayant l'exon 4 de Bcl11b floxé (Bcl11b<sup>flox/flox</sup>) développées par le Pr. Pentao Liu (Albu et al. 2007), avec des souris transgéniques exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur cardiaque  $\alpha$ MHC ( $\alpha$ -MHC-MerCreMer) (Parlakian et al. 2005). Des groupes de souris de 2 mois  $\alpha$ -MHC-MerCreMer: Bcl11b<sup>flox/flox</sup> et contrôles (Bcl11b<sup>flox/flox</sup>) ont reçu une dose de tamoxifène en injection intra-péritonéal (35 µg/g par jour; Sigma) 3 jours de suite. L'injection de tamoxifène permet l'inactivation de Bcl11b spécifiquement dans les cardiomyocytes. Cette étude est conforme aux directives institutionnelles et européennes concernant l'utilisation d'animaux dans la recherche (#10217).

#### 2. Echocardiographie.

L'échocardiographie a été réalisée comme décrit précédemment (Diguet et al. 2018) en utilisant l'échocardiographie Doppler (Vivid 7 Dimension / Vivid7 PRO; GE Medical Systems) avec une plage de fréquence d'ultrason de 9-14 MHz, sous anesthésie à l'isoflurane (induction avec 1% d'isoflurane 100%  $O_2$ , maintenu entre 0,2 et 0,25% d'isoflurane, 100%  $O_2$ pendant la durée des mesures). Les mesures ont été effectuées «en aveugle» en ignorant le génotype des souris.

#### 3. Analyses histologiques

Les cœurs des souris ont été récupérés après dislocation cervicale, collés sur un bout de liège et congelés dans de l'isopentane pré-refroidi à l'azote liquide, puis stockés à -80°C. Les cœurs ont été coupés à l'aide d'un microtome cryostat d'une façon transversale en allant de la partie apicale vers la partie centrale pour être divisés en trois parties :  $\approx$ 50 coupes de 20µm pour les extractions d'ARN, des coupes de 8µm d'épaisseur ont été récupérées sur des lames de verres Superfrost®Plus, puis  $\approx$ 100 coupes de 20µm ont été récupérées pour les analyses protéiques.

#### a) Coloration Rouge Sirius

- Décongeler les coupes et fixer au formaldéhyde 3.7% pendant 10min
- Laver 2 fois 5 min avec de l'eau du robinet, 1 fois avec de l'eau distillée
- Laver 1 fois 5 min avec de l'éthanol 100%
- Sécher les coupes au moins 20min
- Incuber pendant 1h dans une solution de rouge Sirius à 0,3% (0,3g de rouge Sirius dilués dans 100mL d'acide picrique saturé)
- Rincer rapidement dans de l'eau distillée
- Fixer le marquage avec deux bains (5 min/bain) d'acide acétique 0,5%
- Déshydrater les coupes par des bains d'éthanol 100%
- Clarification des coupes par deux bains de xylène 100%
- Monter sous lamelles avec un liquide type Eukitt

Les fibres de collagène sont ainsi colorées en rouge, et le cytoplasme est jaune. Des images des régions de fibroses sont prises par microscopie photonique. Le pourcentage de fibrose a été calculé suite à la quantification de la coloration rouge au moyen du logiciel ImageJ.

#### b) Coloration Hématoxyline-Eosine

- Décongeler les coupes et fixer au formaldéhyde 3.7% pendant 10min
- Laver 2 fois 5 min avec de l'eau du robinet
- Incuber pendant 10 min dans une solution d'hématoxyline
- Rincer rapidement dans des bains d'eau du robinet jusqu'à ce que l'eau soit claire
- Tremper brièvement dans une solution d'éthanol 70%, HCl 25% puis rincer dans de l'eau
- Tremper dans du tampon phosphate SDS (PBS) (pH 7,4)
- Incuber dans une solution d'éosine pendant 5min
- Rincer brièvement dans de l'eau puis déshydrater dans plusieurs bains d'éthanol en pourcentages croissants (75%, 80%, 90% et 100%)
- Clarification des coupes par deux bains de xylène 100%
- Monter sous lamelles avec un liquide type Eukitt

Nous pouvons observer les noyaux des cellules colorés en bleu/violet, le cytoplasme des cardiomyocytes est en rose foncé et le collagène est en rose pale. Des images illustrant des régions du ventricule droit du cœur sont prises par microscopie photonique.

#### c) Marquage par immunofluorescence

- Décongeler les coupes et fixer au formaldéhyde 3,7% pendant 7 min
- Laver avec du PBS puis perméabiliser avec du méthanol 100%, pendant 5min
- Laver avec du PBS puis saturer avec du serum albumine bovine (BSA) IgG free 5% pendant 1 à 2h
- Incuber la nuit avec des anticorps primaires, dans des boites humides, à 4°C (Incubation de 45 min à température ambiante pour la vinculine)
- Laver avec du PBS puis incuber avec l'anticorps secondaire adéquat couplé avec un fluorophore pendant 1h à température ambiante, à l'abri de la lumière
- Laver avec du PBS puis incuber avec du Hoechst (marquage des noyaux) pendant 5 min
- Laver avec du PBS puis monter sous lamelle avec le Fluoromount-G<sup>®</sup> de SouthernBiotech

Le tableau 4 comprend la liste des anticorps utilisés en immunofluorescence. Des images de ces coupes ont été prises par microscopie à fluorescence (DMi8, Leica). La quantification de la taille des cardiomyocytes suite au marquage vinculine a été effectuée avec le programme ImageJ (Longueur, largeur, surface longitudinale).

#### 4. Analyses transcriptomiques

#### a) Extraction de l'ARNm

L'extraction de l'ARN total a été effectuée avec le kit RNA NOW<sup>TM</sup> (Ozyme). L'ARN a été extrait à partir des coupes réalisées au cryostat (50 coupes de 20  $\mu$ m), sauf dans le cas des expériences liés au suivi sur 24h de l'expression des gènes impliqués dans le rythme circadien où l'ARN a été extrait à partir de la moitié du cœur congelé directement à l'azote liquide (cœurs coupés en moitié au niveau du milieu du ventricule droit, en longitudinal, avant la congélation à l'azote liquide).

### b) Transcription Inverse et Réaction de Polymérisation en Chaine quantitative (RT-qPCR)

Le protocole utilisé pour la transcription inverse est « First-strand cDNA Synthesis, with RevertAid<sup>TM</sup> M-MuL V Reverse Transcriptase » (Kit Fermentas). L'ARN est rétrotranscrit avec des hexamères de séquences aléatoires. La réaction de polymérisation en chaine quantitative (qPCR) est réalisée avec le kit GoTACK®qPCR Master de Promega avec la machine Light Cycler 480 (Roche Diagnostics). La réaction consiste en une dénaturation de 5 min à 95°C suivie de 40 cycles d'amplification (15s de dénaturation à 95°C, 15s d'hybridation à 60°C, 15s d'élongation à 72°C) et d'une courbe de fusion (incréments de 4,4°C/s jusqu'à 95°C). La méthode du maximum de dérivation de la deuxième dérivation de la courbe de fluorescence est utilisée pour obtenir des Cp (crossing point). Le niveau d'expression des gènes a été calculé par la formule suivante :

 $niveau \ d'expression = 2^{(Cp \ gene \ de \ reference - Cp \ gene \ cible)}$ 

La moyenne des Cp des gènes *GAPDH* et *SDHA* a été utilisée comme Cp de référence. Les résultats sont présentés sous forme de niveau d'expression relatif calculé par rapport à la moyenne du groupe contrôle. Les amorces spécifiques aux gènes ciblés ont été conçues avec le logiciel Primer-Blast de NCBI.

Une liste des amorces utilisées est présentée dans le tableau 5.

#### c) Analyse du transcriptome total par puce Affymetrix

L'extraction de l'ARN total du cœur entier et la purification sur colonne ont été effectuées avec le kit RNAeasy<sup>™</sup> Microarray Tissue (Qiagen). L'ARN purifié a été envoyé à la plateforme génomique de l'institut Cochin. La puce Affymetrix de type Clariom S Mouse a été utilisée.

#### 5. Analyses protéiques

#### a) Extraction des protéines

L'extraction protéique est faite dans le tampon Kinexus composé de : Éthylènediaminetétraacétique (EDTA, 5 mM); acide 3-morpholino-1-propanesulfonique (MOPS, 20 mM, pH 7,0); EGTA (2 mM); NaF (30 mM);  $\beta$  Glycerophosphate (40 mM, pH 7,2); Sodium Pyrophosphate (20 mM); Sodium Orthovanadate (1 mM); Phenylmethylsulfonylfluoride (1 mM); Nonidet P400 (5%). Juste avant l'extraction, un cocktail d'inhibiteurs de protéases (PIC) est ajouté au tampon (20 µL du stock 100x de PIC dans 2 mL du tampon). Suite à une étape d'homogénéisation, le mélange est laissé 20 minutes dans la glace, puis centrifugé à 4°C à une vitesse de 13 500 rpm, pendant 20 minutes. Le surnageant contenant l'extrait protéique est récupéré.

Les extraits protéiques sont ensuite dosés suivant la méthode de Bradford en utilisant la solution Bio-Rad Protein Assay. Une gamme étalon allant de 1 jusqu'à 12  $\mu$ g/ $\mu$ L est faite avec de la BSA. Le dosage est fait avec le spectrophotomètre TECAN® (longueur d'ondes : 595 nm).

#### b) Western Blot

Les gels à gradients (4 à 10% de polyacrylamide) pré-coulés NuPAGE Bis-Tris Mini Gels de Novex (Life Technologies) sont utilisés pour la migration des protéines :

- Préparation des échantillons : ajouter un volume de lithium dodecyl sulfate (LDS)
  (4x) et un volume d'agent réducteur, le dithiothreitol (10x) à un volume d'extrait protéique (20 à 30 µg de protéines)
- Chauffer le mélange à 70°C pendant 10 minutes
- Préparer les tampons de migration (procurés avec les gels)
- Migrer 38 minutes à 200 V
- Transférer sur une membrane de nitrocellulose (1h à 400 mA)
- Vérification du transfert par une coloration au rouge Ponceau
- Lavages avec TBS-T composé de 10% TBS 10x (composition pour 1 L : 60,5 g Tris basique, 97,6 g NaCl, pH 7,6), et de 0,05% Tween
- Saturation avec une solution de TBS-T avec 5% de lait pendant 1 à 2h
- Diluer l'anticorps primaire dans du TBS-T à 3% de lait
- Incuber avec l'anticorps primaire la nuit à 4°C (voir tableau 4 pour la liste des anticorps utilisés)
- Lavages avec TBS-T 4 fois pendant 20 min
- Incuber avec l'anticorps secondaire adéquat couplé à l'HRP (Horseradish peroxidase) pendant 1h à température ambiante (Millipore dilué 1 : 2000)
- Lavages avec TBS-T 4 fois pendant 20 min
- Révéler par la méthode de l'ECL (Enhanced ChemiLuminescent) : laisser agir le substrat HRP (ECL RevelBlOt® Plus, Ozyme) pendant 5 min puis exposer avec l'appareil Fuji LAS 3000

- L'intensité des bandes a été quantifiée en utilisant le programme Multi Gauge de Fujifilm.
- Si besoin, la membrane est incubée avec le tampon de déshybridation (25 mM de glycine et 1% SDS, pH 2,2)

#### 6. Induction de l'hypertrophie par l'Angiotensine II et la Phényléphrine

L'angiotensine II (AngII) est un octapeptide vasoconstricteur qui stimule les récepteurs AT1 au niveau du cœur et des vaisseaux. Cette vasoconstriction est suffisante pour provoquer une hypertension artérielle, et une bradycardie réflexe. Ainsi via son effet hypertenseur, l'Angiotensine II conduit au développement d'une hypertrophie cardiaque. La phényléphrine est un vasoconstricteur qui agit par stimulation des récepteurs al adrénergiques. Cette vasoconstriction artérielle s'accompagne également d'une vasoconstriction veineuse. Elle entraîne une augmentation de la pression artérielle, et une bradycardie réflexe. La puissante vasoconstriction artérielle provoque une augmentation des résistances à l'éjection ventriculaire, entraînant une diminution du débit cardiaque. Ceci entraine une hypertrophie du cœur.

Des mini-pompes osmotiques (Alzet 2002) ont été préparées une journée avant le début du traitement. Ces mini-pompes diffusent leur contenu à une vitesse de 0,5 µl/h.

Pompe à Angiotensine II : Les mini-pompes osmotiques ont été remplies avec de l'Angiotensine II (Sigma) dissoute dans une solution filtrée de NaCl (150 mM) et d'acide acétique (1 mM). Les pompes remplies ont été incubées dans la solution filtrée de NaCl (150 mM) et d'acide acétique (1 mM) à 37°C, pendant 12h.

Pompe à Phényléphrine : Les pompes ont été remplies par une solution filtrée de phényléphrine à 146 mg/mL dissoute dans de l'acide ascorbique à 0,002%. Les pompes remplies ont été incubées dans une solution d'acide ascorbique 0,002% à 37°C, pendant 12h.

La pompe a été introduite au niveau du dos de la souris en sous-cutané et maintenue ainsi pendant 14 jours. Une dose de  $3\mu g/g/jour$  d'Angiotensine II ou de  $3,33\mu g/g/jour$  de phényléphrine, a été libérée dans la circulation. Les souris ont été par la suite sacrifiées, pesées, leurs cœurs disséqués, pesés et congelés dans de l'isopentane pré-refroidi par de l'azote liquide puis stockés à -80°C.

#### 7. ChIP-qPCR

Le kit MagnaChIP de Millipore a été utilisé. L'immunoprécipitation de la chromatine se fait en cinq étapes : (1) cross-linking avec le paraformaldéhyde 1%, cette étape a pour but de fixer les protéines localisées sur la chromatine ; (2) la sonication qui sert à fragmenter la chromatine selon une taille compatible pour faire une PCR quantitative ; (3) l'immunoprécipitation de la chromatine à l'aide des anticorps reconnaissant des protéines d'intérêt (Bcl11b) et des protéines considérées comme contrôle (IgG) ; (4) le renversement du cross-linking avec une solution tampon fournie avec le kit et supplémentée par de la protéinase K, cette étape sert à séparer les protéines immunoprécipitées des fragments d'ADN ; (5) purification et analyse de l'ADN par PCR quantitative (voir le tableau 6 pour la liste des amorces utilisés).

Dans notre étude nous avons mis au point l'ensemble des paramètres permettant de réaliser la ChIP sur le tissu cardiaque (*in vivo*). Le tissu cardiaque a été congelé dans de l'azote liquide puis 150 coupes de 8µm d'épaisseur (épaisseur approximative d'une cellule) ont été réalisées au moyen d'un cryostat. Le « cross-linking » entre les protéines et la chromatine avec 1% de formaldéhyde a été effectué directement sur les coupes pour permettre d'obtenir une fixation efficace des facteurs de transcription. L'étape de sonication a aussi été optimisée : 5 cycles de sonication ont été utilisés.

#### 8. Dissociation et isolement des cardiomyocytes de souris adultes

Une méthode de dissociation et d'isolement des cardiomyocytes de souris adultes simplifiée, sans Langendorff, a été décrite (Ackers-Johnson et al. 2016). Le principe de cette approche est de remplacer la perfusion aortique rétrograde traditionnelle basée sur Langendorff par une simple injection des tampons de dissociation (mélange de collagènases et de protéases) dans le ventricule gauche du cœur (Figure 13).

Nous avons mis au point cette technique dans notre laboratoire (Figure 14). Les étapes de la dissociation et de l'isolement sont décrites dans la Figure 15.

Après l'isolement, une partie des cardiomyocytes a été étalée sur des lames en verre Superfrost®Plus. Juste après l'évaporation de la solution tampon, les cardiomyocytes ont été fixés par une solution de formaldéhyde 3,7% pour ensuite effectuer des marquages d'immunofluorescence comme décrit précédemment. Le reste des cardiomyocytes a été utilisé pour les extractions d'ARN et de protéines.



# Figure 13 : Shémas illustrant le principe de l'approche de dissociation et d'isolement des cardiomyocytes de souris adultes simplifiée, sans Langendorff.

(Ackers-Johnson et al. 2016). L'application d'un clamp hémostatique au niveau aortique (A) force le passage des tampons (flèches bleues; B) à travers la circulation coronaire (rouge), assurant ainsi une perfusion profonde du myocarde.



Figure 14: Système de perfusion mis au point dans notre laboratoire.



### Figure 15 : Résumé des étapes d'isolement de cardiomyocytes adultes.

(Ackers-Johnson et al. 2016).

### 9. Dissociation, isolement et culture des cardiomyocytes de souris nouveaunées

Les kits de Miltenyi Neonatal Heart Dissociation Kit, Red Blood Cell Lysis Solution, Cardiomyocyte Isolation Kit ont été utilisés pour dissocier et isoler les cardiomyocytes de souris Bcl11b<sup>Flox/Flox</sup> nouveau-nées. En résumé, des cœurs de souris Bcl11b<sup>Flox/Flox</sup> âgées de 1 à 2 jours sont récupérés. Les étapes effectuées sont résumées par la suite:

- Etape de digestion :
  - Les cœurs sont incubés dans un tampon de digestion pendant 15min à 37°C
  - Couper les cœurs en deux morceaux
  - o Répéter l'incubation deux fois en recoupant les cœurs en petits morceaux
- Dissocier avec la pipette puis ajouter du milieu de culture (DMEM sans pyruvate, 10% Horse Serum, 5% FBS, 1% Pénicilline/Streptavidine)
- Passer sur tamis 70 μm
- Une étape de lyse des cellules sanguines est réalisée
- Compter les cellules avant de passer à l'étape d'isolement
- Etape d'isolement
  - L'ensemble des cellules est incubé pendant 15min à 4°C avec le kit d'isolement des cardiomyocytes composé de billes magnétiques couplées à des anticorps qui ne retiennent pas les cardiomyocytes
  - Le mélange cellules + billes sera passé sur une colonne magnétique : les cardiomyocytes sont récupérés
- Les cardiomyocytes sont comptés et ensemencés sur des boites de culture recouvertes au préalable par de la laminine
- Le changement de milieu se fait 24h après l'ensemencement la première fois, puis tous les 2 jours

Pour inactiver Bcl11b, les cardiomyocytes sont infectés par des adénovirus exprimant la Cre recombinase et la GFP ( $1,5x10^6$  particules par  $\mu$ L). Une autre partie des cardiomyocytes sera infectée par des adénovirus exprimant uniquement la GFP ( $0,5x10^6$ particules par  $\mu$ L) et seront considérés comme groupe contrôle. L'infection a lieu 3 jours après l'ensemencement.

#### 10. Traitement des cardiomyocytes en culture par de la doxorubicine

Trois jours après l'infection des cardiomyocytes par les adénovirus, ils sont traités pendant 7h par deux doses de doxorubicine (D1515 ; Sigma) :  $5\mu$ M et  $10\mu$ M.

#### 11. Evaluation de la cyto-toxicité des cardiomyocytes

Le kit CyQUANT<sup>™</sup>LDH Cytotoxicity Assay d'Invitrogen a été utilisé pour quantifier l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) par quantification colorimétrique. La LDH est une enzyme cytosolique présente dans de nombreux types de cellules. Une lésion de la membrane plasmique entraîne une libération de LDH dans le milieu de culture cellulaire. Cette LDH extracellulaire peut être quantifiée par une réaction enzymatique couplée dans laquelle la LDH catalyse la conversion du lactate en pyruvate par réduction de NAD + en NADH (Figure 16). La diaphorase utilise ensuite le NADH pour réduire un sel de tétrazolium (INT) en un produit de formazan rouge qui peut être mesuré à 490 nm. Le niveau de production de formazan est directement proportionnel à la quantité de LDH libérée dans le milieu.

Suite à la mesure de l'absorbance, la cyto-toxicité est calculée suivant la formule suivante :

% cytotoxicité = 
$$\left[\frac{\text{Activité LDH de l'échantillon – Activité LDH moyenne du groupe contrôle}}{\text{Activité LDH maximale – Activité LDH moyenne du groupe contrôle}}\right] \times 100$$

Activité LDH de l'échantillon correspond à l'absorbance mesurée par échantillon.

Activité LDH moyenne du groupe contrôle correspond à la moyenne des absorbance du groupe contrôle.

Activité LDH maximale correspond à l'absorbance mesurée dans un puit de cardiomyocytes non infectés, non traités par la doxorubicine mais traités par le tampon de lyse fourni avec le kit.



Figure 16 : Mécanisme de la quantification de l'activité de la LDH extracellulaire (Thermo Fisher Scientific).

#### 12. Analyses statistiques

Le test de Bartlett a été utilisé pour comparer les variances dans chaque groupe (Contrôle, Bcl11b-HKO). Si la différence entre les variances n'était pas statistiquement significative, un test t non apparié a été utilisé. Sinon, le test non paramétrique de Mann Whitney a été utilisé.

D'autre part, dans les expériences ou le paramètre « traitement » a été ajouté (traitements avec AngII, PE ou doxorubicine), une analyse de variance ANOVA à deux facteurs a été réalisée. En cas d'existence de relation entre le traitement et le génotype des souris, le test de Tukey a été utilisé pour comparer les moyennes entre tous les groupes. Des valeurs de p <0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives.

Protéine marquée	<b>Dilution IF</b>	Dilution WB	Référence
Vinculine-FITC	1:500		F7053, Sigma
Fibronectine	1: 250		ab45688, Abcam
F4/80 (Macrophages)	1: 50		sc59171, Santa Cruz
Caspase 3 clivée	1:400		9664, Cell Signaling
Bcl11b		1:10 000	A385, Bethyl
Bcl11b	1:200		12120, Cell Signaling
Vimentine	1:250		GP53, Progen
SMAD2		1:1000	5339P, Cell Signaling
Phospho-SMAD2		1:1000	3108P, Cell Signaling
HSP60		1:200	N-20 sc-1052, Santa Cruz
GAPDH		1:3000	Sigma
Laminine	1:500		L9393, Sigma

Tableau 4: Liste des anticorps utilisés en immunofluorecence (IF) et en western blot (WB)

Gène	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
ANF	GAG ACG GCA GTG CTT CTA GG	TGG GCT CCA ATG CTG TCA ATC
Apaf1	CGA CTG CAG AGG ACA TTT GA	AGC ACG ATG GCA GAG TTC TT
Bax	TGC AGA GGA TGA TTG CTG AC	GAT CAG CTC GGG CAC TTT AG
Bcl2	CTG CAA ATG CTG GAC TGA AA	TCA GGA GGG TTT CCA GAT TG
Bmal1	AAG TGC AAC AGG CCT TCA GT	GGT GGC CAG CTT TTC AAA TA
βΜΗC	GTC AGA GCG CAG CTT CTC C	AAT GCA CTC AAT GCC AGG AT
cActin	CCC CTA GCA CGC CTA CAG AA	GAG CCA TTG TCA CAC ACC AA
Clock	AGG TTT GAT CAC AGC CCA AC	GAG ACT GCG GTG TGA GAT GA
Chrono	CAC CTC ATC TGG AAC AGC AA	CCT TGG GTG TTC AGA CTC GT
Collal	CAC CCT CAA GAG CCT GAG TC	TCC GCT CTT CCA GTC AGA GT
Col1a2	CGA TGG CTG CTC CAA AAA GA	AAT GTC AAG GAA TGG CAG GC
Col3a1	AGG CAA TGA TGG AAA ACC AG	ATG ACA CCA GGC TGA CCT CT
Col5a2	GAT CCC AAC CAA GGG TGC TC	CCA AGA AGT GAT TCT GGC TCC C
Col8a1	GAA TGC CTG GAA TCA AAG GA	GGA TTC CCA TAG GTC CGA TT
Cry1	TTC ACT GCT ACT GCC CTG TG	TTT TGC AGG GAA GCC TCT TA
Cry2	AGC TGA ATT CGC GTC TGT TT	CCT CCT TGG CCA TCT TCA TA
Fibronectine	AAG GTT CGG GAA GAG GTT GT	CCG TGT AAG GGT CAA AGC AT
GAPDH	AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG	GGA TGC AGG GAT GAT GTT CT
IL10	GGC GCT GTC ATC GAT TTC TC	GCC TTG TAG ACA CCT TGG TC
IL1b	AAG GAG AAC CAA GCA ACG AC	CTT GGG ATC CAC ACT CTC CAG
MCP1	CAC CAG CAA GAT GAT CC	ATA AAG TTG TAG GTT CTG ATC TC
Per1	CCA GGA TGT GGG TGT CTT CT	GAG ACC TGA ACC TGC AGA GG
Per2	AAC AAA TCC ACC GGC TAC TG	CTC CGG TGA GAC TCC TCT TG
Per3	GAA AGT GCA TCT CCT GCA CA	GGA GCT GTT CCG TGT CTC TC
SDHA	TGT TCA GTT GCA CCC CAC A	TCT CCA CGA CAC CCTTCT GT
skActin	AGA GCC GTT GTC ACA CAC AA	CGT GAA GCC TCA CTT CCT ACC
SMAD2	CTG GCT CAG TCT GTC AAC CA	TCT GCC TCC GAT ATT CTG CT
TGFb1	TGG AGC AAC ATG TGG AAC TC	CAG CAG CCG GTT ACC AAG
Trp53	GCTTCTCCGAAGACTGGATG	CTTCACTTGGGCCTTCAAAA
Vimentin	TGG TTG ACA CCC ACT CAA AA	CCA CCA AGT GTG TGC AAT TT

Tableau 5 : Liste des amorces utilisées en qPCR

Nom du Gène	Symbole	Séquence			
Myosin Heavy Chain $\beta$	MYH7s1F	TGGTCGTGGTCAGCTTACTCT			
	MYH7s1R	GGCATGTTCAGGGTCTGAGT			
	MYH7s2F	GGGTGTGTGGGCTAAGTTGTAGA			
	MYH7s2R	GCACGCACTGAGATGGATAAAG			
Atrial natriuretic factor	ANFs1F	GCCTGTCATTGCCTCCTCT			
	ANFs1R	TTCTTTCTCCCTGGCAACAG			
	ANFs2F	CTTGAAATTGCACTCCTGGGG			
	ANFs2R	GACTTGAAGAACGGCTGAGG			
Skeletal Actin	skActs1F	AAGGAATGTTGCTGCCCTTCC			
	skActs1R	TCCTCTCCTTCTTTGGTCAGTG			
	skActs2F	ATCCTGTAAGTCCTTGCGGTAT			
	skActs2R	GCTGCTCACTAGGGAAAGAC			
Cardiac Actin	Actc1s1F	GAGAAGGGTTGTCTGAGGGTCT			
	Actc1s1R	TTAGCATCTGAAGACCCGGTGG			
	Actc1s2F	GGCCAGAAAGCATCTAAATGGA			
	Actc1s2R	TCTGTTACCCATTTTGTAGGGGG			

Tableau 6: Liste des amorces utilisées pour la qPCR après l'expérience d'immunoprécipitation de la chromatine

### **IV. Résultats**

# A. Caractérisation des souris adultes déficientes en Bcl11b cardiaque(Bcl11b-HKO) au cours du temps.

## 1. Inactivation de Bcl11b dans les cardiomyocytes de souris adultes (Bcl11b Heart Knock out: Bcl11b-HKO).

Les souris double transgéniques sont obtenues par croisement entre une souris Bcl11b<sup>flox/flox</sup> (P. Li et al. 2010; Albu et al. 2007) et une souris αMHC-MerCreMer (Palermo et al. 1996). Cette stratégie permet une inactivation inductible de Bcl11b dans les cardiomyocytes des souris de 2 mois en excisant l'exon 4 de Bcl11b suite à l'injection de tamoxifène (Figure 17-A). Afin de mettre en évidence l'efficacité de la délétion spécifiquement au niveau des cardiomyocytes, j'ai adapté et mis au point une méthode d'isolation de cardiomyocytes ventriculaires à partir de souris adultes (Ackers-Johnson et al. 2016). Des analyses immunohistologiques et de western blot sur des cardiomyocytes contrôles et mutants ont été réalisées par la suite. L'inactivation de Bcl11b est mise en évidence par immunofluorescence en utilisant un anticorps anti-Bcl11b sur les cardiomyocytes adultes isolés. Les résultats ont montré une absence de cette protéine dans 95% des noyaux des cardiomyocytes isolées à partir des souris Bcl11b-HKO (74,8  $\pm$  9,3% chez les contrôles versus  $3,6 \pm 1,8\%$  chez les Bcl11b-HKO) (Figure 17 –B et C). D'autre part, une analyse quantitative par Western blot des extraits protéiques de cardiomyocytes a montré une diminution de l'expression de Bcl11b de 73% chez les souris Bcl11b-HKO, par rapport aux cardiomyocytes isolés de souris contrôle. (Figure 17 –D, E).

L'inactivation conditionnelle de Bcl11b dans les cardiomyocytes adultes entraîne une diminution d'au moins 73% de la protéine.



### Figure 17: Inactivation conditionnelle de Bcl11b spécifiquement dans les cardiomyocytes.

(A) Représentation schématique de la stratégie utilisée pour inactiver Bcl11b dans les cardiomyocytes. L'administration de tamoxifène par injection intra-péritonéale (3 jours,  $35\mu g/g/jour$ ) aux souris double transgéniques ( $\alpha$ MHC-MerCreMer/Floxed-Bcl11b) induit l'excision de l'exon 4 de *Bcl11b* et son inactivation dans les cardiomyocytes.

(B) Le marquage Bcl11b par immunofluorescence (en vert) sur des cardiomyocytes adultes isolés montre son expression dans le noyau des contrôles, et son absence chez les Bcl11b-HKO. Echelle =  $16\mu m$ .

(C) Pourcentage de cardiomyocytes Bcl11b positifs dans les cardiomyocytes adultes isolés de souris contrôles et Bcl11b-HKO (n=3 ; 500 à 1000 cardiomyocytes sont comptés par échantillon).

(D) Analyse de l'expression de la protéine Bcl11b par Western Blot (30  $\mu$ g de protéines extraites de cardiomyocytes adultes isolés par piste). La Heat Shock Protein 60 (HSP60) est utilisée comme témoin de charge.

(E) Quantification de l'expression de la protéine Bcl11b (n=3). Les données sont présentées en valeurs moyennes  $\pm$  sem.

\*p<0,05 signifie une différence significative entre les souris contrôles et Bcl11b-HKO (test t non apparié).

## 2. L'inactivation de Bcl11b dans les cardiomyocytes modifie la fonction contractile du cœur et l'homéostasie du tissu cardiaque.

Pour étudier l'effet de l'inactivation de Bcl11b sur la fonction et l'homéostasie cardiaque, des analyses fonctionnelles (échocardiographie), morphologiques et moléculaires sont effectuées sur les souris Bcl11b-HKO et les souris contrôles, 2 et 6 mois après l'inactivation de Bcl11b (Figure 18).

#### Analyses fonctionnelles (échocardiographie)

La fonction contractile des souris Bcl11b-HKO (Figure 18-A) est modifiée à partir de 2 mois post-inactivation. En effet, le volume télésystolique des souris Bcl11b-HKO est augmenté de  $0,025\text{ml} \pm 0,010$  par rapport aux souris contrôles 2 mois après l'inactivation de Bcl11b. Cette augmentation est maintenue 6 mois après l'inactivation ( $0,022\text{ml} \pm 0,007$ ). D'autre part, la fraction d'éjection (FE) et la fraction de raccourcissement (FR) sont diminuées respectivement de  $10,27 \pm 2,94\%$  pour la FE et de  $6,87 \pm 2,14\%$  pour la FR 2 mois après le KO. Ces valeurs restent stables 6 mois après l'inactivation. L'ensemble des paramètres échocardiographiques mesurés est représenté dans le tableau 7 (page 64).

#### **Analyses morphologiques**

Au niveau morphologique, des régions fibrotiques sont observées dans les coupes de tissu cardiaque Bcl11b-HKO, mises en évidence par la coloration au rouge Sirius (Figure 18-B). Le dépôt de collagène augmente 2 et 6 mois après l'inactivation de Bcl11b (2 mois après KO:  $21,17 \pm 1,11\%$ , comparé à  $14,58 \pm 0,83\%$  chez les contrôles ; 6 mois après KO:  $30,47 \pm 0,94\%$  comparé à  $18,72 \pm 1,74\%$  chez les contrôles). Une coloration rouge Sirius intense reflète une augmentation du dépôt de collagène, ce qui s'explique par une perturbation du rapport synthèse/dégradation de la matrice extracellulaire.

#### Analyses moléculaires

Les niveaux d'expression de l'ARNm des isoformes de collagène 1 $\alpha$ 1, 1 $\alpha$ 2, 3 $\alpha$ 1, 5 $\alpha$ 2, 8 $\alpha$ 1 et de la fibronectine sont analysés. Deux mois après l'inactivation de Bcl11b, les résultats montrent une augmentation significative des isoformes de collagène 1 $\alpha$ 2, 5 $\alpha$ 2, 8 $\alpha$ 1 et de la fibronectine (respectivement, 1,41 ± 0,11 fois ; 1,31 ± 0,08 fois ; 1,58 ± 0,21 fois; et 1,43 ±

0,15 fois). 6 mois après le KO, l'expression de la fibronectine reste significativement supérieure à celle des cœurs contrôles  $(1,59 \pm 0,14 \text{ fois})$  (Figure 18-C). Des analyses immunohistologiques pour la fibronectine confirment l'augmentation de l'expression de cette protéine (Figure 19).

Les souris Bcl11b-HKO présentent une fonction contractile diminuée et une fibrose démontrée par l'augmentation de l'expression et de l'accumulation des protéines de la matrice extracellulaire (collagènes et fibronectine).



Figure 18 : L'inactivation de Bcl11b dans les cardiomyocytes modifie la fonction contractile du cœur et l'homéostasie du tissu cardiaque 2 et 6 mois après le KO.

(A) Des échocardiographies ont été réalisées 2 et 6 mois après l'inactivation de Bcl11b : Volume télésystolique (Vol. Ts.), Fraction d'éjection (FE), Fraction de raccourcissement (FR). (B) Coloration rouge Sirius montrant des régions fibrotiques dans le tissu cardiaque 6 mois après l'inactivation de Bcl11b. (C) Niveaux d'expression des ARNm des isoformes de collagène 1 $\alpha$ 1, 1 $\alpha$ 2, 3 $\alpha$ 1, 5 $\alpha$ 2, 8 $\alpha$ 1, et de la fibronectine. Les données sont présentées en moyenne ± sem. \*p<0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,001 signifie une différence significative entre les souris contrôles et Bcl11b-HKO (Test t non apparié avec correction de Welch). #: p<0,05; ##: p<0,01 signifie une différence significative entre les souris contrôles et Bcl11b-HKO (test de Mann Whitney). Echelle = 100 $\mu$ m.

	2 mois				6 mois				
	Contr	Contrôle		Bcl11b-HKO		Contrôle		Bcl11b-HKO	
	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM	
SIVd	0,06	0,001	0,06	0,002	0,07	0,001	0,07	0,001	
VGd	0,37	0,007	0,39	0,012	0,38	0,013	0,40	0,010	
PPVGd	0,05	0,003	0,06*	0,002	0,07	0,003	0,06	0,002	
SIVs	0,09	0,004	0,09	0,003	0,12	0,003	0,11	0,004	
VGs	0,21	0,004	0,26*	0,015	0,21	0,008	0,26**	0,011	
PPVGs	0,10	0,003	0,10	0,004	0,12	0,004	0,10***	0,003	
Vol Td	0,13	0,007	0,16	0,014	0,14	0,014	0,17	0,013	
Vol Ts	0,03	0,002	0,05*	0,009	0,03	0,003	0,05*	0,007	
FE	80,18	0,755	69,67**	2,754	81,40	0,534	71,33***	1,688	
FR	42,91	0,757	34,36**	2,003	44,13	0,554	35,55***	1,235	
Vol Eject.	0,11	0,007	0,11	0,006	0,11	0,011	0,12	0,007	
h/r	0,29	0,009	0,29	0,011	0,36	0,014	0,32*	0,010	
FC	588,43	10,277	575,38	9,877	602,27	8,506	582,19	7,798	

Tableau 7: Paramètres échocardiographiques mesurés 2 et 6 mois après l'inactivation de Bcl11b.

SIV : Septum intraventriculaire (cm) ; VG : ventricule gauche (cm) ; PPVG : paroi postérieure du VG (cm) ; Vol Td : Volume télédiastolique (mL) ;Vol Ts : Volume télésystolique (mL) ; FE : Fraction d'éjection (%); FR : Fraction de raccourcissement (%) ; Vol Eject. : Volume d'ejection (mL) ; h/r : épaisseur relative des parois ; FC : Fréquence cardiaque (battements/min) \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 signifie une différence significative entre les souris contrôles et Bcl11b-HKO (Test t non apparié).



#### Figure 19: Accumulation de la fibronectine dans le tissu cardiaque des souris Bcl11b-HKO (6 mois post inactivation).

Le marquage de la fibronectine en rouge montre son accumulation dans les zones fibrotiques du tissu cardiaque des souris Bcl11b-HKO. Echelle =  $20\mu m$ 

## 3. L'inactivation cardiaque de Bcl11b induit une hypertrophie des cardiomyocytes1, 2 et 5 semaines après l'inactivation.

Pour déterminer le moment au cours duquel l'homéostasie du tissu cardiaque est perturbée suite à l'inactivation de Bcl11b, nous avons analysé le phénotype des souris Bcl11b-HKO 1, 2 et 5 semaines après l'inactivation cardiaque de Bcl11b. Le poids du cœur, la taille et la surface des cardiomyocytes ainsi que l'expression de l'ARNm des gènes caractéristiques du remodelage cardiaque sont évalués chez des souris Bcl11b-HKO et contrôles. L'immunomarquage de la vinculine sur des sections congelées de tissu cardiaque nous permet de mesurer la longueur, la largeur et la surface des cardiomyocytes comme indiqué dans la Figure 20-A. L'analyse des cardiomyocytes présentant une orientation longitudinale sur les coupes montre une augmentation de la largeur des cardiomyocytes Bcl11b-HKO par rapport aux cardiomyocytes contrôles (augmentation de 18%, 8% et 25% de 1, 2 et 5 semaines post KO respectivement) sans modification au niveau de leur longueur (Figure 20-C). Cette augmentation de la largeur des cardiomyocytes affecte l'aire des cardiomyocytes et suggère la mise en place d'une hypertrophie compensatrice de nature concentrique chez les souris Bcl11b-HKO. La figure 20-D représente une fréquence de distribution des surfaces des cardiomyocytes à 1, 2 et 5 semaines, et montre un décalage de la courbe vers les surfaces plus grandes chez les souris Bcl11b-HKO par rapport aux contrôles. La mesure du poids du cœur normalisé par rapport au poids de l'animal (pC/pA) confirme l'hypertrophie modérée chez les mutants (Figure 20-B).

Au niveau moléculaire, l'activation des gènes caractéristiques de l'hypertrophie  $\beta MHC$ , actine squelettique *skActin* et du marqueur de stress *ANF* est observée chez les souris Bcl11b-HKO à 1 semaine (36 ± 9 fois, 13 ± 2 fois et 45 ± 11 fois, respectivement, comparé aux contrôles) (Figure 20-E). Ces résultats suggèrent la mise en place d'un programme de remodelage cardiaque dès la première semaine après l'inactivation de Bcl11b.

Le programme hypertrophique est activé à partir d'une semaine après l'inactivation de *Bcl11b*.



Figure 20: L'inactivation de Bcl11b induit un remodelage cardiaque et une hypertrophie concentrique.

(A) Evaluation de la taille des cardiomyocytes suite au marquage vinculine (vert). Les lignes blanches présentent des exemples de mesure de longueurs et de largeurs. (B) Rapport Poids du cœur/Poids de

l'animal. (C) Quantification de la taille des cardiomyocytes suite au marquage vinculine avec le programme ImageJ (Longueur, largeur, surface). (D) Distributions des fréquences des surfaces des cardiomyocytes. (E) Niveaux d'expression des ARNm des gènes caractéristiques du remodelage 1, 2 et 5 semaines après le KO : expression de l'ARNm de l'actine squelettique (*skActin*), la chaine lourde de la myosine  $\beta$  ( $\beta$ MHC), le facteur atrial natriurétique (*ANF*). Les données sont présentées en moyenne ± sem. \*p<0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001 signifie une différence significative entre les souris contrôles et Bcl11b-HKO (test t non apparié avec correction de Welch). #: p<0.05; ##: p<0.01 signifie une différence significative entre les souris contrôles et Bcl11b-HKO (test de Mann Whitney).Echelle = 20µm.

#### 4. L'inactivation cardiaque de Bcl11b favorise le développement de la fibrose.

Nous avons complété les analyses décrites dans la figure 20 par des analyses histologiques et moléculaires 1, 2 et 5 semaines post-inactivation. Plus spécifiquement, nous avons effectué une coloration histologique Rouge Sirius sur des coupes de tissus cardiaques ainsi qu'une analyse par qPCR de l'expression des gènes profibrotiques. Les cœurs des souris Bcl11b-HKO présentent des zones fibrotiques importantes 2 et 5 semaines après l'inactivation de Bcl11b (2 semaines après le KO:  $22 \pm 1\%$  versus  $16 \pm 1\%$  chez les contrôles ; 5 semaines après le KO:  $27 \pm 1\%$  versus  $15 \pm 2\%$  chez les contrôles) (Figure 21). A noter qu'une semaine après l'inactivation, la coloration rouge Sirius a permis de mettre en évidence des zones «claires» (Figure 21, têtes de flèches) dans le tissu cardiaque. Ces régions ne contiennent pas de cardiomyocytes. Des analyses complémentaires ont été effectuées par la suite pour caractériser ces zones « claires » (voir Figure 24).

Au niveau moléculaire, l'analyse par RT-qPCR de l'expression des isoformes de collagène (1 $\alpha$ 1, 1 $\alpha$ 2, 3 $\alpha$ 1, 5 $\alpha$ 2, 8 $\alpha$ 1) et de la fibronectine montre que leur expression est fortement augmentée à 1 semaine chez les souris Bcl11b-HKO (34 ± 12 fois, 34 ± 13 fois, 41 ± 14 fois, 40 ± 15 fois, 23 ± 6 fois et 12 ± 3 fois, respectivement, par rapport aux contrôles) et se stabilise à partir de 2 semaines (Figure 22).



Figure 21: Formation de la fibrose pendant le remodelage cardiaque.

Les régions fibrotiques dans les cœurs des souris Bcl11b-HKO sont colorées en rouge (coloration Rouge Sirius) 2 et 5 semaines après l'inactivation de Bcl11b. Les flèches présentent des régions « claires » dépourvues de cardiomyocytes, 1 semaine après l'inactivation de Bcl11b. Le % de dépôt de collagène est quantifié grâce au logiciel ImageJ. Les données sont présentées en valeurs moyennes  $\pm$  sem. \*p<0,05, \*\*: p<0,01 signifie une différence significative entre les souris contrôles et Bcl11b-HKO (test t non apparié avec correction de Welch). Echelle = 100µm.



Figure 22: Niveau d'expression relatif de l'ARNm des isoformes de collagènes 1α1, 1α2, 3α1, 5α2, 8α1, et de la fibronectine.

Expression relative de l'ARNm des isoformes de collagène (1 $\alpha$ 1, 1 $\alpha$ 2, 3 $\alpha$ 1, 5 $\alpha$ 2, 8 $\alpha$ 1) et de la fibronectine par RT-qPCR à 1, 2 et 5 semaines après l'inactivation de Bcl11b. Les données sont présentées en valeurs moyennes ± sem. \*p<0,05 signifie une différence significative entre les souris contrôles et Bcl11b-HKO (test t non apparié avec correction de Welch). #: p<0,05; ##: p<0,01; ###: p<0,001 signifie une différence significative entre les souris contrôles et Bcl11b-HKO (test de Mann Whitney).

Nous avons complété ces études par l'analyse des facteurs potentiellement impliqués dans la mise en place de la fibrose et plus spécifiquement la voie de signalisation TGF $\beta$ /SMAD2 aussi bien au niveau protéique qu'au niveau des ARNm. L'analyse d'extraits protéiques par Western Blot utilisant des anticorps phospho-SMAD2 et SMAD2 (Figure 23-A) montre une phosphorylation accrue de SMAD2, effecteur de la voie fibrotique TGF $\beta$ /SMAD2 (Figure 23-B), (71 ± 41% comparé à 23 ± 10% chez les contrôles). Une expression augmentée des ARNm de *TGF\beta1*, de *SMAD2* et de la vimentine est aussi observée (4 ± 1 fois, 2 ± 0.1 fois et 9 ± 2 fois, respectivement, comparé aux contrôles) (Figure 23-C). L'ensemble de ces observations indique l'activation de la voie pro-fibrotique une semaine après l'inactivation de Bcl11b.



### Figure 23: Activation de la voie fibrotique TGFβ/SMAD2 chez les souris Bcl11b-HKO 1 semaine après inactivation.

(A) Western Blot des protéines SMAD2 et Phospho-SMAD2. (B) Quantification du rapport phospho-SMAD2/SMAD2. (C) Niveau d'expression des ARNm de *TGF* $\beta$ , *SMAD2* et *Vimentine*. Les données sont présentées en valeurs moyennes ± sem. \*p<0,05 signifie une différence significative entre les souris contrôles et Bcl11b-HKO (test t non apparié avec correction de Welch). ). #: p<0,05; ##: p<0,01 signifie une différence significative entre les souris contrôles et Bcl11b-HKO (test de Mann Whitney).

Les souris Bcl11b-HKO présentent une activation du programme fibrotique à partir d'une semaine post inactivation. Les zones fibrotiques sont observées à partir de deux semaines post inactivation.

## 5. L'inactivation cardiaque de Bcl11b provoque une mort cellulaire et une réponse inflammatoire 1 semaine après inactivation.

Afin de mieux caractériser les zones «claires» (figure 21) une semaine après l'inactivation de Bcl11b, nous avons effectué des analyses morphologiques et moléculaires. La coloration de coupes à l'hématoxyline/éosine met en évidence l'infiltration de cellules dans le tissu cardiaque Bcl11b-HKO (Figure 24-A & B). Ces cellules ont été identifiées comme étant des macrophages en utilisant un anticorps F4/80. Cet anticorps permet de détecter une protéine membranaire spécifique des macrophages (Figure 24-C). Les fibroblastes font également partie des cellules présentes dans ces zones, comme l'indique le marquage vimentine (Figure 25). D'autre part, des cardiomyocytes apoptotiques sont observés dans les zones de lésions du tissu cardiaque des souris Bcl11b-HKO, caractérisées par un marquage positif pour la Caspase 3-clivée (Figure 24-D), forme activée de la Caspase effectrice de la voie apoptotique.

Au niveau moléculaire, les niveaux d'expression de l'ARNm de MCP1 (protéine chimio-attractante de monocytes) et des interleukines IL1 $\beta$  et IL10 ont été analysés (Figure 26). Une augmentation du niveau d'expression de MCP1 est observée chez les souris Bcl11b-HKO (2,5 ± 0,4 fois par rapport aux contrôles). Les niveaux d'expression des ARNm d'interleukines IL1 $\beta$  et IL10 augmentent aussi (4,2 ± 1,4 fois et 16 ± 5 fois respectivement), reflétant une réponse inflammatoire (IL1 $\beta$ ) et réparatrice (IL10) chez les souris Bcl11b-HKO. Enfin, une augmentation de l'expression de l'ARNm des facteurs pro-apoptotiques p53, Bax (protéine X associée à Bcl-2) et Apaf1 (facteur d'activation de la protéase apoptotique) a été est observée (3 ± 0,8 fois, 3,6 ± 0,8 fois et 2,1 ± 0,5 fois respectivement).

Une mort cellulaire et une réponse inflammatoire sont observées dans les cardiomyocytes une semaine après l'inactivation de Bcl11b.




(A) Coupes transversales de cœurs entiers, colorées à l'Hématoxyline/ Eosine. Echelle =  $200\mu m$ . (B) Grossissement de la coloration Hématoxyline/Eosine. Echelle =  $50\mu m$ . (C) Identification des macrophages par un marquage F4/80 (vert). En rouge : Fibronectine. En bleu : DAPI ; Echelle =  $16\mu m$ . (D) Marquage Caspase-3 clivée (en rouge) indiquant des cardiomyocytes apoptotiques ; en vert : Vinculine ; en bleu : DAPI ; échelle =  $24\mu m$ .



## Figure 25: Identification des fibrolastes par un marquage vimentine dans le tissu cardiaque des souris Bcl11b-HKO.

Le marquage vimentine (en vert) montre le recrutement et l'accumulation des fibroblastes dans les zones « claires » présentes dans le tissu cardiaque des souris Bcl11b-HKO. Echelle =  $22\mu m$ .



## Figure 26: Expression de l'ARNm des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et la mort cellulaire.

Réponse inflammatoire et réparatrice : expression de l'ARNm de MCP1, IL1 $\beta$  et IL10 ; expression des gènes caractéristiques de l'apoptose : expression de l'ARNm de p53, Bax et Apaf1. Les données sont présentées en valeurs moyennes ± sem. \*p<0,05, \*\*p<0,01 signifie une différence significative entre les souris contrôles et Bcl11b-HKO (test t non apparié avec correction de Welch). ). #: p<0,05; ##: p<0,01 signifie une différence significative entre les souris contrôles et Bcl11b-HKO (test de Mann Whitney).

## 6. Les cardiomyocytes Bcl11b-KO présentent une cyto-toxicité à l'état basal et sont plus sensibles au traitement par la doxorubicine.

Suite à l'observation de la mort cellulaire dans le tissu cardiaque des souris Bcl11b-HKO, nous avons voulu confirmer ce phénomène par une approche in vitro en culture cellulaire. Des cardiomyocytes de souris nouveau-nées Bcl11b<sup>flox/flox</sup> ont été isolés et mis en culture. Trois jours après l'inactivation de Bcl11b (infection par Adénovirus exprimant la Cre recombinase), une partie des cardiomyocytes a été traitée par la doxorubicine (molécule connue pour sa cardio-toxicité). Afin d'évaluer la cyto-toxicité de la doxorubicine, nous avons mesuré l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le surnageant de culture. En effet, la LDH, qui est une enzyme cytosolique, est libérée dans le milieu extracellulaire suite à l'endommagement et la détérioration de la membrane cellulaire. Le dosage de la LDH dans le milieu de culture, suite à l'inactivation de Bcl11b et au traitement à la doxorubicine, est un indicateur de fragilité membranaire des cardiomyocytes et de leur mort. A l'état basal, nous pouvons observer que les cardiomyocytes Bcl11b-KO présentent un taux de cyto-toxicité de  $4,5 \pm 0,8\%$  comparé à un taux nul chez les contrôles (Figure 27). Suite à un traitement de 7h par de la doxorubicine à 5µM et 10µM, les cardiomyocytes Bcl11b-KO présentent un taux de cyto-toxicité de  $10.2 \pm 1.7\%$  et  $16.2 \pm 0.6\%$  respectivement, comparé à  $1.04 \pm 0.63\%$  et  $3.4 \pm 1.04$ 0.7% chez les contrôles.

La mort cellulaire est aussi observée in vitro dans des cultures primaires de cardiomyocytes Bcl11b-KO. Les cardiomyocytes Bcl11b-KO sont plus sensible au traitement par de la doxorubicine.



### Figure 27 : Quantification de la cyto-toxicité des cultures primaires de cardiomyocytes à l'état basal et suite au traitement à la doxorubicine.

Le pourcentage de cyto-toxicité a été calculé suite au dosage de l'activité de la LDH dans le surnageant des cultures primaires de cardiomyocytes (cf. matériel et méthode). Les données sont présentées en valeurs moyennes  $\pm$  sem. Le test ANOVA à deux facteurs a montré un effet significatif du traitement à la doxorubicine (F = 41,89 ; p < 0,0001), un effet significatif du génotype des cardiomyocytes (F = 163,1 ; p < 0,0001) et une interaction entre le génotype des cardiomyocytes et le traitement à la doxorubicine (F = 13,02 ; p = 0,0006). \*p<0,05, \*\*\*\*p<0,0001 signifie une différence significative (Test de Tukey).

#### 7. Conclusion

L'inactivation de Bcl11b chez les souris adultes modifie l'homéostasie des cardiomyocytes à un temps précoce (7 jours après l'injection de tamoxifène) en induisant la mort cellulaire. Celle-ci provoque l'activation des mécanismes de réparation : inflammation, fibrose, remodelage cardiaque, suivie par une diminution de la fonction contractile deux mois après injection de tamoxifène.

L'absence de Bcl11b dans les cardiomyocytes primaires en culture les rend plus sensibles au traitement à la doxorubicine, molécule cardio-toxique.

#### B. Rôle de Bcl11b dans la régulation du rythme circadien.

### 1. Dérégulation de l'expression des gènes du rythme circadien chez les souris Bcl11b-HKO.

Bien qu'il soit clair que l'absence de Bcl11b ait entraîné la mort cellulaire, la raison de cette perturbation ne l'est toujours pas. Pour avoir une idée plus générale des gènes potentiels ciblés par Bcl11b, une analyse du transcriptome cardiaque a été effectuée à 3 jours (cœurs Bcl11b-HKO ne présentent pas de lésions au niveau histologique), 7 jours (lésions et inflammation au niveau des cœurs Bcl11b-HKO) et 14 jours (fibrose) après l'inactivation de Bcl11b. Les résultats montrent que la plus grande altération de l'expression des gènes se produit trois jours après l'inactivation de Bcl11b (Figure 28-A). Grace à l'outil DAVID (Database for <u>Annotation, V</u>isualization and <u>Integrated D</u>iscovery) (Figure 28 -B), j'ai classé les gènes selon leur implication dans différents mécanismes cellulaires. Un aperçu des résultats est présenté dans le tableau 8.

Tableau 8 : Classement de 3000 gènes en catégories selon leur fonctions.(top 1500 dont l'expression est augmentée, top 1500 dont l'expression est diminuée).

Catégorie	Nombre de gènes	Score d'enrichissement	p-Value
Mitochondrie	218	6,89	$2,9x10^{-12}$
Protéasome	25	5,68	$4,9x10^{-6}$
Métabolisme	61	3,54	$7x10^{-4}$
Cardiomyopathie	22	2,45	$3,9x10^{-4}$
Jonction cellulaire	67	2,21	$7,5x10^{-3}$
Rythme circadien	37	1,88	$9,7x10^{-3}$

Deux des facteurs clés de la régulation du rythme circadien, *Bmal1 (ARNTL)* et *CHRONO (CIART)*, font partie des 10 gènes dont l'expression est la plus augmentée (*Bmal1*) (Tableau 9) ou diminuée (*CHRONO*) (Tableau 10) par rapport aux contrôles. Des analyses de RT-qPCR ont permis de confirmer ces variations : une augmentation d'un facteur 4 pour *Bmal1* et une diminution d'un facteur 0,7 pour *CHRONO*, comparés aux contrôles (Figure 29). L'expression des régulateurs du rythme circadien a été aussi étudiée dans des cultures primaires de cardiomyocytes dépourvus de Bcl11b. L'augmentation de l'expression de *Bmal1* ainsi que la diminution de l'expression de *CLOCK*, *Cry1* et *Per2* ont été observées (Figure 30). Ces résultats semblent indiquer que Bcl11b jouerait un rôle clé dans le contrôle de l'expression de gènes du rythme circadien.



### Figure 28: Analyse transcriptomique cardiaque des souris Bcl11b-HKO 3, 7 et 14 jours après l'inactivation (Affymetrix).

(A) Diagramme de Venn présentant la distribution du nombre de gènes dont l'expression a été altéré (p<0.05) à 3, 7 et 14 jours après l'inactivation de Bcl11b. (B) Classement DAVID des gènes altérés 3 jours après l'inactivation de Bcl11b.

Tableau 9: Les 10 premiers gènes dont l'expression est augmentée 3 jours après l'inactivation de Bcl11b.

(p<0,05)

Gène	Description	Niveau d'expression KO vs Contrôle
CCL2 (MCP1)	chemokine (C-C motif) ligand 12	1,56302
ENKUR	enkurin, TRPC channel interacting protein	1,53289
TIMP1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	1,45656
NR4A2	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	1,45095
TMEM56	transmembrane protein 56	1,44375
Cd24a	CD24a antigen	1,43991
GCNT1	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2	1,39763
NDNF	neuron-derived neurotrophic factor	1,36942
ARNTL (Bmal1)	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator- like	1,36287
THBS1	thrombospondin 1	1,35407

Tableau 10: Les 10 premiers gènes dont l'expression est diminuée 3 jours après l'inactivation de Bcl11b.

(p<0,05)

Gène	Description	Niveau d'expression KO vs Contrôle
CIART (Chrono)	circadian associated repressor of transcription	-1,41938
FGF13	fibroblast growth factor 13	-1,34214
MME	membrane metallo endopeptidase	-1,32276
C10orf90	DNA segment, Chr 7, ERATO Doi 443, expressed	-1,30905
ASB15	ankyrin repeat and SOCS box-containing 15	-1,29786
ASB5	ankyrin repeat and SOCs box-containing 5	-1,29014
DMD	dystrophin, muscular dystrophy	-1,28298
KCNV2	potassium channel, subfamily V, member 2	-1,2807
Gm10408	predicted gene 3636	-1,27314
PFKFB1	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6- biphosphatase 1	-1,27311



Figure 29 : Vérification par qPCR de la variation observé dans les microarray de l'expression des gènes du rythme circadien *Bmal1* et *Chrono*.

Confirmation de la variation du niveau d'expression relatif d'ARNm des gènes *Bmal1* et *CHRONO* par RT-qPCR, 3 jours après l'inactivation de Bcl11b. Les données sont présentées en valeurs moyennes  $\pm$  sem. \*p<0,05 signifie une différence significative entre les souris contrôles et Bcl11b-HKO (test t non apparié avec correction de Welch).



Figure 30 : Expression de l'ARNm des gènes du rythme circadien chez des cardiomyocytes en culture primaire.

Evaluation du niveau d'expression relatif de l'ARNm des gènes du rythme circadien (*Bmal1, CLOCK, CHRONO, Cry1 et Per2*) en culture primaire de cardiomyocytes. Les données sont présentées en valeurs moyennes  $\pm$  sem. \*p<0,05, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001 signifie une différence significative entre les souris contrôles et Bcl11b-HKO (test t non apparié avec correction de Welch).

L'expression des gènes impliqués dans la régulation du rythme circadien est modifiée 3 jours après l'inactivation de Bcl11b. Elle se stabilise à partir de 7 jours.

### 2. Décalage de l'expression cyclique des gènes du rythme circadien chez les souris Bcl11b-HKO : suivi sur 24h.

Pour suivre l'évolution de l'expression des gènes du rythme circadien sur 24h, des souris contrôles et Bcl11b-HKO ont été sacrifiées toutes les 3h, 2 jours et demie après la première injection de tamoxifène. L'expression des gènes *Bmal1, Clock, Chrono, Cry1, Cry2, Per1, Per2* et *Per3* a été ensuite étudiée aux temps indiqués, avec T = 18h considéré comme temps de référence avec un niveau d'expression normalisé à 1 (Figure 31). Le groupe contrôle présente une expression cyclique de *Bmal1, Chrono, Cry1, Cry2, Per1, Per2* et *Per3*. Par exemple, le niveau d'expression de Bmal1 augmente de  $1 \pm 0,2$  fois jusqu'à  $16,4 \pm 0,8$  fois à 9h pour redescendre à  $1,8 \pm 0,4$  fois à 15h. D'autre part, le niveau d'expression de Chrono diminue de  $1 \pm 0,06$  fois jusqu'à  $0,21 \pm 0,02$  fois à 6h pour remonter à  $1,41 \pm 0,31$  fois à 15h. Des différences au niveau de l'expression de certains gènes ont été observées chez les souris Bcl11b-HKO à minuit, 3h, 6h et 9h (Figure 32) : A minuit (0h) : une diminution de 38,7% de *Chrono.* A 3h : une diminution de 21,5% de *Cry1.* A 6h : une augmentation de 23,8% pour *Bmal1,* de 59% pour *Cry2* et 93,7% pour *Per2.* A 9h : une diminution de 58,3% de *Chrono.* 

#### 3. Conclusion

L'inactivation de Bcl11b dans les cardiomyocytes a perturbé l'expression des gènes du rythme circadien, et surtout dans la période pré-sommeil.



### Figure 31 : Expression des gènes du rythme circadien pendant 24h chez les souris contrôles et Bcl11b-HKO.

Suivi sur 24h du niveau d'expression relatif des gènes du rythme circadien chez les souris contrôles et Bcl11b-HKO. Les données sont présentées en valeurs moyennes  $\pm$  sem, comparées aux contrôles du premier temps de sacrifice (T=18h est le temps de référence avec un niveau d'expression normalisé à 1). \*p<0.05 signifie une différence significative entre les souris contrôles et Bcl11b-HKO (test t non apparié multiple avec correction de Holm-Sidak).



Figure 32 : Expression des gènes du rythme circadien à minuit, 3h, 6h et 9h.

Présentation du niveau d'expression relatif des gènes du rythme circadien (*Bmal1, CHRONO*, *CLOCK, Cry1, Cry2, Per1, Per2* et *Per3*) chez les souris contrôles et Bcl11b-HKO à minuit, 3h, 6h et 9h (données sélectionnées de la figure 31). Les données sont présentées en valeurs moyennes  $\pm$  sem, comparées aux contrôles. \*p<0,05 et \*\*p<0,01 signifie une différence significative entre les souris contrôles et Bcl11b-HKO (test t non apparié multiple avec correction de Holm-Sidak).

# C. Etude de la réponse des souris Bcl11b-HKO à un stress hypertrophique.

#### 1. Détermination des gènes cibles de la protéine Bcl11b *in vivo*.

Dans l'étude faite par Cherrier et ses collaborateurs en 2013, il a été démontré que Bcl11b se lie à la région d'initiation de transcription (TSS) du gène de la  $\beta$ MHC (Thomas Cherrier et al. 2013). Cette étude a été faite dans des cellules d'origine rénale embryonnaire. Notre but est d'étudier la fixation de Bcl11b au niveau de la région TSS de différents gènes dont l'expression est induite ou inhibée au cours de l'hypertrophie pathologique et ceci par la technique d'immunoprécipitation de Chromatine (ChIP). Les cœurs de souris wild type non traités d'une part, et hypertrophiés par traitement avec de la phényléphrine (15 jours, minipompes osmotiques à 3,33µg/g/jour) d'autre part sont utilisés. L'analyse de l'expression des gènes impliqués dans le remodelage cardiaque par RT-qPCR montre une augmentation de l'expression des gènes marqueurs de l'hypertrophie par rapport aux souris contrôles : 3,6 ± 0,2 fois pour l'ANF ; 1,2 ± 0,1 fois pour BNP ; 2,6 ± 0,4 fois pour la  $\beta$ MHC et 2,2 ± 0,1 fois pour l'actine squelettique (Figure 33). D'autre part, l'expression de l'actine cardiaque est diminuée de moitié. L'expression de l'isoforme alpha de la chaîne lourde de la myosine ( $\alpha$ MHC) n'est pas modifiée.

L'immunoprécipitation de chromatine est réalisée avec un anticorps anti-Bcl11b, suivie de qPCR afin de détecter les séquences d'ADN immunoprécipités. Pour cela, des couples d'amorces ont été conçus par bioinformatique et testés au préalable par qPCR sur des ADN de souris à différentes concentrations (Tableau 6). La température de fusion Tm a été analysée pour chaque couple d'amorces. Afin que le couple d'amorce soit adéquat pour une qPCR, un pic de fusion unique reflétant l'amplification d'un seul fragment d'ADN doit apparaître. Les amorces qui présentent des pics multiples reflétant l'amplification de plusieurs fragments d'ADN non-spécifiques ont été remplacées par d'autres couples d'amorces (Figure 34).

L'analyse des résultats des qPCR réalisée sur la chromatine immunoprécipitée par Bcl11b des cœurs de souris contrôles et hypertrophiés a permis de calculer le rapport entre l'enrichissement de la région proximale au promoteur (TSS) et l'enrichissement de la région distale (Figure 35). En comparant les échantillons contrôles aux échantillons traités par la phényléphrine (PE), on observe une augmentation significative de l'enrichissement de la région proximale en Bcl11b pour les gènes de la  $\beta$ MHC, l'actine squelettique (*skActin*) et l'actine cardiaque (*cActin*).

Bcl11b peut se fixer sur la région proximale du promoteur des gènes  $\beta$ MHC, skActin et cActin.



Figure 33 : Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR suite à l'hypertrophie induite par la Phénylephrine.

L'expression des gènes humoraux (*ANF*, *BNP*) et contractiles (*BMHC*, *aMHC*, *skActin*, *cActin*) est analysée par RT-qPCR. PE : traité par Phényléphrine. Les données sont présentées en valeurs moyennes  $\pm$  sem. \*: p<0,05 ; \*\* : p<0,01 signifie une différence significative entre les souris contrôles et Bcl11b-HKO (test t non apparié avec correction de Welch).





Le couple d'amorces distal au site d'initiation de transcription (TSS) du gène ANF présente un pic de fusion unique. Ce couple d'amorces est conservé pour les qPCR. Le couple d'amorces proximal au site d'initiation de transcription (TSS) du gène ANF présente des pics de fusion multiples. Ce couple d'amorces ne sera pas utilisé pour les qPCR et sera remplacé.



Figure 35: Niveau d'enrichissement de Bcl11b de la région proximale au promoteur par rapport à la région distale des gènes *ANF*,  $\beta$ *MHC*, l'actine squelettique (skActin) et l'actine cardiaque (cActin).

PE : Traités par la phényléphrine. Les données sont présentées en valeurs moyennes  $\pm$  sem.\* : p<0,05 signifie une différence significative entre les souris contrôles et Bcl11b-HKO (test t non apparié).

## 2. Les souris Bcl11b-HKO répondent au stress hypertrophique induit par un traitement par de l'Angiotensine II.

Afin d'étudier la réponse des souris Bcl11b-HKO à un stress hypertrophique, des souris contrôles et Bcl11b-HKO ont été traitées par des mini-pompes osmotiques contenant l'agent hypertrophique Angiotensine II (AngII) pendant 15 jours (3µg/g/jour). L'Angiotensine Il entraînera une vasoconstriction et une augmentation de la pression artérielle, obligeant le cœur à subir un remodelage hypertrophique. Des analyses fonctionnelles, morphologiques et moléculaires ont été effectuées ensuite. Au niveau fonctionnel (Figure 36-A), les souris traitées, contrôles et Bcl11b-HKO, présentent une diminution de la fonction contractile, objectivée par une diminution de la fraction d'éjection (FE) et de raccourcissement (FR) (Pour la FE ; contrôles :  $50,02 \pm 6,9\%$  comparé à  $82,7 \pm 0,4\%$  avant AngII ; Bcl11b-HKO :  $52,3 \pm 5,4\%$  comparé à  $82,5 \pm 0,8\%$  avant AngII. Pour la FR ; contrôles :  $22,2 \pm 3,6\%$ comparé à  $45,3 \pm 0,4\%$  avant AngII ; Bcl11b-HKO :  $23 \pm 3\%$  comparé à  $45,2 \pm 0,8\%$  avant AngII). Aucune différence n'a été observée entre les groupes contrôles et Bcl11b-HKO traités. Au niveau morphologique, des régions fibrotiques ont été détectées dans le tissu cardiaque des souris traitées, contrôles et Bcl11b-HKO (Figure 36-B). Les quantifications de la taille des cardiomyocytes suite à un marquage par la vinculine ne montrent aucune variation significative entre les groupes de souris traitées (Figure 36-C). Au niveau moléculaire (Figure 37), l'activation des gènes caractéristiques de l'hypertrophie  $\beta MHC$  et actine squelettique skActin, et des marqueurs de stress ANF et BNP a été observée suite au traitement ( $\beta MHC$ ; Contrôles-AngII: 14 ± 1,6 fois, Bcl11b-HKO: 37,2 ± 11,5 fois. *skActin*; Contrôles-AngII :  $9,5 \pm 0,2$  fois, Bcl11b-HKO :  $14,8 \pm 2,8$  fois. ANF ; Contrôles-AngII : 15,2 $\pm$  3,2 fois, Bcl11b-HKO : 56,3  $\pm$  22 fois. BNP : Contrôles-AngII : 2,15  $\pm$  0,35 fois, Bcl11b-HKO :  $6,3 \pm 1,5$  fois).



#### Figure 36: Effet du traitement Angiotensine II sur les cœurs de souris Bcl11b-HKO.

(A) Des échocardiographies ont été réalisées avant et après le traitement à l'Angiotensine II : Fraction d'éjection (FE), Fraction de raccourcissement (FR). (B) Coloration Rouge Sirius montrant des régions fibrotiques dans le tissu cardiaque des souris contrôles et Bcl11b-HKO suite au traitement à l'AngII. (C) Quantification de la taille des cardiomyocytes suite au marquage vinculine (Longueur, largeur, surface longitudinale, distributions des fréquences des surfaces des cardiomyocytes). Les données sont présentées en valeurs moyennes  $\pm$  sem. Le test ANOVA à deux facteurs a montré un effet significatif du traitement à l'Angiotensine II : FE (F = 52,67 ; p<0,0001), FR (F = 89,29 ; p<0,0001).



Figure 37 : Niveaux d'expression des ARNm des gènes caractéristiques du remodelage chez les souris contrôles et Bcl11b-HKO suite au traitement par de l'Angiotensine II.

Expression de l'ARNm de la chaine lourde de la myosine  $\beta$  ( $\beta$ MHC), l'actine squelettique (skActin), le facteur atrial natriurétique (ANF), le peptide cérébral natriurétique (BNP). Les données sont présentées en valeurs moyennes  $\pm$  sem, et sont comparées aux contrôles sans traitement. Le test ANOVA à deux facteurs a montré un effet significatif du traitement à l'Angiotensine II pour les gènes  $\beta$ MHC (F = 18,71 : p = 0,0008), skActin (F = 66,25 ; p < 0,0001), ANF (F = 10,64 ; p = 0,0062) et BNP (F = 16,33 ; p = 0,0014). Le test two-way ANOVA a montré un effet significatif du génotype pour les gènes  $\beta$ MHC (F = 5,140 ; p = 0,0411), skActin (F = 4,986 ; p = 0,0438) et BNP (F = 10,12 ; p = 0,0072). Seul BNP montre une interaction entre le génotype des souris et le traitement à l'Angiotensine II (F = 6,119 ; p = 0,0279). \*\*: p<0,01 signifie une différence significative (Test de Tukey).

#### 3. Conclusion

Bcl11b participe à la régulation de l'expression de gènes impliqués dans l'hypertrophie cardiaque induite par un traitement par un agent hypertrophique (Phényléphrine, Angiotensine II). Malgré le manque d'interaction généré par le test ANOVA à deux facteurs pour la majorité des paramètres analysés, le fait que l'interaction existe entre le traitement à l'AngII et le génotype des souris pour l'expression du gène BNP prouve que l'inactivation de Bcl11b aurait un effet sur la réponse des cœurs à un stimulus hypertrophique. L'absence d'interaction au niveau des autres paramètres peut être expliquée par la variabilité observée entre les échantillons.

### V. Discussion

L'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier le rôle du facteur de transcription Bcl11b dans l'homéostasie et le remodelage cardiaque chez la souris adulte. Pour cela, nous avons généré un modèle de souris transgénique exprimant la Cre-recombinase et ayant l'exon 4 de Bcl11b floxé. Ce modèle nous a permis d'inactiver Bcl11b d'une manière inductible, spécifiquement dans les cardiomyocytes. Nous avons observé que l'inactivation de Bcl11b a déclenché une mort cellulaire, 1 semaine après l'inactivation. Les mécanismes de réparation ont été activés et ont entrainé à la formation de régions fibrotiques dans le tissu cardiaque ainsi qu'une hypertrophie des cardiomyocytes. Les souris ont surmonté cette « lésion » en continuant à vivre jusqu'à 6 mois (souris sacrifiées) après l'inactivation de Bcl11b avec une diminution de 10% de l'activité contractile du cœur. Nous pensons que Bcl11b joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité et de la stabilité des cardiomyocytes.

#### A. Bcl11b et l'induction de la mort cellulaire.

Les analyses histologiques et moléculaires nous ont fourni des donnés mettant en évidence la mort cellulaire dans le tissu cardiaque des souris Bcl11b-HKO, une semaine après l'inactivation de Bcl11b. Nous avons montré des cardiomyocytes apoptotiques grâce au marquage de la Caspase-3 clivée, ainsi qu'une augmentation de l'expression des gènes proapoptotiques p53, Bax et Apaf1. La mort des cardiomyocytes a été suivie par une inflammation et une phase de réparation aboutissant à l'installation d'une fibrose et l'activation du programme hypertrophique. Ceci a causé une diminution de la fonction contractile cardiaque au bout de 2 mois. D'autre part, l'analyse de l'activité de la LDH, libérée suite à la perméabilisation, ou à la dégradation, de la membrane cellulaire dans le surnageant de cultures primaires de cardiomyocytes, montre un pourcentage de cyto-toxicité cellulaire de 5% chez les cardiomyocytes Bcl11b-KO comparé à un taux nul chez les contrôles. Le traitement des cardiomyocytes en culture avec de la doxorubicine montre que les cardiomyocytes Bcl11b-KO sensibles au traitement. Nous avons observé une mort cellulaire suite à l'inactivation de Bcl11b in vivo et in vitro. La question qui se pose est la suivante : comment l'inactivation de Bcl11b a fragilisé les cardiomyocytes au point d'activer un programme de mort cellulaire ?

#### 1. Bcl11b et l'apoptose

Plusieurs études faites dans le cadre des lymphomes ont mis en évidence une apoptose suite à une diminution de l'expression de Bcl11b. En effet, Karanam et ses collègues ont montré l'implication de la voie apoptotique mitochondriale dans la mort cellulaire qui suit la diminution de l'expression de Bcl11b dans une lignée de cellules T malignes (Karanam et al. 2010). Egalement, l'inactivation de Bcl11b dans les cellules T perturbe l'activité de p53 en inhibant l'expression de HDM2, une ubiquitine ligase qui favorise la dégradation de p53 (Wakabayashi, Inoue, et al. 2003) (Obata, Kominami, and Mishima 2012). Une étude sur les souris adultes où Bcl11b a été sélectivement inactivée dans les kératinocytes rapporte des lésions spontanées au niveau de la peau des souris mutantes, ainsi que des réactions inflammatoires cutanées (Z. Wang et al. 2012). Ces études suggèrent une implication directe de Bcl11b dans les mécanismes de mort cellulaire.

Il est important de noter que l'apoptose n'engendre pas de réponse inflammatoire. Cependant, les voies de mort cellulaire sont interconnectées. Par exemple, la rupture de la membrane mitochondriale externe, caractéristique de la nécrose, peut activer les voies des caspases, effecteurs de l'apoptose (Kung, Konstantinidis, and Kitsis 2011). L'activation d'un programme pro-apoptotique pourra donc influencer l'activation d'un programme pronécrotique, et vice versa.

D'autre part, nos analyses transcriptomiques montrent que le gène dont l'expression a été la plus augmentée 3 jours après l'inactivation de Bcl11b code pour MCP-1 (cf. Tableau 9). MCP-1 est une chimiokine sécrétée pendant la phase pro-inflammatoire à la suite d'un infarctus du myocarde et qui recrute les monocytes de type Ly-6C<sup>high</sup>. Dans l'étude de Tang et al. 2011, l'expression de MCP-1 a été diminuée suite à la surexpression de Bcl11b dans les cellules striatales. Ces données suggèrent une possible relation entre l'expression de MCP-1 et Bcl11b.

#### 2. Bcl11b et l'effet cardio-toxique de la doxorubicine

La doxorubicine est une molécule chimio-toxique utilisée dans le traitement de divers cancers grâce à ses propriétés d'agent intercalant et sa capacité à inhiber les topo-isomérases de type II (enzymes impliquées dans le maintien de la structure de l'ADN pendant la transcription et la réplication). Cependant, ses utilisations sont limitées car elle a des effets cardio-toxiques. La cardio-toxicité liée à l'administration de la doxorubicine peut être aiguë, souvent sans traduction clinique, et se manifeste pendant les 48h qui suivent le traitement. Elle peut aussi être chronique suite à l'accumulation de doses administrées au cours de traitements longs. Un exemple de cardio-toxicité aiguë est représenté par les cardiomyopathies diagnostiquées chez des patients qui ont été traités par de la doxorubicine enfants. Le système moléculaire par lequel la doxorubicine induit une cardio-toxicité n'est pas bien défini. Une implication de la voie apoptotique médiée par les récepteurs de la mort cellulaire (TNFR et Fas) dans la cardio-toxicité induite par la doxorubicine a été montrée en utilisant des cultures d'iPS différenciés en cardiomyocytes (Zhao and Zhang 2017). Récemment, une étude a montré que la surexpression d'IGF-IIRa (Insulin Growth factor II Receptor  $\alpha$ ) dans le cœur de rats entraîne des anomalies cardiaques structurelles et fonctionnelles, aggravées par la doxorubicine (Pandey et al. 2019). Nos expériences sur des cultures primaires de cardiomyocytes ont montré que la doxorubicine aggrave la cyto-toxicité induite par l'inactivation de Bcl11b. Nous pensons que Bcl11b participe dans les mécanismes moléculaires responsables de l'induction de la cardio-toxicité suite à un traitement de doxorubicine. Il sera intéressant d'explorer le lien potentiel entre Bcl11b et IGF-IIR. La compréhension des mécanismes moléculaires qui induisent la cardio-toxicité suite au traitement par de la doxorubicine permettra d'optimiser l'utilisation de cette molécule dans les traitements anti-cancéreux.

#### 3. Lien entre Bcl11b et les disques intercalaires

Simon et ses collaborateurs ont caractérisé la desmoplakine comme cible de Bcl11b dans les neurones du gyrus denté (Simon et al. 2012). La desmoplakine est une protéine faisant partie du desmosome présent au niveau des disques intercalaires du myocarde (cf. Figure 5). Des mutations du gène codant la desmoplakine ont été caractérisées chez des patients souffrant d'une cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène (maladie durant laquelle les cardiomyocytes sont remplacées progressivement par de la graisse et du tissu fibreux) (Kline and Mohler, 2013). D'autre part, un modèle murin qui sur-exprime une forme mutée de la desmoplakine présente une apoptose des cardiomyocytes, une fibrose cardiaque et une accumulation de lipides, ainsi qu'une hypertrophie et une diminution de la fonction contractile cardiaque (Yang et al. 2006). Nos données générées suite à l'analyse transcriptomique des cœurs de souris Bcl11b-HKO montrent que la desmoplakine figure parmi les gènes dont l'expression est diminuée 3 jours après l'inactivation de Bcl11b dans les

cardiomyocytes. La mort cellulaire des cardiomyocytes chez les souris Bcl11b-HKO pourrait être en partie liée à une altération au niveau de l'expression de la desmoplakine et donc à l'intégrité des disques intercalaires. Cet aspect n'a pas été abordé dans mes travaux de thèse, mais reste une hypothèse à prendre en compte.

#### 4. Bcl11b et survie suite à un infarctus du myocarde

Des groupes de patients ayant subi un infarctus du myocarde ont une mortalité d'environ 15% dans les 5 ans (Johansson et al. 2017). Le risque de mortalité est le plus élevé pendant l'année qui suit l'infarctus (Norgaard et al. 2010). Cette période correspond au temps moyen nécessaire pour compléter la cicatrisation du myocarde *via* les mécanismes de remodelage en passant par une réponse inflammatoire (Cleutjens et al. 1999). La période de cicatrisation est donc importante et critique pour la survie des patients suite à un infarctus du myocarde.

L'inactivation de Bcl11b dans les cardiomyocytes de notre modèle murin ressemble à la réponse observée suite à un infarctus du myocarde : mort cellulaire, réponse inflammatoire, remodelage de la matrice extracellulaire (fibrose), hypertrophie et diminution de la fonction contractile cardiaque. Ce processus menant au remodelage dure environ 10 jours chez la souris (Prabhu and Frangogiannis, 2016) et correspond à la période de cicatrisation qui dure environ un an chez l'homme.

Nous pensons que Bcl11b participe à la réponse cardiaque suite à un stress comme l'infarctus du myocarde. Nous proposons que les polymorphismes caractérisés dans la région régulatrice en 3' de Bcl11b (Mitchell et al. 2012; Rimpelä et al. 2018), en modulant le niveau d'expression de Bcl11b, affectent la réponse inflammatoire, réparatrice et le remodelage suite à un infarctus du myocarde chez les patients. De plus, notre souris Bcl11b-HKO inductible peut présenter un intérêt expérimental dans le domaine des maladies cardiovasculaires. Elle pourra être utilisée comme modèle présentant les phénotypes post-infarctus sans passer par des manipulations expérimentales invasives. Ceci peut être utile dans l'étude de la réponse inflammatoire et des mécanismes de remodelage cardiaque survenus suite à un infarctus ainsi que dans les essais de molécules visant à améliorer la réponse cardiaque suite à un stress menant à une mort cellulaire.

#### B. Bcl11b, rythme circadien et mort cellulaire.

Les analyses transcriptomiques réalisées 3 jours après l'inactivation de Bcl11b montrent l'altération de l'expression de 37 gènes impliqués dans le rythme circadien (21 dont l'expression est diminuée, et 16 dont l'expression est augmentée par rapport aux contrôles). Parmi ces gènes, *Bmal1* et *Chrono*, deux facteurs clés régulant le rythme circadien, font partie des gènes dont l'expression est la plus altérées 3 jours après l'inactivation de Bcl11b. Le suivi sur 24h de l'expression des gènes du rythme circadien chez les souris Bcl11b-HKO et contrôles montre la perturbation de l'expression des gènes *Bmal1*, *Chrono*, *Cry1*, *Cry2* et *Per2*, surtout dans la période pré-sommeil (6h du matin).

Ces observations suggèrent que Bcl11b pourrait réguler différentiellement l'expression de *Bmal1* et *Chrono* dans les cardiomyocytes. En effet, il a été montré que Bcl11b peut agir comme répresseur et activateur de transcription (Le Douce et al. 2014; Ling-juan Zhang et al. 2012). Bcl11b peut aussi jouer des rôles opposés dans un même processus biologique impliquant différentes populations cellulaires, comme le développement asymétrique des incisives de souris (Kyrylkova et al. 2012). Notre étude est la première à suggérer que Bcl11b pourrait agir en tant que répresseur et activateur dans un même type cellulaire. Les modifications post traductionnelles de la protéine Bcl11b, comme la SUMOylation, pourraient jouer un rôle important dans ce processus (Ling-juan Zhang et al. 2012). D'autre part, en prenant en considération que le rythme circadien est régulé par des boucles de rétrocontrôle négatives, la dérégulation de l'expression d'un de ces acteurs suffit à déréguler tout le système.

#### 1. Bcl11b et régulation du rythme circadien

Aucune étude à ce jour n'a montré une relation entre Bcl11b et la régulation moléculaire du rythme circadien. Pourtant, Rimpelä et ses collaborateurs ont suggéré, chez l'homme, une possible implication de Bcl11b dans la régulation du rythme circadien, et cela suite à l'association qu'ils ont établi entre des SNPs dans le locus rs4905794 (3' du gène *BCL11B*) et la baisse de la pression artérielle nocturne (Rimpelä et al. 2018). D'autre part, des études montrent la participation des partenaires de Bcl11b, HDAC1 et NuRD, à la régulation de l'expression du gène du rythme circadien *Per* (Duong et al. 2011; J. Y. Kim, Kwak, and Weitz 2014). Enfin, une étude récente a montré que CDK9 (élément du complexe pTEFb

régulé par, entre autre, Bcl11b) s'associe à REV-ERB et pourrait moduler par ce biais l'expression des gènes du rythme circadien dont *Bmal1* (Ou et al. 2019).

#### 2. Rythme circadien et cardiomyopathies

Une étude faite chez des hamsters portant la mutation tau, mutation sur le gène codant la kinase Csnk1e qui phosphoryle Per (rythme circadien de 22h au lieu de 24h) (Ralph and Menaker 1988; P. L. Lowrey et al. 2000), a montré que les hamsters mutants présentent une cardiomyopathie et une fibrose cardiaque (Martino et al. 2008). Ces mutants présentent aussi des problèmes rénaux avec une observation de cellules apoptotiques au niveau des reins. Les auteurs ne décrivent pas de mort cellulaire au niveau du cœur. Seules la fibrose et l'altération de contractilité cardiaque sont décrites. Ceci n'exclut pas la possibilité de mort cellulaire au niveau cardiaque, vu que les hamsters analysés avaient déjà 17 mois au moment de l'analyse. Cette étude ainsi que les études cités dans la partie de l'introduction (I-B-4) et soulignées dans la revue publiée récemment dans Circulation (Rabinovich-Nikitin et al. 2019), mettent en évidence une relation entre la perturbation du rythme circadien, la mort cellulaire et les cardiomyopathies. En effet, plusieurs relations ont été établies entre les composants moléculaires du rythme circadien comme Bmal1, Cry et Clock, et des molécules impliquées dans les mécanismes de mort cellulaire (autophagie, apoptose et nécrose) activés dans les cardiomyopathies. Chez l'humain, des associations entre la perturbation du rythme circadien (horaires décalés de travail, changement d'heure, décalages horaires...) et un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires ont été montrées (Durgan and Young 2010; Manfredini et al. 2018; Chan et al. 2012; Arendt et al. 1997; Knutsson et al. 1986).

#### 3. Bcl11b et régulation du rythme circadien périphérique cardiaque

Notre étude suggère que Bcl11b fait partie du mécanisme moléculaire qui régule le rythme circadien périphérique au niveau des cardiomyocytes (Figure 38). Nous pensons que l'inactivation de Bcl11b dans les cardiomyocytes de souris adultes perturbe le rythme circadien périphérique cardiaque et « sensibilise » les cardiomyocytes à la mort cellulaire dans le ventricule gauche. Cette « sensibilisation » à la mort cellulaire pourrait être liée à une altération du métabolisme cardiaque en lien avec la perturbation du rythme circadien comme suggéré par Tsai et al (Tsai et al. 2010). Les dégâts ont pour conséquence une réponse inflammatoire et réparatrice, aboutissant à une fibrose, une hypertrophie et enfin une perturbation de la contractilité cardiaque à partir de 2 mois. La régulation du rythme circadien

périphérique par le rythme circadien central (NSC) pourrait être la raison de la stabilité du phénotype observée chez les souris Bcl11b-HKO. Des études sont en cours pour vérifier cette hypothèse en dérégulant le rythme circadien centrale des souris contrôles et Bcl11b-HKO.



#### Figure 38 : Bcl11b et le rythme circadien périphérique cardiaque.

(A) Bcl11b ferait partie du mécanisme régulant le rythme circadien périphérique cardiaque.
(B) L'absence de Bcl11b dérégule le rythme circadien périphérique cardiaque, sensibilisant ainsi les cardiomyocytes à la mort cellulaire. Cette altération conduit à l'activation des mécanismes d'inflammation, caractérisés par une infiltration cellulaire. Elle est suivie par un remodelage cardiaque (hypertrophie, fibrose). (C) Ce phénotype cardiaque ne s'aggrave pas et reste stable jusqu'à 6 mois après la délétion de Bcl11b. Nous pensons que le noyau suprachiasmatique (NSC) du système nerveux qui contrôle le rythme circadien central intervient rapidement pour rétablir le rythme circadien périphérique et stabiliser la fonction cardiaque.

# C. L'implication de Bcl11b dans la régulation des mécanismes d'hypertrophie cardiaque.

## 1. La régulation différentielle des gènes impliqués dans la réponse hypertrophique par Bcl11b

Suite à la mise au point d'une ChIP sur des coupes de tissu cardiaque, nous avons mis en évidence le recrutement de Bcl11b dans la zone promotrice des gènes de la  $\beta$ MHC, l'actine squelettique (*skActin*) et l'actine cardiaque (*cActin*), suite à un traitement avec l'agent hypertrophiant (la phényléphrine). Nous observons que le recrutement de Bcl11b sur la région promotrice des gènes de la  $\beta$ MHC et de l'actine squelettique s'accompagne d'une augmentation du niveau d'expression de leur ARNm respectif. La situation est inversée pour l'actine cardiaque : le recrutement de Bcl11b sur sa région promotrice est corrélé avec une diminution du niveau d'expression de son ARNm. Comment expliquer donc cette différence de réponse au niveau de l'expression des gènes régulés potentiellement par Bcl11b ?

Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées pour interpréter nos observations concernant la régulation différentielle des gènes de la  $\beta MHC$ , de l'actine squelettique et de l'actine cardiaque, malgré la fixation de Bcl11b sur le promoteur des trois gènes. Dans la littérature, Bcl11b est souvent associé à une activité inhibitrice de la transcription (Ling-juan Zhang et al. 2012; Cismasiu et al. 2005). Cette inhibition peut s'opérer de deux façons. Dans un premier cas, Bcl11b se comporte comme un facteur de transcription « classique » qui se fixe au niveau de séquences spécifiques de l'ADN dans la région régulatrice des gènes cible (Id2, (Ling-juan Zhang et al. 2012)) et inhibe la transcription en s'associant à d'autres inhibiteurs de transcription. Dans un deuxième cas, la participation de Bcl11b dans l'inhibition de l'activité d'élongation de l'ARN polymérase II a été mise en évidence (Thomas Cherrier et al. 2013). Une troisième étude concernant la recherche de modifications post-traductionnelles sur Bcl11b dans le thymus a mis en évidence une multitude de sites de phosphorylation ainsi que 2 sites de SUMOylation fonctionnels (Ling-juan Zhang et al. 2012). Cette SUMOylation aurait pour conséquence le recrutement du co-activateur de transcription p300 au niveau des gènes régulés par Bcl11b induisant ainsi leur activation (cas du gène Id2 dans le thymus).

En effet, des expériences préliminaires nous ont permis de mettre en évidence la forme SUMOylée de Bcl11b dans les cœurs de souris nouveau-nées. Cela suggère que la sumoylation de Bcl11b pourrait jouer un rôle dans la période de croissance postnatale du cœur, une croissance assurée par une hypertrophie cardiaque qualifiée de physiologique. La forme SUMOylée de Bcl11b est absente dans le cœur adulte, mais elle se met en place dans les cœurs de souris hypertrophiés suite à un traitement par de l'AngII de manière concomitante avec l'induction de l'expression de ces mêmes gènes fœtaux.

Nous pensons que dans le contexte de l'hypertrophie cardiaque pathologique, la fixation de Bcl11b sous sa forme SUMOylée sur les régions promotrices des gènes de la  $\beta MHC$  et de l'actine squelettique permettrait le recrutement du co-activateur de transcription p300. Cela induirait l'expression de ces gènes. Par contre, la fixation de la forme non-SUMOylée de Bcl11b participerait à l'inhibition de l'expression de l'actine cardiaque.

#### 2. Réponse des souris Bcl11b-HKO à un stress hypertrophique.

Suite à la caractérisation du phénotype des souris Bcl11b-HKO à l'état basal, leur réponse à un stimulus hypertrophique (traitement AngII) a été étudiée. Au niveau fonctionnel et morphologique, aucune variation n'a été observée entre les souris contrôles traitées et les souris Bcl11b-HKO traitées. Au niveau moléculaire, le test ANOVA à deux facteurs n'a pas montré d'interactions entre le traitement à l'AngII et le génotype des souris pour les gènes  $\beta$ MHC, skActin et ANF. Ceci n'est pas vrai pour l'expression du gène BNP pour lequel une interaction entre le traitement à l'AngII et le génotype des souris est validée. Cette observation prouve que l'inactivation de Bcl11b aurait un effet sur la réponse des cœurs à un stimulus hypertrophique. L'absence d'interaction au niveau des autres paramètres peut être expliquée par la variabilité observée entre les échantillons. Nous ne pouvons pas exclure que Bcl11b pourrait réguler l'expression de gènes impliqués dans le remodelage cardiaque mais ne serait pas indispensable pour une réponse à un stress hypertrophique provoqué par de l'Angiotensine II.

#### Conclusion

En conclusion, mes travaux de thèse sont les premiers à mettre en évidence le rôle que joue le facteur de transcription Bcl11b dans le maintien de l'homéostasie cardiaque et dans la régulation de la réponse hypertrophique. Nous pensons que Bcl11b participe à la régulation de l'expression des gènes clés du mécanisme moléculaire du rythme circadien périphérique cardiaque. Des expériences de ChIP-seq sur des cœurs wild type sont en cours pour vérifier la régulation de l'expression des gènes du rythme circadien par Bcl11b.

Comment Bcl11b participe à la régulation de ces gènes ? Pourquoi cette perturbation causera une mort cellulaire ? Et comment le cœur réussit à se stabiliser suite à ce stress ? Répondre à ces questions permettra d'optimiser nos connaissances en ce qui concerne les mécanismes d'adaptation entrepris par le cœur pour répondre aux changements environnementaux et au stress. Ceci permettra d'améliorer les stratégies thérapeutiques de la prise en charge des patients atteints de cardiomyopathies.

### VI. Bibliographie

- Ackers-Johnson, Matthew, Peter Yiqing Li, Andrew P. Holmes, Sian-Marie O'Brien, Davor Pavlovic, and Roger S. Foo. 2016. 'A Simplified, Langendorff-Free Method for Concomitant Isolation of Viable Cardiac Myocytes and Nonmyocytes From the Adult Mouse Heart'. *Circulation Research* 119 (8): 909–2.
- Alarcón, Claudio, Alexia-Ileana Zaromytidou, Qiaoran Xi, Sheng Gao, Jianzhong Yu, Sho Fujisawa, Afsar Barlas, et al. 2009. 'Nuclear CDKs Drive Smad Transcriptional Activation and Turnover in BMP and TGF-Beta Pathways'. *Cell* 139 (4): 757–69.
- Albu, Diana I., Dongyun Feng, Debarati Bhattacharya, Nancy A. Jenkins, Neal G. Copeland, Pentao Liu, and Dorina Avram. 2007. 'BCL11B Is Required for Positive Selection and Survival of Double-Positive Thymocytes'. *The Journal of Experimental Medicine* 204 (12): 3003–15.
- Anafi, Ron C., Yool Lee, Trey K. Sato, Anand Venkataraman, Chidambaram Ramanathan, Ibrahim H. Kavakli, Michael E. Hughes, et al. 2014. 'Machine Learning Helps Identify CHRONO as a Circadian Clock Component'. *PLoS Biology* 12 (4): e1001840.
- Anea, Ciprian B., Maoxiang Zhang, David W. Stepp, G. Bryan Simkins, Guy Reed, David J. Fulton, and R. Daniel Rudic. 2009. 'Vascular Disease in Mice with a Dysfunctional Circadian Clock'. *Circulation* 119 (11): 1510–17.
- Antoch, M. P., E. J. Song, A. M. Chang, M. H. Vitaterna, Y. Zhao, L. D. Wilsbacher, A. M. Sangoram, D. P. King, L. H. Pinto, and J. S. Takahashi. 1997. 'Functional Identification of the Mouse Circadian Clock Gene by Transgenic BAC Rescue'. *Cell* 89 (4): 655–67.
- Arendt, J., D. J. Skene, B. Middleton, S. W. Lockley, and S. Deacon. 1997. 'Efficacy of Melatonin Treatment in Jet Lag, Shift Work, and Blindness'. *Journal of Biological Rhythms* 12 (6): 604–17.
- Arlotta, Paola, Bradley J. Molyneaux, Denis Jabaudon, Yutaka Yoshida, and Jeffrey D. Macklis. 2008. 'Ctip2 Controls the Differentiation of Medium Spiny Neurons and the Establishment of the Cellular Architecture of the Striatum'. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (3): 622–32.
- Avram, D., A. Fields, K. Pretty On Top, D. J. Nevrivy, J. E. Ishmael, and M. Leid. 2000. 'Isolation of a Novel Family of C(2)H(2) Zinc Finger Proteins Implicated in Transcriptional Repression Mediated by Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor (COUP-TF) Orphan Nuclear Receptors'. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (14): 10315–22.
- Azuaje, Francisco, Lu Zhang, Céline Jeanty, Sarah-Lena Puhl, Sophie Rodius, and Daniel R. Wagner. 2013. 'Analysis of a Gene Co-Expression Network Establishes Robust Association between Col5a2 and Ischemic Heart Disease'. *BMC Medical Genomics* 6 (April): 13.

- Basta, Jeannine, and Michael Rauchman. 2015. 'The Nucleosome Remodeling and Deacetylase Complex in Development and Disease'. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 165 (1): 36–47.
- Bell-Pedersen, Deborah, Vincent M. Cassone, David J. Earnest, Susan S. Golden, Paul E. Hardin, Terry L. Thomas, and Mark J. Zoran. 2005. 'Circadian Rhythms from Multiple Oscillators: Lessons from Diverse Organisms'. *Nature Reviews. Genetics* 6 (7): 544–56.
- Bernard, O. A., M. Busson-LeConiat, P. Ballerini, M. Mauchauffé, V. Della Valle, R. Monni, F. Nguyen Khac, et al. 2001. 'A New Recurrent and Specific Cryptic Translocation, t(5;14)(Q35;Q32), Is Associated with Expression of the Hox11L2 Gene in T Acute Lymphoblastic Leukemia'. *Leukemia* 15 (10): 1495–1504.
- Biala, Agnieszka K., and Lorrie A. Kirshenbaum. 2014. 'The Interplay between Cell Death Signaling Pathways in the Heart'. *Trends in Cardiovascular Medicine* 24 (8): 325–31.
- Bialik, S., D. L. Geenen, I. E. Sasson, R. Cheng, J. W. Horner, S. M. Evans, E. M. Lord, C. J. Koch, and R. N. Kitsis. 1997. 'Myocyte Apoptosis during Acute Myocardial Infarction in the Mouse Localizes to Hypoxic Regions but Occurs Independently of P53'. *The Journal of Clinical Investigation* 100 (6): 1363–72.
- Bray, Molly S., Chad A. Shaw, Michael W. S. Moore, Rodrigo A. P. Garcia, Melissa M. Zanquetta, David J. Durgan, William J. Jeong, et al. 2008. 'Disruption of the Circadian Clock within the Cardiomyocyte Influences Myocardial Contractile Function, Metabolism, and Gene Expression'. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology 294 (2): H1036-1047.
- Brown, Steven A., Elzbieta Kowalska, and Robert Dallmann. 2012. '(Re)Inventing the Circadian Feedback Loop'. *Developmental Cell* 22 (3): 477–87.
- Cai, Rong, Jianmin Gu, Haipeng Sun, Xiaobing Liu, Wenhan Mei, Yitao Qi, Song Xue, et al. 2015. 'Induction of SENP1 in Myocardium Contributes to Abnormities of Mitochondria and Cardiomyopathy'. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 79 (February): 115–22.
- Chan, Ming-Cheng, Peter M. Spieth, Kieran Quinn, Matteo Parotto, Haibo Zhang, and Arthur S. Slutsky. 2012. 'Circadian Rhythms: From Basic Mechanisms to the Intensive Care Unit'. *Critical Care Medicine* 40 (1): 246–53.
- Cherrier, T., S. Suzanne, L. Redel, M. Calao, C. Marban, B. Samah, R. Mukerjee, et al. 2009. 'P21(WAF1) Gene Promoter Is Epigenetically Silenced by CTIP2 and SUV39H1'. *Oncogene* 28 (38): 3380–89.
- Cherrier, Thomas, Valentin Le Douce, Sebastian Eilebrecht, Raphael Riclet, Céline Marban, Franck Dequiedt, Yannick Goumon, et al. 2013. 'CTIP2 Is a Negative Regulator of P-TEFb'. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110 (31): 12655–60.
- Cismasiu, Valeriu B., Karen Adamo, Jennifer Gecewicz, Javier Duque, Qishan Lin, and Dorina Avram. 2005. 'BCL11B Functionally Associates with the NuRD Complex in T Lymphocytes to Repress Targeted Promoter'. *Oncogene* 24 (45): 6753.

- Cismasiu, Valeriu B., Sailaja Ghanta, Javier Duque, Diana I. Albu, Hong-Mei Chen, Rohini Kasturi, and Dorina Avram. 2006. 'BCL11B Participates in the Activation of IL2 Gene Expression in CD4+ T Lymphocytes'. *Blood* 108 (8): 2695–2702.
- Cleutjens, J. P., W. M. Blankesteijn, M. J. Daemen, and J. F. Smits. 1999. 'The Infarcted Myocardium: Simply Dead Tissue, or a Lively Target for Therapeutic Interventions'. *Cardiovascular Research* 44 (2): 232–41.
- Crnko, Sandra, Bastiaan C. Du Pré, Joost P. G. Sluijter, and Linda W. Van Laake. 2019. 'Circadian Rhythms and the Molecular Clock in Cardiovascular Biology and Disease'. *Nature Reviews. Cardiology* 16 (7): 437–47.
- Curtis, Anne M., Yan Cheng, Shiv Kapoor, Dermot Reilly, Tom S. Price, and Garret A. Fitzgerald. 2007. 'Circadian Variation of Blood Pressure and the Vascular Response to Asynchronous Stress'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (9): 3450–55.
- Di Santo, James P. 2010. 'Immunology. A Guardian of T Cell Fate'. *Science (New York, N.Y.)* 329 (5987): 44–45.
- Diguet, Nicolas, Samuel A. J. Trammell, Cynthia Tannous, Robin Deloux, Jérôme Piquereau, Nathalie Mougenot, Anne Gouge, et al. 2018. 'Nicotinamide Riboside Preserves Cardiac Function in a Mouse Model of Dilated Cardiomyopathy'. *Circulation* 137 (21): 2256–73.
- Dobaczewski, Marcin, Wei Chen, and Nikolaos G. Frangogiannis. 2011. 'Transforming Growth Factor (TGF)-β Signaling in Cardiac Remodeling'. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 51 (4): 600–606.
- Dreyer, W. J., L. H. Michael, T. Nguyen, C. W. Smith, D. C. Anderson, M. L. Entman, and R. D. Rossen. 1992. 'Kinetics of C5a Release in Cardiac Lymph of Dogs Experiencing Coronary Artery Ischemia-Reperfusion Injury'. *Circulation Research* 71 (6): 1518–24.
- Duong, Hao A., Maria S. Robles, Darko Knutti, and Charles J. Weitz. 2011. 'A Molecular Mechanism for Circadian Clock Negative Feedback'. *Science (New York, N.Y.)* 332 (6036): 1436–39.
- Durgan, David J., Thomas Pulinilkunnil, Carolina Villegas-Montoya, Merissa E. Garvey, Nikolaos G. Frangogiannis, Lloyd H. Michael, Chi-Wing Chow, Jason R. B. Dyck, and Martin E. Young. 2010. 'Short Communication: Ischemia/Reperfusion Tolerance Is Time-of-Day-Dependent: Mediation by the Cardiomyocyte Circadian Clock'. *Circulation Research* 106 (3): 546–50.
- Durgan, David J., Ju-Yun Tsai, Maximiliano H. Grenett, Betty M. Pat, William F. Ratcliffe, Carolina Villegas-Montoya, Merissa E. Garvey, et al. 2011. 'Evidence Suggesting That the Cardiomyocyte Circadian Clock Modulates Responsiveness of the Heart to Hypertrophic Stimuli in Mice'. *Chronobiology International* 28 (3): 187–203.
- Durgan, David J., and Martin E. Young. 2010. 'The Cardiomyocyte Circadian Clock: Emerging Roles in Health and Disease'. *Circulation Research* 106 (4): 647–58.

- Eghbali, Mansoureh, Yibin Wang, Ligia Toro, and Enrico Stefani. 2006. 'Heart Hypertrophy during Pregnancy: A Better Functioning Heart?' *Trends in Cardiovascular Medicine* 16 (8): 285–91.
- Enomoto, Takayuki, Makoto Ohmoto, Tetsuo Iwata, Ayako Uno, Masato Saitou, Tatsuya Yamaguchi, Ryo Kominami, Ichiro Matsumoto, and Junji Hirota. 2011. 'Bcl11b/Ctip2 Controls the Differentiation of Vomeronasal Sensory Neurons in Mice'. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (28): 10159– 73.
- Ertl, Georg, and Stefan Frantz. 2005. 'Healing after Myocardial Infarction'. *Cardiovascular Research* 66 (1): 22–32.
- Frangogiannis, Nikolaos G. 2015. 'Pathophysiology of Myocardial Infarction'. *Comprehensive Physiology* 5 (4): 1841–75.
- Frangogiannis, Nikolaos G., C. Wayne Smith, and Mark L. Entman. 2002. 'The Inflammatory Response in Myocardial Infarction'. *Cardiovascular Research* 53 (1): 31–47.
- Frantz, Stefan, Johann Bauersachs, and Georg Ertl. 2009. 'Post-Infarct Remodelling: Contribution of Wound Healing and Inflammation'. *Cardiovascular Research* 81 (3): 474–81.
- Frey, Norbert, Hugo A. Katus, Eric N. Olson, and Joseph A. Hill. 2004. 'Hypertrophy of the Heart: A New Therapeutic Target?' *Circulation* 109 (13): 1580–89.
- Galluzzi, Lorenzo, Ilio Vitale, Stuart A. Aaronson, John M. Abrams, Dieter Adam, Patrizia Agostinis, Emad S. Alnemri, et al. 2018. 'Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018'. Cell Death and Differentiation 25 (3): 486–541.
- Golonzhka, Olga, Mark Leid, Gitali Indra, and Arup Kumar Indra. 2007. 'Expression of COUP-TF-Interacting Protein 2 (CTIP2) in Mouse Skin during Development and in Adulthood'. *Gene Expression Patterns: GEP* 7 (7): 754–60.
- Golonzhka, Olga, Xiaobo Liang, Nadia Messaddeq, Jean-Marc Bornert, Adam L. Campbell, Daniel Metzger, Pierre Chambon, Gitali Ganguli-Indra, Mark Leid, and Arup K. Indra. 2009. 'Dual Role of COUP-TF-Interacting Protein 2 in Epidermal Homeostasis and Permeability Barrier Formation'. *The Journal of Investigative Dermatology* 129 (6): 1459–70.
- Golonzhka, Olga, Daniel Metzger, Jean-Marc Bornert, Brian K. Bay, Michael K. Gross, Chrissa Kioussi, and Mark Leid. 2009. 'Ctip2/Bcl11b Controls Ameloblast Formation during Mammalian Odontogenesis'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* of the United States of America 106 (11): 4278–83.
- Goos, Jacqueline A. C., Walter K. Vogel, Hana Mlcochova, Christopher J. Millard, Elahe Esfandiari, Wisam H. Selman, Eduardo Calpena, et al. 2019. 'A de Novo Substitution in BCL11B Leads to Loss of Interaction with Transcriptional Complexes and Craniosynostosis'. *Human Molecular Genetics*, April.

- Goriki, Akihiro, Fumiyuki Hatanaka, Jihwan Myung, Jae Kyoung Kim, Takashi Yoritaka, Shintaro Tanoue, Takaya Abe, et al. 2014. 'A Novel Protein, CHRONO, Functions as a Core Component of the Mammalian Circadian Clock'. *PLoS Biology* 12 (4): e1001839.
- Gottlieb, R. A., K. O. Burleson, R. A. Kloner, B. M. Babior, and R. L. Engler. 1994. 'Reperfusion Injury Induces Apoptosis in Rabbit Cardiomyocytes'. *The Journal of Clinical Investigation* 94 (4): 1621–28.
- Gottlieb, Roberta A. 2011. 'Cell Death Pathways in Acute Ischemia/Reperfusion Injury'. Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics 16 (3–4): 233–38.
- Grabarczyk, P., G. K. Przybylski, M. Depke, U. Völker, J. Bahr, K. Assmus, B. M. Bröker, R. Walther, and C. A. Schmidt. 2007. 'Inhibition of BCL11B Expression Leads to Apoptosis of Malignant but Not Normal Mature T Cells'. *Oncogene* 26 (26): 3797–3810.
- Grabarczyk, Piotr, Passorn Winkler, Martin Delin, Praveen K. Sappa, Sander Bekeschus, Petra Hildebrandt, Grzegorz K. Przybylski, Uwe Völker, Elke Hammer, and Christian A. Schmidt. 2018. 'The N-Terminal CCHC Zinc Finger Motif Mediates Homodimerization of Transcription Factor BCL11B'. *Molecular and Cellular Biology* 38 (5).
- Griffin, E. A., D. Staknis, and C. J. Weitz. 1999. 'Light-Independent Role of CRY1 and CRY2 in the Mammalian Circadian Clock'. *Science (New York, N.Y.)* 286 (5440): 768–71.
- Gutierrez, Alejandro, Alex Kentsis, Takaomi Sanda, Linda Holmfeldt, Shann-Ching Chen, Jianhua Zhang, Alexei Protopopov, et al. 2011. 'The BCL11B Tumor Suppressor Is Mutated across the Major Molecular Subtypes of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia'. *Blood* 118 (15): 4169–73.
- Harvey, Pamela A., and Leslie A. Leinwand. 2011. 'The Cell Biology of Disease: Cellular Mechanisms of Cardiomyopathy'. *The Journal of Cell Biology* 194 (3): 355–65.
- Hensley, K., K. A. Robinson, S. P. Gabbita, S. Salsman, and R. A. Floyd. 2000. 'Reactive Oxygen Species, Cell Signaling, and Cell Injury'. *Free Radical Biology & Medicine* 28 (10): 1456–62.
- Hirota, H., J. Chen, U. A. Betz, K. Rajewsky, Y. Gu, J. Ross, W. Müller, and K. R. Chien. 1999. 'Loss of a Gp130 Cardiac Muscle Cell Survival Pathway Is a Critical Event in the Onset of Heart Failure during Biomechanical Stress'. *Cell* 97 (2): 189–98.
- Holmes, Greg, Harm van Bakel, Xueyan Zhou, Bojan Losic, and Ethylin Wang Jabs. 2015.
   'BCL11B Expression in Intramembranous Osteogenesis during Murine Craniofacial Suture Development'. *Gene Expression Patterns: GEP* 17 (1): 16–25.
- Ijiri, K., and C. S. Potten. 1988. 'Circadian Rhythms in the Incidence of Apoptotic Cells and Number of Clonogenic Cells in Intestinal Crypts after Radiation Using Normal and Reversed Light Conditions'. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine* 53 (5): 717–27.

- Ikawa, Tomokatsu, Satoshi Hirose, Kyoko Masuda, Kiyokazu Kakugawa, Rumi Satoh, Asako Shibano-Satoh, Ryo Kominami, Yoshimoto Katsura, and Hiroshi Kawamoto. 2010. 'An Essential Developmental Checkpoint for Production of the T Cell Lineage'. *Science (New York, N.Y.)* 329 (5987): 93–96.
- Inoue, Jun, Yusuke Ihara, Daisuke Tsukamoto, Keisuke Yasumoto, Tsutomu Hashidume, Kenya Kamimura, Shigeki Hirano, Makoto Shimizu, Ryo Kominami, and Ryuichiro Sato. 2017. 'BCL11B Gene Heterozygosity Causes Weight Loss Accompanied by Increased Energy Consumption, but Not Defective Adipogenesis, in Mice'. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 81 (5): 922–30.
- Inoue, Jun, Yusuke Ihara, Daisuke Tsukamoto, Keisuke Yasumoto, Tsutomu Hashidume, Kenya Kamimura, Yuji Nakai, et al. 2016. 'Identification of BCL11B as a Regulator of Adipogenesis'. *Scientific Reports* 6: 32750.
- Janszky, Imre, and Rickard Ljung. 2008. 'Shifts to and from Daylight Saving Time and Incidence of Myocardial Infarction'. *The New England Journal of Medicine* 359 (18): 1966–68.
- Jeyaraj, Darwin, Saptarsi M. Haldar, Xiaoping Wan, Mark D. McCauley, Jürgen A. Ripperger, Kun Hu, Yuan Lu, et al. 2012. 'Circadian Rhythms Govern Cardiac Repolarization and Arrhythmogenesis'. *Nature* 483 (7387): 96–99.
- Johansson, Saga, Annika Rosengren, Kate Young, and Em Jennings. 2017. 'Mortality and Morbidity Trends after the First Year in Survivors of Acute Myocardial Infarction: A Systematic Review'. *BMC Cardiovascular Disorders* 17 (1): 53.
- Jonkers, Iris, and John T. Lis. 2015. 'Getting up to Speed with Transcription Elongation by RNA Polymerase II'. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 16 (3): 167–77.
- Kajstura, J., W. Cheng, K. Reiss, W. A. Clark, E. H. Sonnenblick, S. Krajewski, J. C. Reed, G. Olivetti, and P. Anversa. 1996. 'Apoptotic and Necrotic Myocyte Cell Deaths Are Independent Contributing Variables of Infarct Size in Rats'. *Laboratory Investigation*; *a Journal of Technical Methods and Pathology* 74 (1): 86–107.
- Kanamori, Hiromitsu, Genzou Takemura, Kazuko Goto, Rumi Maruyama, Koh Ono, Kazuya Nagao, Akiko Tsujimoto, et al. 2011. 'Autophagy Limits Acute Myocardial Infarction Induced by Permanent Coronary Artery Occlusion'. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology 300 (6): H2261-2271.
- Karanam, Narasimha Kumar, Piotr Grabarczyk, Elke Hammer, Christian Scharf, Simone Venz, Manuela Gesell-Salazar, Winfried Barthlen, Grzegorz K. Przybylski, Christian A. Schmidt, and Uwe Völker. 2010. 'Proteome Analysis Reveals New Mechanisms of Bcl11b-Loss Driven Apoptosis'. *Journal of Proteome Research* 9 (8): 3799–3811.
- Keller, Maren, Jeannine Mazuch, Ute Abraham, Gina D. Eom, Erik D. Herzog, Hans-Dieter Volk, Achim Kramer, and Bert Maier. 2009. 'A Circadian Clock in Macrophages Controls Inflammatory Immune Responses'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (50): 21407–12.

- Kim, Jin Young, Pieter Bas Kwak, and Charles J. Weitz. 2014. 'Specificity in Circadian Clock Feedback from Targeted Reconstitution of the NuRD Corepressor'. *Molecular Cell* 56 (6): 738–48.
- Kim, Joungmok, Mondira Kundu, Benoit Viollet, and Kun-Liang Guan. 2011. 'AMPK and MTOR Regulate Autophagy through Direct Phosphorylation of Ulk1'. Nature Cell Biology 13 (2): 132–41.
- King, D. P., Y. Zhao, A. M. Sangoram, L. D. Wilsbacher, M. Tanaka, M. P. Antoch, T. D. Steeves, et al. 1997. 'Positional Cloning of the Mouse Circadian Clock Gene'. *Cell* 89 (4): 641–53.
- Kline, Crystal F., and Peter J. Mohler. 2013. 'Evolving Form to Fit Function: Cardiomyocyte Intercalated Disc and Transverse-Tubule Membranes'. *Current Topics in Membranes* 72: 121–58.
- Knutsson, A., T. Akerstedt, B. G. Jonsson, and K. Orth-Gomer. 1986. 'Increased Risk of Ischaemic Heart Disease in Shift Workers'. *Lancet (London, England)* 2 (8498): 89– 92.
- Koster, Maria J. E., Berend Snel, and H. Th Marc Timmers. 2015. 'Genesis of Chromatin and Transcription Dynamics in the Origin of Species'. *Cell* 161 (4): 724–36.
- Kume, K., M. J. Zylka, S. Sriram, L. P. Shearman, D. R. Weaver, X. Jin, E. S. Maywood, M. H. Hastings, and S. M. Reppert. 1999. 'MCRY1 and MCRY2 Are Essential Components of the Negative Limb of the Circadian Clock Feedback Loop'. *Cell* 98 (2): 193–205.
- Kung, Gloria, Klitos Konstantinidis, and Richard N. Kitsis. 2011. 'Programmed Necrosis, Not Apoptosis, in the Heart'. *Circulation Research* 108 (8): 1017–36.
- Kyrylkova, Kateryna, Urszula T. Iwaniec, Kenneth A. Philbrick, and Mark Leid. 2016. 'BCL11B Regulates Sutural Patency in the Mouse Craniofacial Skeleton'. *Developmental Biology* 415 (2): 251–60.
- Kyrylkova, Kateryna, Sergiy Kyryachenko, Brian Biehs, Ophir Klein, Chrissa Kioussi, and Mark Leid. 2012. 'BCL11B Regulates Epithelial Proliferation and Asymmetric Development of the Mouse Mandibular Incisor'. *PloS One* 7 (5): e37670.
- Lamia, Katja A., Uma M. Sachdeva, Luciano DiTacchio, Elliot C. Williams, Jacqueline G. Alvarez, Daniel F. Egan, Debbie S. Vasquez, et al. 2009. 'AMPK Regulates the Circadian Clock by Cryptochrome Phosphorylation and Degradation'. *Science (New York, N.Y.)* 326 (5951): 437–40.
- Lavandero, Sergio, Rodrigo Troncoso, Beverly A. Rothermel, Wim Martinet, Junichi Sadoshima, and Joseph A. Hill. 2013. 'Cardiovascular Autophagy: Concepts, Controversies, and Perspectives'. *Autophagy* 9 (10): 1455–66.
- Le Douce, Valentin, Thomas Cherrier, Raphael Riclet, Olivier Rohr, and Christian Schwartz. 2014. 'The Many Lives of CTIP2: From AIDS to Cancer and Cardiac Hypertrophy: A MANY LIVES OF CTIP2'. *Journal of Cellular Physiology* 229 (5): 533–37.
- Lefta, Mellani, Kenneth S. Campbell, Han-Zhong Feng, Jian-Ping Jin, and Karyn A. Esser. 2012. 'Development of Dilated Cardiomyopathy in Bmal1-Deficient Mice'. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 303 (4): H475-485.
- Lessel, Davor, Christina Gehbauer, Nuria C. Bramswig, Caroline Schluth-Bolard, Sathish Venkataramanappa, Koen L. I. van Gassen, Maja Hempel, et al. 2018. 'BCL11B Mutations in Patients Affected by a Neurodevelopmental Disorder with Reduced Type 2 Innate Lymphoid Cells'. *Brain: A Journal of Neurology* 141 (8): 2299–2311.
- Li, Bing, Michael Carey, and Jerry L. Workman. 2007. 'The Role of Chromatin during Transcription'. *Cell* 128 (4): 707–19.
- Li, Long, Mark Leid, and Ellen V. Rothenberg. 2010. 'An Early T Cell Lineage Commitment Checkpoint Dependent on the Transcription Factor Bcl11b'. *Science (New York, N.Y.)* 329 (5987): 89–93.
- Li, Manxiang, Dimitrios Georgakopoulos, Gang Lu, Lisa Hester, David A. Kass, Jeffery Hasday, and Yibin Wang. 2005. 'P38 MAP Kinase Mediates Inflammatory Cytokine Induction in Cardiomyocytes and Extracellular Matrix Remodeling in Heart'. *Circulation* 111 (19): 2494–2502.
- Li, Peng, Shannon Burke, Juexuan Wang, Xiongfeng Chen, Mariaestela Ortiz, Song-Choon Lee, Dong Lu, et al. 2010. 'Reprogramming of T Cells to Natural Killer-like Cells upon Bcl11b Deletion'. *Science (New York, N.Y.)* 329 (5987): 85–89.
- Li, Ziyue, Guoqing Chen, Yaling Yang, Weihua Guo, and Weidong Tian. 2017. 'Bcl11b Regulates Enamel Matrix Protein Expression and Dental Epithelial Cell Differentiation during Rat Tooth Development'. *Molecular Medicine Reports* 15 (1): 297–304.
- Lim, Wendy, Ismael Qushmaq, Deborah J. Cook, Mark A. Crowther, Diane Heels-Ansdell, P. J. Devereaux, and Troponin T Trials Group. 2005. 'Elevated Troponin and Myocardial Infarction in the Intensive Care Unit: A Prospective Study'. *Critical Care (London, England)* 9 (6): R636-644.
- Lips, Daniel J., Leon J. deWindt, Dave J. W. van Kraaij, and Pieter A. Doevendans. 2003. 'Molecular Determinants of Myocardial Hypertrophy and Failure: Alternative Pathways for Beneficial and Maladaptive Hypertrophy'. *European Heart Journal* 24 (10): 883–96.
- Liu, Chang, Siming Li, Tiecheng Liu, Jimo Borjigin, and Jiandie D. Lin. 2007. 'Transcriptional Coactivator PGC-1alpha Integrates the Mammalian Clock and Energy Metabolism'. *Nature* 447 (7143): 477–81.
- Liu, Pentao, Peng Li, and Shannon Burke. 2010. 'Critical Roles of Bcl11b in T-Cell Development and Maintenance of T-Cell Identity'. *Immunological Reviews* 238 (1): 138–49.
- Lowrey, P. L., K. Shimomura, M. P. Antoch, S. Yamazaki, P. D. Zemenides, M. R. Ralph, M. Menaker, and J. S. Takahashi. 2000. 'Positional Syntenic Cloning and Functional Characterization of the Mammalian Circadian Mutation Tau'. *Science (New York, N.Y.)* 288 (5465): 483–92.

- Lowrey, P. L., and J. S. Takahashi. 2000. 'Genetics of the Mammalian Circadian System: Photic Entrainment, Circadian Pacemaker Mechanisms, and Posttranslational Regulation'. *Annual Review of Genetics* 34: 533–62.
- Lowrey, Phillip L., and Joseph S. Takahashi. 2004. 'Mammalian Circadian Biology: Elucidating Genome-Wide Levels of Temporal Organization'. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 5: 407–41.
- Ma, Di, Satchidananda Panda, and Jiandie D. Lin. 2011. 'Temporal Orchestration of Circadian Autophagy Rhythm by C/EBPβ'. *The EMBO Journal* 30 (22): 4642–51.
- Maejima, Yasuhiro, and Junichi Sadoshima. 2014. 'SUMOylation: A Novel Protein Quality Control Modifier in the Heart'. *Circulation Research* 115 (8): 686–89.
- Mak, Ki M., Chien Yi M. Png, and Danielle J. Lee. 2016. 'Type V Collagen in Health, Disease, and Fibrosis'. *Anatomical Record (Hoboken, N.J.: 2007)* 299 (5): 613–29.
- Manfredini, R., F. Fabbian, A. De Giorgi, B. Zucchi, R. Cappadona, F. Signani, N. Katsiki, and D. P. Mikhailidis. 2018. 'Daylight Saving Time and Myocardial Infarction: Should We Be Worried? A Review of the Evidence'. *European Review for Medical* and Pharmacological Sciences 22 (3): 750–55.
- Marban, Céline, Stella Suzanne, Franck Dequiedt, Stéphane de Walque, Laetitia Redel, Carine Van Lint, Dominique Aunis, and Olivier Rohr. 2007. 'Recruitment of Chromatin-Modifying Enzymes by CTIP2 Promotes HIV-1 Transcriptional Silencing'. *The EMBO Journal* 26 (2): 412–23.
- Martino, Tami A., Gavin Y. Oudit, Andrew M. Herzenberg, Nazneen Tata, Margaret M. Koletar, Golam M. Kabir, Denise D. Belsham, Peter H. Backx, Martin R. Ralph, and Michael J. Sole. 2008. 'Circadian Rhythm Disorganization Produces Profound Cardiovascular and Renal Disease in Hamsters'. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 294 (5): R1675-1683.
- McDonald, M. J., and M. Rosbash. 2001. 'Microarray Analysis and Organization of Circadian Gene Expression in Drosophila'. *Cell* 107 (5): 567–78.
- McDonald, M. J., M. Rosbash, and P. Emery. 2001. 'Wild-Type Circadian Rhythmicity Is Dependent on Closely Spaced E Boxes in the Drosophila Timeless Promoter'. *Molecular and Cellular Biology* 21 (4): 1207–17.
- Meng, Xiao-Ming, David J. Nikolic-Paterson, and Hui Yao Lan. 2016. 'TGF-β: The Master Regulator of Fibrosis'. *Nature Reviews. Nephrology* 12 (6): 325–38.
- Mitchell, Gary F., Germaine C. Verwoert, Kirill V. Tarasov, Aaron Isaacs, Albert V. Smith, null Yasmin, Ernst R. Rietzschel, et al. 2012. 'Common Genetic Variation in the 3'-BCL11B Gene Desert Is Associated with Carotid-Femoral Pulse Wave Velocity and Excess Cardiovascular Disease Risk: The AortaGen Consortium'. *Circulation. Cardiovascular Genetics* 5 (1): 81–90.
- Nagel, Stefan, Maren Kaufmann, Hans G. Drexler, and Roderick A. F. MacLeod. 2003. 'The Cardiac Homeobox Gene NKX2-5 Is Deregulated by Juxtaposition with BCL11B in

Pediatric T-ALL Cell Lines via a Novel t(5;14)(Q35.1;Q32.2)'. *Cancer Research* 63 (17): 5329–34.

- Nagel, Stefan, Michaela Scherr, Alexander Kel, Klaus Hornischer, Gregory E. Crawford, Maren Kaufmann, Corinna Meyer, Hans G. Drexler, and Roderick A. F. MacLeod. 2007. 'Activation of TLX3 and NKX2-5 in t(5;14)(Q35;Q32) T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia by Remote 3'-BCL11B Enhancers and Coregulation by PU.1 and HMGA1'. *Cancer Research* 67 (4): 1461–71.
- Nahrendorf, Matthias, Mikael J. Pittet, and Filip K. Swirski. 2010. 'Monocytes: Protagonists of Infarct Inflammation and Repair after Myocardial Infarction'. *Circulation* 121 (22): 2437–45.
- Norgaard, M. L., S. S. Andersen, T. K. Schramm, F. Folke, C. H. Jørgensen, M. L. Hansen, C. Andersson, et al. 2010. 'Changes in Short- and Long-Term Cardiovascular Risk of Incident Diabetes and Incident Myocardial Infarction--a Nationwide Study'. *Diabetologia* 53 (8): 1612–19.
- Obata, Miki, Ryo Kominami, and Yukio Mishima. 2012. 'BCL11B Tumor Suppressor Inhibits HDM2 Expression in a P53-Dependent Manner'. *Cellular Signalling* 24 (5): 1047–52.
- Oerlemans, Martinus I. F. J., Jia Liu, Fatih Arslan, Krista den Ouden, Ben J. van Middelaar, Pieter A. Doevendans, and Joost P. G. Sluijter. 2012. 'Inhibition of RIP1-Dependent Necrosis Prevents Adverse Cardiac Remodeling after Myocardial Ischemia-Reperfusion in Vivo'. *Basic Research in Cardiology* 107 (4): 270.
- Ogryzko, V. V., R. L. Schiltz, V. Russanova, B. H. Howard, and Y. Nakatani. 1996. 'The Transcriptional Coactivators P300 and CBP Are Histone Acetyltransferases'. *Cell* 87 (5): 953–59.
- Oka, Toru, Yan-Shan Dai, and Jeffery D. Molkentin. 2005. 'Regulation of Calcineurin through Transcriptional Induction of the Calcineurin A Beta Promoter in Vitro and in Vivo'. *Molecular and Cellular Biology* 25 (15): 6649–59.
- Olson, Eric N. 2004. 'A Decade of Discoveries in Cardiac Biology'. *Nature Medicine* 10 (5): 467–74.
- Olson, Eric N., and Michael D. Schneider. 2003. 'Sizing up the Heart: Development Redux in Disease'. *Genes & Development* 17 (16): 1937–56.
- Ou, Jiali, Huilin Li, Peiyuan Qiu, Qing Li, Hung-Chun Chang, and Yun-Chi Tang. 2019.
  'CDK9 Modulates Circadian Clock by Attenuating REV-ERBα Activity'. Biochemical and Biophysical Research Communications 513 (4): 967–73.
- Pacher, Pál, and Csaba Szabó. 2007. 'Role of Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP-1) in Cardiovascular Diseases: The Therapeutic Potential of PARP Inhibitors'. *Cardiovascular Drug Reviews* 25 (3): 235–60.
- Palermo, J., J. Gulick, M. Colbert, J. Fewell, and J. Robbins. 1996. 'Transgenic Remodeling of the Contractile Apparatus in the Mammalian Heart'. *Circulation Research* 78 (3): 504–9.

- Pandey, Sudhir, Wei-Wen Kuo, Tsung-Jung Ho, Yu-Lan Yeh, Chia-Yao Shen, Ray-Jade Chen, Ruey-Lin Chang, et al. 2019. 'Upregulation of IGF-IIRα Intensifies Doxorubicin-Induced Cardiac Damage'. *Journal of Cellular Biochemistry*, May.
- Parlakian, Ara, Claude Charvet, Brigitte Escoubet, Mathias Mericskay, Jeffery D. Molkentin, Guillaume Gary-Bobo, Leon J. De Windt, et al. 2005. 'Temporally Controlled Onset of Dilated Cardiomyopathy through Disruption of the SRF Gene in Adult Heart'. *Circulation* 112 (19): 2930–39.
- Pfeifer, U., and P. Strauss. 1981. 'Autophagic Vacuoles in Heart Muscle and Liver. A Comparative Morphometric Study Including Circadian Variations in Meal-Fed Rats'. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 13 (1): 37–49.
- Piek, A., R. A. de Boer, and H. H. W. Silljé. 2016. 'The Fibrosis-Cell Death Axis in Heart Failure'. *Heart Failure Reviews* 21 (2): 199–211.
- Pinto, Alexander R., Alexei Ilinykh, Malina J. Ivey, Jill T. Kuwabara, Michelle L. D'Antoni, Ryan Debuque, Anjana Chandran, et al. 2016. 'Revisiting Cardiac Cellular Composition'. *Circulation Research* 118 (3): 400–409.
- Podobed, Peter, W. Glen Pyle, Suzanne Ackloo, Faisal J. Alibhai, Elena V. Tsimakouridze, William F. Ratcliffe, Allison Mackay, et al. 2014. 'The Day/Night Proteome in the Murine Heart'. American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 307 (2): R121-137.
- Podobed, Peter S., Faisal J. Alibhai, Chi-Wing Chow, and Tami A. Martino. 2014. 'Circadian Regulation of Myocardial Sarcomeric Titin-Cap (Tcap, Telethonin): Identification of Cardiac Clock-Controlled Genes Using Open Access Bioinformatics Data'. *PloS One* 9 (8): e104907.
- Prabhu, Sumanth D., and Nikolaos G. Frangogiannis. 2016. 'The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis'. *Circulation Research* 119 (1): 91–112.
- Przybylski, G. K., W. A. Dik, J. Wanzeck, P. Grabarczyk, S. Majunke, J. I. Martin-Subero, R. Siebert, et al. 2005. 'Disruption of the BCL11B Gene through Inv(14)(Q11.2q32.31) Results in the Expression of BCL11B-TRDC Fusion Transcripts and Is Associated with the Absence of Wild-Type BCL11B Transcripts in T-ALL'. *Leukemia* 19 (2): 201–8.
- Punwani, Divya, Yong Zhang, Jason Yu, Morton J. Cowan, Sadhna Rana, Antonia Kwan, Aashish N. Adhikari, et al. 2016. 'Multisystem Anomalies in Severe Combined Immunodeficiency with Mutant BCL11B'. *The New England Journal of Medicine* 375 (22): 2165–76.
- Qu, Xinli, Mengjie Jiang, Yu Bo Yang Sun, Xiaoyun Jiang, Ping Fu, Yi Ren, Die Wang, et al. 2015. 'The Smad3/Smad4/CDK9 Complex Promotes Renal Fibrosis in Mice with Unilateral Ureteral Obstruction'. *Kidney International* 88 (6): 1323–35.
- Rabinovich-Nikitin, Inna, Brooke Lieberman, Tami A. Martino, and Lorrie A. Kirshenbaum. 2019. 'Circadian-Regulated Cell Death in Cardiovascular Diseases'. *Circulation* 139 (7): 965–80.

- Ralph, M. R., R. G. Foster, F. C. Davis, and M. Menaker. 1990. 'Transplanted Suprachiasmatic Nucleus Determines Circadian Period'. *Science (New York, N.Y.)* 247 (4945): 975–78.
- Ralph, M. R., and M. Menaker. 1988. 'A Mutation of the Circadian System in Golden Hamsters'. Science (New York, N.Y.) 241 (4870): 1225–27.
- Reppert, Steven M., and David R. Weaver. 2002. 'Coordination of Circadian Timing in Mammals'. *Nature* 418 (6901): 935–41.
- Rimpelä, Jenni M., Ilkka H. Pörsti, Antti Jula, Terho Lehtimäki, Teemu J. Niiranen, Lasse Oikarinen, Kimmo Porthan, et al. 2018. 'Genome-Wide Association Study of Nocturnal Blood Pressure Dipping in Hypertensive Patients'. *BMC Medical Genetics* 19 (1): 110.
- Sano Motoaki, and Schneider Michael D. 2004. 'Cyclin-Dependent Kinase-9'. *Circulation Research* 95 (9): 867–76.
- Schroder, Elizabeth A., Mellani Lefta, Xiping Zhang, Daniel C. Bartos, Han-Zhong Feng, Yihua Zhao, Abhijit Patwardhan, Jian-Ping Jin, Karyn A. Esser, and Brian P. Delisle. 2013. 'The Cardiomyocyte Molecular Clock, Regulation of Scn5a, and Arrhythmia Susceptibility'. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 304 (10): C954-965.
- Segura, Ana Maria, O. H. Frazier, and L. Maximilian Buja. 2014. 'Fibrosis and Heart Failure'. *Heart Failure Reviews* 19 (2): 173–85.
- Shang, Libin, She Chen, Fenghe Du, Shen Li, Liping Zhao, and Xiaodong Wang. 2011. 'Nutrient Starvation Elicits an Acute Autophagic Response Mediated by Ulk1 Dephosphorylation and Its Subsequent Dissociation from AMPK'. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108 (12): 4788–93.
- Simon, Ruth, Heike Brylka, Herbert Schwegler, Sathish Venkataramanappa, Jacqueline Andratschke, Christoph Wiegreffe, Pentao Liu, et al. 2012. 'A Dual Function of Bcl11b/Ctip2 in Hippocampal Neurogenesis'. *The EMBO Journal* 31 (13): 2922–36.
- Skrbic, Biljana, Kristin V. T. Engebretsen, Mari E. Strand, Ida G. Lunde, Kate M. Herum, Henriette S. Marstein, Ivar Sjaastad, et al. 2015. 'Lack of Collagen VIII Reduces Fibrosis and Promotes Early Mortality and Cardiac Dilatation in Pressure Overload in Mice'. *Cardiovascular Research* 106 (1): 32–42.
- Sridhar, Sunandini, Yair Botbol, Fernando Macian, and Ana Maria Cuervo. 2012. 'Autophagy and Disease: Always Two Sides to a Problem'. *The Journal of Pathology* 226 (2): 255–73.
- Su, Xin-Ying, Véronique Della-Valle, Isabelle Andre-Schmutz, Claudie Lemercier, Isabelle Radford-Weiss, Paola Ballerini, Michel Lessard, et al. 2006. 'HOX11L2/TLX3 Is Transcriptionally Activated through T-Cell Regulatory Elements Downstream of BCL11B as a Result of the t(5;14)(Q35;Q32)'. *Blood* 108 (13): 4198–4201.
- Sutmuller, M., J. A. Bruijn, and E. de Heer. 1997. 'Collagen Types VIII and X, Two Non-Fibrillar, Short-Chain Collagens. Structure Homologies, Functions and Involvement in Pathology'. *Histology and Histopathology* 12 (2): 557–66.

- Tang, Bin, Pietro Di Lena, Lana Schaffer, Steven R. Head, Pierre Baldi, and Elizabeth A. Thomas. 2011. 'Genome-Wide Identification of Bcl11b Gene Targets Reveals Role in Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling'. *PloS One* 6 (9): e23691.
- Topark-Ngarm, Acharawan, Olga Golonzhka, Valerie J. Peterson, Brian Barrett, Brigetta Martinez, Kristi Crofoot, Theresa M. Filtz, and Mark Leid. 2006. 'CTIP2 Associates with the NuRD Complex on the Promoter of P57KIP2, a Newly Identified CTIP2 Target Gene'. *The Journal of Biological Chemistry* 281 (43): 32272–83.
- Tsai, Ju-Yun, Petra C. Kienesberger, Thomas Pulinilkunnil, Mary H. Sailors, David J. Durgan, Carolina Villegas-Montoya, Anil Jahoor, et al. 2010. 'Direct Regulation of Myocardial Triglyceride Metabolism by the Cardiomyocyte Circadian Clock'. *Journal of Biological Chemistry* 285 (5): 2918–29.
- Van Vlierberghe, P., I. Homminga, L. Zuurbier, J. Gladdines-Buijs, E. R. van Wering, M. Horstmann, H. B. Beverloo, R. Pieters, and J. P. P. Meijerink. 2008. 'Cooperative Genetic Defects in TLX3 Rearranged Pediatric T-ALL'. *Leukemia* 22 (4): 762–70.
- Vanden Berghe, Tom, Andreas Linkermann, Sandrine Jouan-Lanhouet, Henning Walczak, and Peter Vandenabeele. 2014. 'Regulated Necrosis: The Expanding Network of Non-Apoptotic Cell Death Pathways'. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (2): 135–47.
- Viswambharan, Hema, João M. Carvas, Vladan Antic, Ana Marecic, Corinne Jud, Christian E. Zaugg, Xiu-Fen Ming, Jean-Pierre Montani, Urs Albrecht, and Zhihong Yang. 2007. 'Mutation of the Circadian Clock Gene Per2 Alters Vascular Endothelial Function'. *Circulation* 115 (16): 2188–95.
- Vitaterna, M. H., D. P. King, A. M. Chang, J. M. Kornhauser, P. L. Lowrey, J. D. McDonald, W. F. Dove, L. H. Pinto, F. W. Turek, and J. S. Takahashi. 1994. 'Mutagenesis and Mapping of a Mouse Gene, Clock, Essential for Circadian Behavior'. *Science (New York, N.Y.)* 264 (5159): 719–25.
- Vitaterna, M. H., C. P. Selby, T. Todo, H. Niwa, C. Thompson, E. M. Fruechte, K. Hitomi, et al. 1999. 'Differential Regulation of Mammalian Period Genes and Circadian Rhythmicity by Cryptochromes 1 and 2'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (21): 12114–19.
- Wakabayashi, Yuichi, Jun Inoue, Yoshiaki Takahashi, Atsushi Matsuki, Hitomi Kosugi-Okano, Toshimitsu Shinbo, Yukio Mishima, Ohtsura Niwa, and Ryo Kominami. 2003.
  'Homozygous Deletions and Point Mutations of the Rit1/Bcl11b Gene in γ-Ray Induced Mouse Thymic Lymphomas'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301 (2): 598–603.
- Wakabayashi, Yuichi, Hisami Watanabe, Jun Inoue, Naoki Takeda, Jun Sakata, Yukio Mishima, Jiro Hitomi, et al. 2003. 'Bcl11b Is Required for Differentiation and Survival of Alphabeta T Lymphocytes'. *Nature Immunology* 4 (6): 533–39.
- Wang, Jun, Xin-Hua Feng, and Robert J. Schwartz. 2004. 'SUMO-1 Modification Activated GATA4-Dependent Cardiogenic Gene Activity'. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (47): 49091–98.

- Wang, Qing, Marc Maillard, Ueli Schibler, Michel Burnier, and Frédéric Gachon. 2010. 'Cardiac Hypertrophy, Low Blood Pressure, and Low Aldosterone Levels in Mice Devoid of the Three Circadian PAR BZip Transcription Factors DBP, HLF, and TEF'. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 299 (4): R1013-1019.
- Wang, Zhixing, Jay S. Kirkwood, Alan W. Taylor, Jan F. Stevens, Mark Leid, Gitali Ganguli-Indra, and Arup K. Indra. 2013. 'Transcription Factor Ctip2 Controls Epidermal Lipid Metabolism and Regulates Expression of Genes Involved in Sphingolipid Biosynthesis during Skin Development'. *The Journal of Investigative Dermatology* 133 (3): 668–76.
- Wang, Zhixing, Ling-Juan Zhang, Gunjan Guha, Shan Li, Kateryna Kyrylkova, Chrissa Kioussi, Mark Leid, Gitali Ganguli-Indra, and Arup K. Indra. 2012. 'Selective Ablation of Ctip2/Bcl11b in Epidermal Keratinocytes Triggers Atopic Dermatitis-like Skin Inflammatory Responses in Adult Mice'. *PloS One* 7 (12): e51262.
- Wilkins, Benjamin J., Yan-Shan Dai, Orlando F. Bueno, Stephanie A. Parsons, Jian Xu, David M. Plank, Fred Jones, Thomas R. Kimball, and Jeffery D. Molkentin. 2004. 'Calcineurin/NFAT Coupling Participates in Pathological, but Not Physiological, Cardiac Hypertrophy'. *Circulation Research* 94 (1): 110–18.
- Wu, San-pin, Chiang-Min Cheng, Rainer B. Lanz, Tiannan Wang, Jonathan L. Respress, Sameer Ather, Wen Chen, et al. 2013. 'Atrial Identity Is Determined by a COUP-TFII Regulatory Network'. *Developmental Cell* 25 (4): 417–26.
- Xie, Zhongwen, Wen Su, Shu Liu, Guogang Zhao, Karyn Esser, Elizabeth A. Schroder, Mellani Lefta, Harald M. Stauss, Zhenheng Guo, and Ming Cui Gong. 2015. 'Smooth-Muscle BMAL1 Participates in Blood Pressure Circadian Rhythm Regulation'. *The Journal of Clinical Investigation* 125 (1): 324–36.
- Yagita, K., S. Yamaguchi, F. Tamanini, G. T. van Der Horst, J. H. Hoeijmakers, A. Yasui, J. J. Loros, J. C. Dunlap, and H. Okamura. 2000. 'Dimerization and Nuclear Entry of MPER Proteins in Mammalian Cells'. *Genes & Development* 14 (11): 1353–63.
- Yang, Zhao, Neil E. Bowles, Steven E. Scherer, Michael D. Taylor, Debra L. Kearney, Shuping Ge, Vyacheslav V. Nadvoretskiy, et al. 2006. 'Desmosomal Dysfunction Due to Mutations in Desmoplakin Causes Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy'. *Circulation Research* 99 (6): 646–55.
- Young, M. W., and S. A. Kay. 2001. 'Time Zones: A Comparative Genetics of Circadian Clocks'. *Nature Reviews. Genetics* 2 (9): 702–15.
- Young, Martin E. 2016. 'Temporal Partitioning of Cardiac Metabolism by the Cardiomyocyte Circadian Clock'. *Experimental Physiology* 101 (8): 1035–39.
- Young, Martin E., Rachel A. Brewer, Rodrigo A. Peliciari-Garcia, Helen E. Collins, Lan He, Tana L. Birky, Bradley W. Peden, et al. 2014. 'Cardiomyocyte-Specific BMAL1 Plays Critical Roles in Metabolism, Signaling, and Maintenance of Contractile Function of the Heart'. *Journal of Biological Rhythms* 29 (4): 257–76.

- Zhang, Ling-juan, Walter K. Vogel, Xiao Liu, Acharawan Topark-Ngarm, Brian L. Arbogast, Claudia S. Maier, Theresa M. Filtz, and Mark Leid. 2012. 'Coordinated Regulation of Transcription Factor Bcl11b Activity in Thymocytes by the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathways and Protein Sumoylation'. *Journal of Biological Chemistry* 287 (32): 26971–88.
- Zhang, L.-j., S. Bhattacharya, M. Leid, G. Ganguli-Indra, and A. K. Indra. 2012. 'Ctip2 Is a Dynamic Regulator of Epidermal Proliferation and Differentiation by Integrating EGFR and Notch Signaling'. *Journal of Cell Science* 125 (23): 5733–44.
- Zhang, Yuxiang, Bin Fang, Matthew J. Emmett, Manashree Damle, Zheng Sun, Dan Feng, Sean M. Armour, et al. 2015. 'GENE REGULATION. Discrete Functions of Nuclear Receptor Rev-Erba Couple Metabolism to the Clock'. *Science (New York, N.Y.)* 348 (6242): 1488–92.
- Zhao, Liqun, and Baolin Zhang. 2017. 'Doxorubicin Induces Cardiotoxicity through Upregulation of Death Receptors Mediated Apoptosis in Cardiomyocytes'. *Scientific Reports* 7: 44735.
- Zhou, Pingzhu, and William T. Pu. 2016. 'Recounting Cardiac Cellular Composition'. *Circulation Research* 118 (3): 368–70.

# Liste des Figures

Figure 1: Représentation schématique des différents phénomènes contribuant au remodelage
cardiaque
Figure 2: Interactions des voies de signalisation de la mort cellulaire
Figure 3: Réponse immunitaire après une infarction du myoarde chez la souris
Figure 4: Composition d'un sarcomère cardiaque et d'un disque intercalaire
Figure 5: Voies de signalisation associées à l'hypertrophie cardiaque19
Figure 6 : Voie TGF $\beta$ /SMAD pro-fibrotique
Figure 7 : Mécanismes moléculaires du rythme circadien
Figure 8: Processus biologiques contrôlés par le rythme circadien cardiaque27
Figure 9: Représentation schématique de la localisation du gène BCL11B chez l'humain et de
la protéine Bcl11b
Figure 10 : Alignement des séquences de la protéine Bcl11b chez l'homme, la souris, le
poisson zèbre et le xénope selon le logiciel Clustal O (1.2.4)
Figure 11: Bcl11b: Un facteur de transcription à double fonction
Figure 12: Représentation schématique du locus comportant le gène BCL11B sur le
chromosome 14 q32.2 humain
Figure 13 : Shémas illustrant le principe de l'approche de dissociation et d'isolement des
cardiomyocytes de souris adultes simplifiée, sans Langendorff52
Figure 14: Système de perfusion mis au point dans notre laboratoire
Figure 15 : Résumé des étapes d'isolement de cardiomyocytes adultes
Figure 16 : Mécanisme de la quantification de l'activité de la LDH extracellulaire (Thermo
Fisher Scientific)
Figure 17: Inactivation conditionnelle de Bcl11b spécifiquement dans les cardiomyocytes 60
Figure 18 :L'inactivation de Bcl11b dans les cardiomyocytes modifie la fonction contractile
du cœur et l'homéostasie du tissu cardiaque 2 et 6 mois après le KO
Figure 19: Accumulation de la fibronectine dans le tissu cardiaque des souris Bcl11b-HKO (6
mois post inactivation)
Figure 20: L'inactivation de Bcl11b induit un remodelage cardiaque et une hypertrophie
concentrique
Figure 21: Formation de la fibrose pendant le remodelage cardiaque

Figure 22: Niveau d'expression relatif de l'ARNm des isoformes de collagènes $1\alpha 1$ , $1\alpha 2$ , $3\alpha 1$ ,
5α2, 8α1, et de la fibronectine
Figure 23: Activation de la voie fibrotique TGF $\beta$ /SMAD2 chez les souris Bcl11b-HKO 1
semaine après inactivation70
Figure 24: Réponse inflammatoire et mort cellulaire dans le tissu cardiaque des souris
Bcl11b-HKO 1 semaine après l'inactivation
Figure 25: Identification des fibrolastes par un marquage vimentine dans le tissu cardiaque
des souris Bcl11b-HKO
Figure 26: Expression de l'ARNm des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et la
mort cellulaire
Figure 27 : Quantification de la cyto-toxicité des cultures primaires de cardiomyocytes à l'état
basal et suite au traitement à la doxorubicine
Figure 28: Analyse transcriptomique cardiaque des souris Bcl11b-HKO 3, 7 et 14 jours après
l'inactivation (Affymetrix)77
Figure 29 : Vérification par qPCR de la variation observé dans les microarray de l'expression
des gènes du rythme circadien Bmal1 et Chrono79
Figure 30 : Expression de l'ARNm des gènes du rythme circadien chez des cardiomyocytes en
culture primaire
Figure 31 : Expression des gènes du rythme circadien pendant 24h chez les souris contrôles et
Bcl11b-HKO
Figure 32 : Expression des gènes du rythme circadien à minuit, 3h, 6h et 9h
Figure 33 : Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR suite à l'hypertrophie induite par
la Phénylephrine
Figure 34 : Exemple d'amorce avec pics de fusion uniques et multiples
Figure 35: Niveau d'enrichissement de Bcl11b de la région proximale au promoteur par
rapport à la région distale des gènes ANF, $\beta$ MHC, l'actine squelettique (skActin) et l'actine
cardiaque (cActin)
Figure 36: Effet du traitement Angiotensine II sur les cœurs de souris Bcl11b-HKO
Figure 37 : Niveaux d'expression des ARNm des gènes caractéristiques du remodelage chez
les souris contrôles et Bcl11b-HKO suite au traitement par de l'Angiotensine II
Figure 38 : Bcl11b et le rythme circadien périphérique cardiaque97

## Liste des tableaux

### Liste des abréviations

**Apaf-1:** Apoptotic protéase activating factor 1 AMP: Adénosine monophosphate AMPK: 5' AMP-activated protein kinase **ATP**: Adenosine triphosphate Atg14L: Autophagy-related protein 14-like protein ANF: Atrial Natriuretic Factor Akt: Serine/Threonine Kinase 1 AngII: Angiotensin II Arntl: Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like Aa: Acide aminé ADN: Acide désoxyribonucléique **ARN**: Acide ribonucléique **ARNm**: Acide ribonucléique messager Adpn: Adiponectin Bcl-2: B-cell lymphoma 2 Bcl-X<sub>L</sub>: B-cell lymphoma-extra large Bax: BCL2 Associated X Bak: BCL2-antagonist/killer BH3-only: BCL2 homology region 3 (BH3) only Bad: BCL2 Associated Agonist Of Cell Death Bnip3: BCL2 Interacting Protein 3 Bid: BH3 interacting-domain Bcl11b: B-cell CLL/lymphoma 11B **BNP**: Brain natriuretic factor **Bmal1**: Brain and muscle ARNT-Like1

Bcl11b-HKO: Bcl11b Heart Knock out CD16: Cluster de différenciation 16 **CTGF**: Connective Tissue Growth Factor C/EBPβ: CCAAT/enhancer-binding protein beta Cry: Cryptochrome CHRONO: ChIP-derived Repressor of Network Oscillator **CLOCK**: Circadian Locomotor Output Cycles Kaput **CTD**: C-terminal domain **Col**: Collagène COUP-TF: Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor Ctip2: COUP-TF interacting protein 2 cActin: Cardiac actin CDK9: Cyclin-dependent kinase 9 ChIP: Chromatin immuno-precipitation Cyt C: Cytochrome C cIAP: Calf Intestinal Alkaline Phosphatase **cFLIP**: Cellular FLICE-inhibitory protein **DAMPs**: Damage-associated molecular patterns **Dbp**: D site-binding protein **Dgat2**: Diacylglycerol O-acyltransferase 2 **DAVID**: Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery **DICS** : Déficit immunitaire combiné sévère ET-1 : Endothéline 1

**ECM** : Extracellular matrix **EGFR** : Epidermal Growth Factor Receptor FasR : Fas receptor **FE** : Fraction d'éjection **FR** : Fraction de raccourcissement **GATA4**: GATA binding protein 4 GPCR: G protein coupled receptor HDAC: Histone deacetylase **HEXIM1**: Hexamethylene bis-acetamide inducible 1 Hlf: Hepatic leukemia factor HSP60: Heat Shock Protein 60 Hey2: Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 2 Id2 : Id2 inhibitor of DNA binding 2 **IL** : Interleukin **IP** : Intra-péritonéale Irx: Roquois homeobox protein **IMM**: Inner mitochondrial membrane Klf15: Kruppel like Factor 15 Kv4.2: Potassium voltage-gated channel subfamily D member 2 KChIP2: Potassium Channel Interacting Protein 2 **Ly-6C**: Lymphocyte antigen 6 complex, locus C1 LDH: Lactate déshydrogénase Mcl-1: Myeloid Cell Leukemia Sequence 1 **mPTP**: Mitochondrial permeability transition pore

MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein 1 **MyBP-C**: Myosin-binding protein C MHC: Myosin heavy chain **MEF2**: Myocyte enhancer factor 2 MAPK: Mitogen-activated protein kinases **NF-κB** : Nuclear Factor κB **NOS**: Nitric oxide synthase **NFAT**: Nuclear factor of activated T cells NSC: Noyau supra-chiasmatique Nr1d1: Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1 Nampt: Nicotinamide Phosphoribosyltransferase NAD: Nicotinamide adenine dinucleotide **NK:** Natural Killer NuRD: Nucleosome Remodeling Deacetylase **OMM**: Outer mitochondrial membrane **PMN** : Polymorphonuclear neutrophil **pTEFb**: Positive transcription elongation factor b **PGC1-***α*: PPAR-gamma coactivator 1alpha **p53**: Tumor protein 53 **PARP**: Poly (ADP-ribose) polymérase **PPAR**: Peroxisome proliferator-activated receptor **Ppp1cc**: Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunit Gamma **Pb**: Paire de base **Per**: Period

p21: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 **pSMAD2**: Phosphorylated SMAD PE: Phényléphrine **RIP**: Receptor-interacting protein **ROS**: Reactive oxygen species **RAGE**: Receptor for Advanced Glycation Endproducts **ROR**: RAR-related orphan receptor **REV-ERB**: Nr1d1: nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1 **RT-qPCR**: Quantitative reverse transcription Polymerase Chain Reaction SMAD: Sma- and Mad-related protein SRF: Serum Response Factor SERCA: Sarco/endoplasmic reticulum calcium- ATPase **SUMO** : Small Ubiquitin-like Modifier SuV39H1: Suppressor of variegation 3-9 homolog family skActin: Skeletal Actin **SNPs**: Single nucleotide polymorphisms TCR: T-cell receptor

**TNF-***α*: Tumor necrosis factor alpha **TRADD**: Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain **TRAF**: TNF receptor associated factor t-Bid: Truncated BH3 interacting-domain **TLR**: Toll-Like Receptor **TGF-** $\beta$ : Transforming Growth factor  $\beta$ **T-cap**: Titin cap **Tef**: Thyrotroph embryonic factor **T-ALL**: T-cell acute lymphoblastic leukemia TLX3: T-Cell Leukemia Homeobox 3 **Tbx5**: T-box transcription factor **TSS**: Transcription Start Site **Vps34** : Vacuolar protein sorting 34 **VEGF**: Vascular endothelial growth factor Vol. Ts: Volume télésystolique VIH: Virus de l'immunodéficience humaine **ULK1**: Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1

#### Rôle du facteur de transcription Bcl11b dans l'homéostasie et le remodelage cardiaque

#### Résumé :

Plusieurs formes de cardiomyopathies entraînent un remodelage cardiaque compensatoire pouvant évoluer vers une dilatation ventriculaire et une insuffisance cardiaque. Ce remodelage est caractérisé par une augmentation de la taille des cardiomyocytes associée à un taux élevé d'ARNm et à la réactivation des gènes cardiaques fœtaux. Il a été montré que Bcl11b, un facteur de transcription, interagit avec le complexe régulateur de l'ARN polymérase II et exerce une action inhibitrice sur celui-ci. Une étude génétique sur une cohorte de 20000 participants a permis d'établir une corrélation entre les variations de séquence dans le locus comportant le gène Bcl11b et une susceptibilité accrue aux maladies cardiovasculaires. Ceci suggère que l'étude de la fonction de Bcl11b dans le cœur peut présenter un intérêt majeur. Pour cela, nous avons généré une souris transgénique exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur cardiaque aMHC et ayant l'exon 4 de Bcl11b floxé. Suite à l'injection de tamoxifène, ce système nous permet d'inactiver Bcl11b spécifiquement dans les cardiomyocytes (souris Bcl11b-HKO). Nous avons analysé les souris Bcl11b-HKO à plusieurs temps post injections : 1, 2, 5 semaines et 2, 6 mois. L'inactivation de Bcl11b chez les souris adultes modifie l'homéostasie des cardiomyocytes 7 jours après l'injection de tamoxifène en induisant une mort cellulaire. Celle-ci provoque l'activation des mécanismes de réparation et de remodelage cardiaque: inflammation, fibrose, hypertrophie, suivie par une diminution de la fonction contractile deux mois après injection de tamoxifène. La mort cellulaire a été aussi observée dans des cultures primaires de cardiomyocytes Bcl11b-KO, qui sont plus sensibles au traitement à la Doxorubicine. D'autre part, nous avons observé une perturbation de l'expression des gènes du rythme circadien, et surtout dans la période pré-sommeil chez les souris Bcl11b-HKO et chez les cardiomyocytes Bcl11b-KO en culture. Parallèlement, la fixation de Bcl11b sur la région proximale du promoteur des gènes βMHC, skActin et cActin a été montré dans un contexte hypertrophique (traitements à l'Angiotensine II ou à la phényléphrine) grâce à des expériences de ChIP-qPCR. Nous pensons que Bcl11b participe à la régulation de l'expression des gènes impliqués dans l'hypertrophie cardiaque. En conclusion, mes travaux de thèse mettent en évidence 1) l'importance de Bcl11b dans le maintien de l'homéostasie cardiaque et cela à travers le rôle qu'elle pourrait jouer au niveau de la régulation du rythme circadien cardiaque et 2) son rôle éventuel dans la régulation des mécanismes hypertrophiques.

Mots clés : Mort cellulaire, rythme circadien, régulation de transcription, fibrose, hypertrophie

#### Role of Bcl11b in cardiac homeostasis and remodeling

#### Abstract:

Several forms of cardiomyopathy result in cardiac remodeling that can progress to ventricular dilatation and heart failure. This remodeling is characterized by an increase in cardiomyocyte's size associated with high levels of mRNA and reactivation of fetal heart genes. It has been shown that Bcl11b, a transcription factor, interacts with the regulatory complex of the RNA polymerase II and exerts an inhibitory action on it. A genetic study on a cohort of 20000 participants correlated sequence variations in the Bcl11b locus and susceptibility to cardiovascular disease. This suggests that studying Bcl11b in the heart may be of major interest. For this, we opted for a transgenic mouse that express the Cre recombinase under the  $\alpha$ MHC cardiac promoter and has the exon 4 of Bcl11b floxed. Following the injection of tamoxifen, this system allows us to inactivate Bcl11b in cardiomyocytes (Bcl11b-HKO mice). We analyzed Bcl11b-HKO mice at several time points after the inactivation: 1, 2, 5 weeks and 2, 6 months. We observed that the inactivation of Bcl11b in adult mice altered cardiomyocytes' homeostasis 7 days after tamoxifen injection and induced cell death. This causes the activation of repair mechanisms and cardiac remodeling: inflammation, fibrosis, and hypertrophy followed by a decrease in contractile function two months after Bcl11b's inactivation. Cell death is also observed in Bcl11b-KO primary cardiomyocytes cultures, which are more sensitive to Doxorubicin treatment. On the other hand, we observed a disturbance of circadian rhythm gene expression, especially in the pre-sleep period in Bcl11b-HKO mice, and in cultured Bcl11b-KO cardiomyocytes. In parallel, we characterized the binding of Bcl11b on the proximal promoter region of the  $\beta MHC$ , skActin and cActin genes in a hypertrophic context (Angiotensin II or phenylephrine treatments) using ChIP-qPCR experiments. We believe that Bcl11b participates in the regulation of genes involved in cardiac hypertrophy. In conclusion, my thesis work highlights 1) the importance of Bcl11b in the maintenance of cardiac homeostasis through the role it could play in the regulation of cardiac circadian rhythm and 2) its possible role in the regulation of hypertrophic mechanisms.

Keywords: Cell death, circadian rhythm, transcriptional regulation, fibrosis, hypertrophy