



HAL
open science

GADD45 gamma régule la mort des cellules cardiaques et le remodelage post-infarctus du myocarde

Alexandre Lucas

► **To cite this version:**

Alexandre Lucas. GADD45 gamma régule la mort des cellules cardiaques et le remodelage post-infarctus du myocarde. *Cardiologie et système cardiovasculaire*. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT: 2016TOU30404 . tel-03700490

HAL Id: tel-03700490

<https://theses.hal.science/tel-03700490>

Submitted on 21 Jun 2022

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.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Alexandre Lucas

le mercredi 28 septembre 2016

Titre :

GADD45 gamma régule la mort des cellules cardiaques et le remodelage post-infarctus du myocarde

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Maladie métaboliques et cardiovasculaires

Unité de recherche :

I2MC - INSERM UMR-U1048

Directeur/trice(s) de Thèse :

Pr. Angelo Parini

Dr. Pierre Sicard

Jury :

Pr. Isabelle Castan-Laurell, Présidente du jury

Dr. Stéphanie Barrere-Lemaire, Rapporteur

Dr. Eric Morel, Rapporteur

Sommaire

TABLE DES ILLUSTRATIONS	4
ABREVIATIONS	5
REMERCIEMENTS	7
AVANT-PROPOS	10
I. L'Insuffisance Cardiaque	14
1/ Définition	14
2/ Epidémiologie	15
3/ Classification	15
4/ Facteurs de risques et causes	16
5/ L'infarctus du myocarde	18
5.1 Définition	18
5.2 Symptômes cliniques et diagnostique	18
5.3 Classification.....	18
5.4 Mécanismes.....	19
5.5 Méthodes de reperfusion.....	20
5.6 Modèles d'études	21
II. Remodelage du myocarde post-IDM	22
1/ La mort cellulaire	23
1.1 L'apoptose	23
1.2 La nécrose.....	25
1.3 L'autophagie.....	28
1.4 Nécrose et apoptose au cours de l'IDM et de l'IC.....	28
2/ L'inflammation	29
3/ La fibrose.....	30
4/ Remodelage électrophysiologique	31
5/ Mécanismes cellulaire du remodelage	32
III. Les MAPKs	33
1/ Généralités.....	33
2/ ERK1/2.....	34
3/ JNKs.....	34
4/ ERK5	35
5/ Les kinases p38.....	35

5.1 Structure et distribution	35
5.2 Mécanismes d'activation et de régulation	35
5.3 Les substrats de p38	36
5.4 Rôle dans l'inflammation.....	37
5.5 Rôle dans la fibrose.....	38
5.6 Cardioprotection versus mort cellulaire	38
5.7 Nouvelles voies de signalisations menant à l'activation de p38 et importances dans les pathologies cardiaques	41
IV. GADD 45	43
1/ Structure	43
1.1 Les différentes isoformes.....	43
1.2 Les protéines.....	43
1.3 Les sites d'interactions.....	44
1.4 Régulation de GADD45.....	44
2/ Signalisation et fonctions	46
2.1 GADD45 dans la réparation de l'ADN et l'épigénétique.....	46
2.2 GADD45 et contrôle du cycle cellulaire.....	46
2.3 GADD45 et apoptose/survie cellulaire.....	47
2.4 Autres fonctions.....	49
2.5 GADD45 et la physiopathologie cardiaque.....	49
OBJECTIFS DE LA THESE	51
METHODES	52
1/ Matériels et modèles	52
1.1 Anticorps.....	52
1.2 Plasmide	52
1.3 Souris KO.....	52
1.4 Modèle d'IDM in vivo.....	53
1.5 Injection d'AAV9	53
1.6 Culture Primaire de cardiomyocyte de souris adultes et de rats nouveaux-nés.....	54
1.7 Ischémie Simulée	55
2/ Méthodes.....	56
2.1 Fonction Cardiaque.....	56
2.2 Paramètres histologiques.....	57
2.3 TUNEL	58

2.4 Libération de LDH	58
2.5 Immunoblots.....	58
2.6 Phos-tag.....	59
2.7 PCR quantitative.....	59
ARTICLE.....	61
1/ Introduction	61
2/ Résultats.....	61
3/ Conclusion.....	62
DISCUSSION	63
1/ Quelle isoforme de GADD45 est dérégulé lors du remodelage post-IDM ?.....	63
1.1 Expression des différentes isoformes suite à une ischémie et après un IDM	63
1.2 Régulation de GADD45 γ par le système ubuquitine.....	64
1.2 La phosphorylation, une autre régulation de GADD45 γ ?.....	65
2/ Implication de GADD45 γ dans le remodelage IC post IDM	67
2.1 GADD45 γ dans l'hypertrophie cardiaque	67
2.2 GADD45 γ et remodelage après surexpression ou un KO.....	67
3/ La signalisation de GADD45 γ	69
3.1 GADD45 et la signalisation p38MAPK/RIP1/Caspase8	69
3.2 GADD45 γ et la régulation de p38 par une voie alternative.....	71
3.3 GADD45 un biomarqueur ?.....	73
PERSPECTIVES	74
1/ Nouvelles voies thérapeutiques	75
2/ Biomarqueur	75
BIBLIOGRAPHIE	76

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES :

Figure 2 : Différences entre les IDM de type 1 et 2 selon l'état des artères coronaires (adapté de (20)).	19
Figure 4 : Les voies de signalisation de l'apoptose (adapté de (43)).	24
Figure 5 : La nécrose (adapté de (55)).	27
Figure 6 : Les MAPKs (adapté de (84)).	33
Figure 7 : Les 3 mécanismes d'activation de p38 (adapté de (95)).	36
Figure 8 : Les substrats de p38 (adapté de (101)).	37
Figure 9 : Nouvelles voies d'activation de p38.	41
Figure 10 : Structure monomérique de GADD45 (adapté de (143)).	44
Figure 11 : Modulation de GADD45 (adapté de (151)).	45
Figure 12 : GADD45 et le cycle cellulaire (adapté de (147)).	47
Figure 13 : Apoptose et GADD45 (adapté de (147)).	48
Figure 14 : IDM avec ligature de l'artère coronaire gauche descendante (LAD).	53
Figure 15 : Isolement des cellules ventriculaires de cœurs de rats nouveaux nés sur gradient de Percoll.	55
Figure 16 : Exemple des paramètres mesurés sur une échocardiographie de souris adulte (Image du Dr. Yannis Sainte-Marie).	56
Figure 17 : Courbe pression/volume.	57
Figure 18 : Régulation de GADD45 γ par le système UPS.	65
Figure 19 : Détection de l'état de phosphorylation de GADD45 γ .	66
Figure 20 : GADD45 γ et remodelage post-IDM.	68
Figure 21 : Phosphorylation de TAK1.	70
Figure 22 : Proposition de signalisation de mort des cardiomyocytes par GADD45 γ .	70
Figure 23 : ZAP-70 et GADD45 après un IDM.	72
Figure 24 : PCR quantitative de GADD45 γ corrélée à la concentration sanguine en cTn et à la classification Killip Kimball.	73
Figure 25 : Signalisation de GADD45 après un IDM.	74

TABLEAUX :

Tableau 1 : Les différents types d'insuffisance cardiaque (adapté de (11)).	15
Tableau 2 : Les deux grandes classifications (adapté de (12)).	16
Tableau 3 : Classification en fonction de la tension sanguine (adapté de (10)).	17
Tableau 4 : L'insuffisance cardiaque en Europe (adapté de (19)).	17
Tableau 5 : Effets cardioprotecteurs de l'inhibition de p38 (adapté de (105)).	40

ABREVIATIONS

α -SMA : α -Smooth Muscle Actin
ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine
Ach : Acétylcholine
ADN : Acide désoxyribonucléique
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ANF : Atrial Natriuretic Factor
AngII : Angiotensine de type II
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ATP : Adénosine triphosphate
Bax : Bcl-2-associated X protein
 β -AR : Récepteur β -adrénergique
Bcl-2 : B-cell lymphoma/leukemia-2
BNP : Brain Natriuretic Factor
Ca²⁺ : Calcium
CaM : Calmoduline
CaMKII : Protéine kinase dépendante du Ca²⁺ et de la calmoduline de type II
CICR : Calcium-induced calcium release
CX-43 : Connexine-43
CEC : Couplage Excitation-contraction
CypD : Cyclophyline D
DD : Death Domain
ECG : Electrocardiogramme
ERK : Extracellular regulated kinase
ET-1 : Endothéline de type 1
FE : Fraction d'éjection
FGF: facteur de croissance des fibroblastes
GADD45 : Growth arrest and DNA damage inducible 45
 $G\alpha/G\beta\gamma$: sous unités α et $\beta\gamma$ des protéines G
GLP : Glucagon-like peptide
GTP/GDP : Guanine tri/di-phosphate
GTPase : Guanine triphosphatase ou petite protéine G
HC : Hypertrophie Cardiaque
HSP : Heat shock proteins
HTA : Hypertension Artérielle
HVG : Hypertrophie Ventriculaire Gauche
IC : Insuffisance cardiaque
IDM : Infarctus Du Myocarde
IGF : Insulin-like Growth Factor
IL : Interleukine
ISO : Isoprénaline
JNK : c-Jun N-terminal kinase
KO : Knock-Out
LAMP-2 : Lysosome-associated membrane protein-2
LC3 : microtubule-associated protein 1 Light Chain 3
LTCC : Canaux calciques de type L
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MEC : Matrice extracellulaire
MLC : Chaîne légère de la myosine

MHC : Chaîne lourde de la myosine
MMPs : Métalloprotéinases
MPTP : Pore de transition de perméabilité mitochondriale
mTOR : cible de la rapamycine des mammifères
MyBPC : Protéine C cardiaque liant la myosine
NCX : Echangeur sodium/calcium
NFAT : Facteur nucléaire des lymphocytes T actifs
OD : Oreillette Droite
OG : Oreillette Gauche
PA : Potentiel d'action
PARP : poly ADP-ribose polymérase
PCNA : Antigène nucléaire des cellules prolifératives
PS : Phosphatidyl serine
RCPG : Récepteur couplé aux protéines G
RE : Réticulum endoplasmique
RIP : Receptor interacting protein kinase 1
RS : Réticulum sarcoplasmique
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
RTK : Récepteur tyrosine kinase
RyR : Récepteur de la ryanodine
SERCA : Sarco-endoplasmique reticulum calcium ATPase
SNA : Système Nerveux Autonome
SNC : Système Nerveux Central
STEMI : ST-segment augmentation lors de l'infarctus du myocarde
TAC : Constriction de l'Aorte Transverse
TAK 1 : TGF β -activated kinase 1
TnC, TnI, TnT : Troponine C, I, T
TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha
Tg : Transgénique
TGF : Transforming Growth Factor
TLR : Toll-like receptor
UTR : Région non transcrite
VD : Ventricule Droit
VG : Ventricule Gauche

REMERCIEMENTS

Réaliser des remerciements après plus de 10 ans dans le métier s'avère être un véritable défi tant j'ai fait de nombreuses et heureuses rencontres durant ces années. Je vais donc essayé de faire moins long que le reste du manuscrit et surtout de n'oublier personne.

Je commence donc par le début, un grand merci à Jérôme Basquin mon tout premier maitre de stage lors de mes expériences à l'EMBL à Heidelberg. Tu m'as donné la passion pour ce beau métier qu'est la recherche plus une passion moins avouable pour Arno, Bénabar et NoJazz. Mon travail aujourd'hui sur les HPLC et les purifications de protéines me font souvent pensé à tout ce que tu m'as appris, à nos nombreuses conversations et à quel point c'était génial de bosser avec quelqu'un comme toi.

La suite de mes aventures m'a amené à Chatenay-Malabry dans l'équipe de Frank Lezoualc'h à l'U446... Cet entretien en 2005, dans ce petit bocal avec Eric, fut le début d'une longue histoire, mouvementée mais exceptionnelle. Avec toi Frank j'ai appris tellement de choses, autant d'un point de vue scientifique avec Epac et la signalisation qu'humainement. Malgré nos différents sportifs concernant une équipe évoluant maintenant sous drapeau Qatari-Zlatanesque et toujours pas capable de gagner une ligue des champions, je tenais à te remercier pour la confiance que tu m'as accordée durant ces longues années. Ce sera toujours un plaisir de travailler avec toi.

Ensuite parmi les nombreuses rencontres que j'ai faites à Chatenay, il y a Bubulle alias toi mon Eric Morel. Il y a tant à dire... que de bons moments, de fous rires avec nos expériences loufoques faisant sortir Frank en courant de son bureau, de blagues plus ou moins réussies. La recherche comme je l'ai adoré en Allemagne je l'ai retrouvée en grande partie grâce à toi à Chatenay, du boulot à ne plus en pouvoir jusqu'au milieu de la nuit, le tout sur du Evanescence à faire trembler le bâtiment entre coupé de délires et de grandes discussions, soirées sur le fumble et le vingt nat. Merci encore pour tout...

L'U446 m'a permis de grandir dans un milieu scientifique et humain que je souhaite à chaque étudiant ou jeune diplômé. Cet esprit de groupe, de libre pensée et fraternité est un cas à part. La liste des personnes qui ont compté pour moi là bas est très longue... A commencer par Monique qui m'a transmis le relai dans l'équipe de Frank, Patrick mon copain de café à 7h du matin en bialletti et qui reste un ami et quelqu'un d'extraordinaire. Philippe avec sa bonne humeur et son système de Langendorff awesome, Florence pour les nombreux excellents moments passé en sa compagnie à coté d'un rat la cage thoracique ouverte, Françoise qui m'envoie encore des mails par erreur, Greg et Jérôme indissociables. Fred, Anne, Vovo et sans oublier Renée (et Doug) qui m'a écouté, conseillé avant le concours et toutes ces années, un grand coup de chapeau pour ton combat pour un monde de la recherche meilleur il faudrait bien plus de personnes avec un cœur comme toi. Mon copain Yoni et ma chère Dom pour tout ces bons moments que l'on a partagé et que l'on continuera à partager. Un merci à Rodolphe pour m'avoir accueilli dans son labo durant ses années. Enfin, les remerciements pour mon équipe avec laquelle nous avons passé tant de bons moments. Par qui commencer... Mélanie la suisse, que d'aventures, escalades et encore une fois bons moments passés ensemble, j'ai hâte d'aller vous voir à Lausanne et de rencontrer le petit Thomas. Les magali's indissociable avec leur carabine et les menottes pour Breckler. Merci à toi aussi Audrey pour toutes ces discussions, rigolades, sessions shopping entre midi et deux, ta tentative de création de personnage à la coloc.... Inoubliable. Un grand merci aussi à Nico pour toutes ses matinées passées

ensemble à l'aube à attendre devant la porte que 7h soit passée pour entrer dans le labo et enfin Bertrand pour ses grands discussions sur le rock underground et ses cours de physio cardiaque...

Pour faire la transition du voyage à Toulouse (et parce qu'elle adore les transitions), un grand merci à toi ma pocahontas alias Anne-Co ou Acétyl Co comme dirait Greg. Je pense que comme pour Eric plus haut je vais devoir faire une pause au milieu pour verser ma larme, mais tu as beaucoup compté au labo, à l'extérieur et maintenant encore... Tu m'as aidé, compris, supporté dans tout les sens du terme, prêté ton canap à Paris comme à Toulouse après nos nombreuses soirées. On a rit, pas mal éteindre notre soif, bosser dur etc.... Tu es quelqu'un qu'on ne peut oublier, c'est un véritable plaisir d'être ton pote (même si je commence à préférer Ju...).

Enfin me voilà à Toulouse, la ville de la loose comme dirait une bonne amie à moi. Je tiens à remercier tout d'abord Angelo pour m'avoir accueilli dans son centre puis son équipe et pour toutes les balles que tu as du laisser passer au tennis pour me faire plaisir... ou pas.

Pierre je tenais à te remercier particulièrement de m'avoir récupéré durant une période difficile, de m'avoir soutenu, donné un projet, pour nos longues après midi de discussions sur GADD et bien d'autres sujets passionnants. Nous avons passé de nombreuses épreuves ensemble et nous y sommes arrivés tant sur le papier que dans nos vies. Je suis heureux d'avoir pu partager tout ça avec toi.

Dans l'équipe 6, je tenais à remercier François pour ses blagues, les magnifiques photos d'Alice et bien d'autres très bons moments passés en ta compagnie. Un grand merci à Dounia, Daniëlle, Nanou, Jeanne, Victo, Marianne, Oxana, Rodica, Jessica d'avoir fait de cette expérience dans l'équipe quelque chose de très très sympa.

Il ya ensuite plusieurs personnes dispersées dans le centre que je tiens à remercier, JJ Yoda pour les bons moments autour de Star wars, star trek... Guillaume pour son éternelle bonne humeur, le sergent chef pour.... Ba je ne sais pas je cherche encore je ne vais pas non plus te remercier manquerait plus que ça 😊. Chantal et Gwen pour leur bonne humeur et leur capacité à supporter mes blagues. Karine pour son soutien. Lucie pour les sessions café et piscine où on papote bien (et ce n'est que le début vivement le bureau). Christiane, Justine, Pauline, Fred pour m'avoir écouté et supporté ! Jean-José pour m'avoir soutenu depuis 6ans maintenant m'avoir emmené en rando, invité à des barbecues bien joyeux ! Paki pour les parties de ping pong dans le hall du centre avec Fred et Matteo. Christophe pour son humour lourdingue et son côté nounours qui me fait tant rire. Yannis qui m'a écouté, supporté tant pour la thèse que dans l'équipe de Frank quand nous sommes arrivés. Un grand merci à Isabelle d'avoir été ma présidente de jury et à Philippe de m'avoir soutenu.

Enfin à l'I2MC, il y a mes 2 mamans Marie et Alexia. Vous êtes d'un soutien, d'une gentillesse et d'une intelligence que l'on retrouve rarement dans une vie. C'est un pur bonheur de travailler, rire, parfois raler (souvent pour moi) avec vous.

Maintenant hors de l'I2MC, il y a tout mes copains du tennis qui me soutiennent et m'ont encouragé pour la thèse (pas au tennis) au travers de toutes ces soirées mémorables... Merci à vous les copains, mon chico Cyril, mon ptit grilladin, mon grand coach reiber, Captain Fab, Maximus, Béné, Tyty, Nico, Mat, Darraiii, La borje, Dodo, Vince la machina.

Astrid et Benoit je tenais à vous remercier aussi, Strid pour ses potins inoubliables et Benoit pour ses bonnes soirées (dont celles à venir au tennis...).

Merci à dédé la pralinette pour sa présence et l'effort de guerre qu'il fournit avec Del en supportant le CO.

Caro et Nico, merci à vous d'eux (mais surtout à Nico de me laisser l'humilier à Fifa ☺). Vous me manquez beaucoup et vous m'avez manqué à la thèse. Il est difficile de résumer tout les bons moments que l'on a passé et que l'on passera encore ensemble à part qu'ils sont géniaux tout comme vous.

On s'approche de la fin, un grand merci à Toi mon Claude, pour tout ton soutien depuis que nous sommes amis. Je te dois énormément pour mon concours toi qui m'a fait tant répéter. Je te dois de nombreuses soirées délirantes, de cinés, de foot, tennis, fifa, rocket league, des journées de bricolages d'un autre temps que nous remettrons bientôt. Bref depuis cette soirée chez Matteo il y a maintenant 5ans tu es l'une de mes plus belles rencontres amitiés (et je n'irai pas plus loin quoique...).

Pour finir, un grand merci à mes parents pour leur soutien et leur présence de grand parents géniaux.

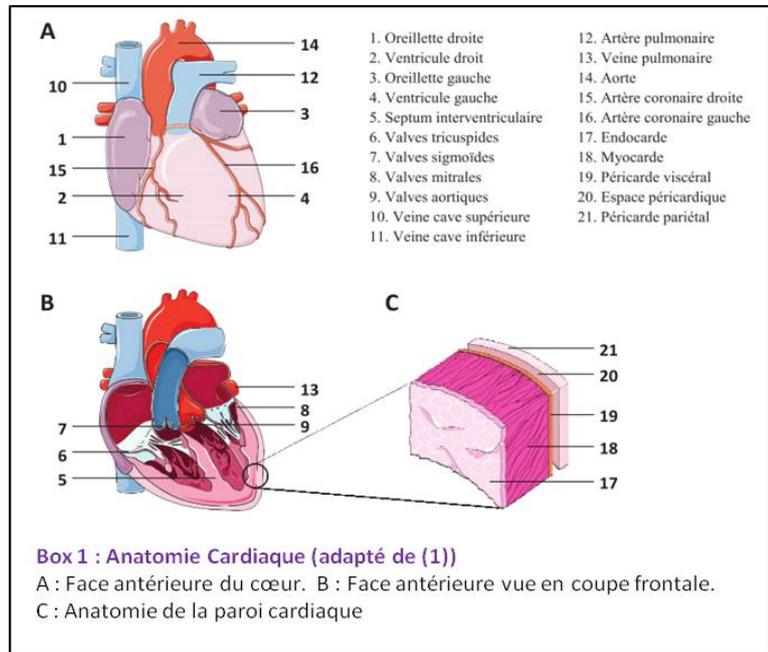
Et biensur, un merci à Alice d'avoir corrigée ma thèse d'où toutes les fautes (à 1 an ça peut se comprendre, bien que tu sois probablement déjà meilleure que le correcteur automatique de word).

Ah oui j'allais oublier, mais non, un grand merci à toi la femme de ma vie (au rythme où ça va je vais mettre deux mois pour écrire les remerciements et 2kg de sopalin) pour ta présence, ta patience, ta générosité, ton travail acharné pour le pot, de m'avoir libéré un peu de temps sur la fin et surtout pour m'en laisser souvent pour le tennis. Je suis comblé que tu fasses partie de ma vie et j'ose espérer que tu me supporteras encore pour le meilleur et pour le pire.

AVANT-PROPOS

Anatomie

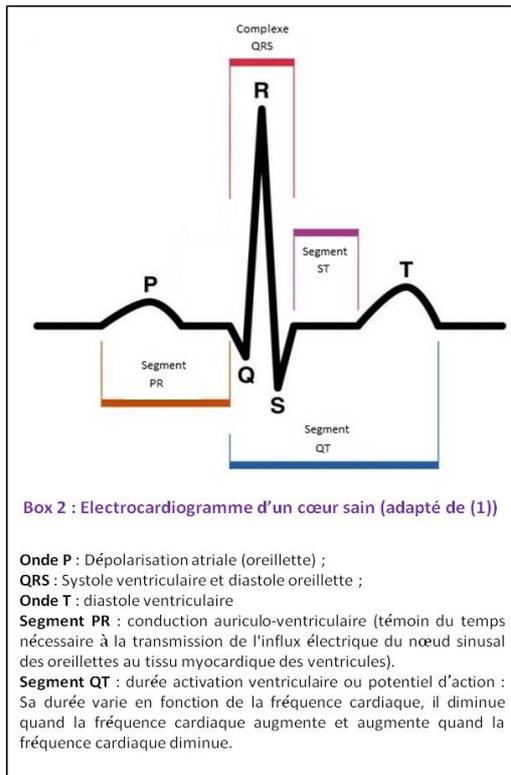
Le cœur est composé d'un muscle strié, le myocarde, qui est divisé en deux parties, anatomiquement distinctes séparées par une paroi appelée le septum : le cœur gauche et le cœur droit. Chacune de ces parties est divisée en deux sous-parties, oreillette et ventricule. Il existe entre ces différents compartiments un système de valves qui empêche le sang de refluer en amont (Box 1).



Son activité est cyclique, elle consiste en la succession de deux phases : la systole (phase de contraction) et la diastole (phase de relaxation). Durant la systole, les ventricules gauche et droit se contractent simultanément pour éjecter le sang respectivement dans l'aorte et l'artère pulmonaire. Lors de la diastole, ils se relâchent afin de se remplir de sang en provenance des oreillettes.

Le Potentiel d'Action

La coordination est assurée par un pacemaker interne appelé nœud sinusal, un regroupement de cardiomyocytes spécialisés dans la paroi de l'OD. Le nœud sinusal transmet une impulsion électrique qui est relayée à l'ensemble du tissu musculaire par le biais du faisceau de His et de Purkinje. Cette onde électrique ou potentiel d'action (PA) produit la contraction cardiaque. La conduction électrique normale du cœur permet de coordonner la propagation des impulsions électriques qui initient la contraction. L'électrocardiogramme (ECG) reflète ces événements électriques (Box 2). La dépolarisation atriale est représentée par l'onde P tandis que le complexe QRS correspond à la systole ventriculaire et à la diastole des oreillettes. La diastole ventriculaire est représentée par l'onde T. Le segment PR représente la conduction auriculo-ventriculaire tandis que le segment QT englobe la durée totale de l'activation ventriculaire encore appelé potentiel d'action (PA) (Box 2).

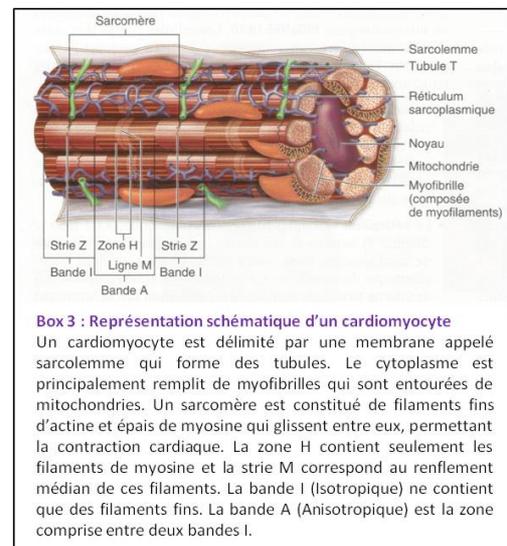


A l'aide de cet ECG on peut détecter différents troubles du rythme cardiaque. Un rythme cardiaque régulier est normal lorsqu'il est compris en journée entre 60 et 100 bpm (battement par minute), et entre 40 et 80 bpm pendant la nuit. Hors de ces limites, on parle de bradycardie lorsqu'il est trop lent, et de tachycardie lorsqu'il est trop rapide.

La contraction des cardiomyocytes

Les cardiomyocytes possèdent des propriétés particulières leur permettant de transformer le PA en un signal intracellulaire conduisant à la contraction cellulaire. Ces propriétés sont généralement regroupées sous le terme de couplage excitation-contraction (CEC). Ce couplage est possible grâce à

une organisation structurale et moléculaire adaptée des cardiomyocytes. La membrane plasmique des cardiomyocytes forme régulièrement des invaginations appelées tubules transverses (Tubule T). Les tubules T sont positionnés de façon précise par rapport aux protéines contractiles et leur membrane contient des protéines intervenant dans le CEC comme les canaux calciques (Ca^{2+}) de type L. Ces canaux voltage-dépendant permettent l'entrée du calcium dans la cellule. En regard des tubules T, le réticulum sarcoplasmique (RS) est un compartiment intracellulaire dont les terminaisons forment des citernes spécialisées dans le stockage de Ca^{2+} . C'est sur la membrane de ces citernes qu'est retrouvé le récepteur à la Ryanodine (RyR) responsable de la libération massive de Ca^{2+} dans le cytoplasme et de la contraction. Le Ca^{2+} est ensuite recapté grâce à une pompe calcique située sur le réticulum sarcoplasmique : la SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase) dont l'isoforme cardiaque est la SERCA2a. Au repos, la concentration de Ca^{2+} libre intracellulaire est très faible, de l'ordre de 10^{-8} à $10^{-7}M$. Lors d'un PA, il y a une augmentation locale de Ca^{2+} libre intracellulaire. Cette augmentation, trop faible pour entraîner une contraction, est toutefois suffisante pour activer les RyR2 situés sur le RS ce qui va entraîner une libération massive de Ca^{2+} . Ce mécanisme est appelé Calcium Induced-Calcium Released (CICR) et permet d'atteindre une concentration de Ca^{2+} intracellulaire de $10^{-6}M$,



concentration suffisante pour activer les myofilaments et donc permettre la contraction. Enfin, le Ca^{2+} est recapté via la SERCA2a dans le RS tandis que d'autres protéines membranaires comme la Ca^{2+} ATPase et l'échangeur sodium/calcium (NCX) participent à son extrusion de la cellule (1).

La signalisation cardiaque

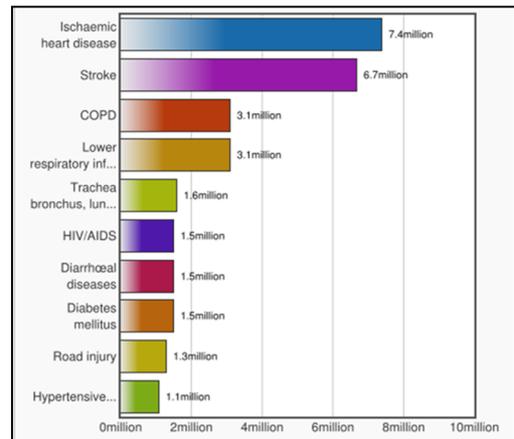
En plus des canaux voltage-dépendant et des canaux calciques différents récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) sont largement impliqués dans la physiologie cardiaque. Leur fonction est la transduction des stimuli extracellulaires (hormones, neurotransmetteurs, ions Ca^{2+} , nucléotides, peptides, lipides...) à travers la membrane jusqu'à des protéines intracellulaires effectrices en passant par les protéines G hétérotrimériques (2). Les quatre grandes familles de protéines G α (G α_s , G α_i , G α_q et G $\alpha_{11/12}$) diffèrent quant aux molécules de la signalisation qu'elles modulent et des conséquences physiologiques associées (3) :

- Les récepteurs couplés à la protéine G s , dit adrénergiques (ARs), servent d'interface entre le système nerveux sympathique et le système cardio-vasculaire et sont activés par les catécholamines. Il existe deux types d'ARs, les récepteurs α -adrénergiques (α -ARs) et les β -adrénergiques (β -ARs). Ces derniers, existent sous 3 sous types (β_1 , β_2 et β_3) dans le cœur humain. Les β_1 -ARs représentent approximativement 80% des β -ARs dans le cœur humain sain où ils régulent la contractilité et la fonction cardiaque (4). Il existe d'autres récepteurs couplés aux protéines G s comme le récepteur à l'adénosine a des effets cardioprotecteurs dans l'ischémie cardiaque en induisant une vasodilatation coronarienne, ce qui augmente l'approvisionnement en oxygène en inhibant les dommages cellulaires médiés par les radicaux de l'oxygène (5).
- Trois grandes catégories de récepteurs sont couplés la protéine G q dans le cœur : les récepteurs à l'Angiotensine (ATR), les α -1-adrénergiques (α -1Ars) et ceux à l'Endothéline (ET1R).
- La voie de signalisation G i , dite inhibitrice, s'oppose à la voie G s car elle va inhiber l'AC et entrainer une diminution de la synthèse d'AMPc. L'activation de cette voie provoque une diminution du rythme cardiaque, une réduction des LTCC et donc une diminution de la force de contraction des cardiomyocytes.

Les pathologies cardiaques

Les pathologies cardiaques sont nombreuses. Durant cette thèse, nous nous focalisons sur l'insuffisance cardiaque (IC) après un infarctus du myocarde (IDM). Il est cependant important de rappeler que l'hypertrophie cardiaque (HC) est un mécanisme compensatoire mis en place par le

cœur afin de s'adapter à une surcharge hémodynamique. L'HC se caractérise par une augmentation de la masse cardiaque afin de contrer l'augmentation de tension qui s'exerce sur les parois du myocarde et de permettre au cœur de fonctionner normalement. Ce mécanisme adaptatif est appelé hypertrophie compensée. Lorsque le stress hémodynamique est suffisamment intense ou prolongé ou qu'il survient dans un contexte particulier, l'activation de l'HC entraîne une dilatation du ventricule, une altération de la fonction cardiaque et le cœur devient insuffisant. On observe un déclin progressif du travail cardiaque malgré une activation continue du programme hypertrophique. On parle alors d'hypertrophie décompensée et maladaptative. L'IC survient lorsque l'hypertrophie est décompensée.



Box 4 : Les 10 causes de mort les plus importantes dans le monde (Organisation Mondiale de la Santé)

Ce graphique place l'IDM comme la première cause de mortalité devant les attaques, les maladies chroniques (COPD), les problèmes respiratoires, le SIDA (AIDS), le diabète ou encore les accidents de la route

Il faut rappeler que l'IDM, et donc l'IC, est actuellement la première cause de mortalité dans le monde (Box 4). L'étude des mécanismes moléculaires liés au remodelage cardiaque suite à un IDM est donc essentielle pour un développer de nouveaux traitements encore plus efficaces.

I. L'Insuffisance Cardiaque

1/ Définition

L'insuffisance cardiaque (IC) est un syndrome clinique complexe qui survient secondairement à des anomalies héritées ou acquises de la structure cardiaque, de la fonction cardiaque ou des deux et qui empêche le cœur d'exercer sa fonction de pompe (6).

La cause la plus fréquente de l'IC est l'infarctus du myocarde (IDM). Cependant de multiples pathologies peuvent provoquer une dysfonction du muscle cardiaque. C'est le cas par exemple de l'hypertension artérielle (HTA), du rétrécissement aortique ou bien de certaines cardiomyopathies. Ces pathologies cardiovasculaires représentent la très grande majorité des étiologies associées au développement de l'IC (7).

Suite à une surcharge de travail, souvent provoquée par une perte musculaire lors d'un infarctus du myocarde (IDM) ou encore par une surcharge de pression dans l'hypertension artérielle (HTA), le cœur ne peut plus maintenir un débit sanguin nécessaire à l'organisme au repos ou durant l'effort.

L'IC est la conséquence d'une altération de la contractilité du ventricule et se caractérise par un remodelage cardiaque notamment au niveau du VG qui présente une augmentation de sa masse, une dilatation et hypertrophie excentrique ou concentrique (Figure 1). Nous traiterons ce remodelage en détail dans le chapitre suivant.

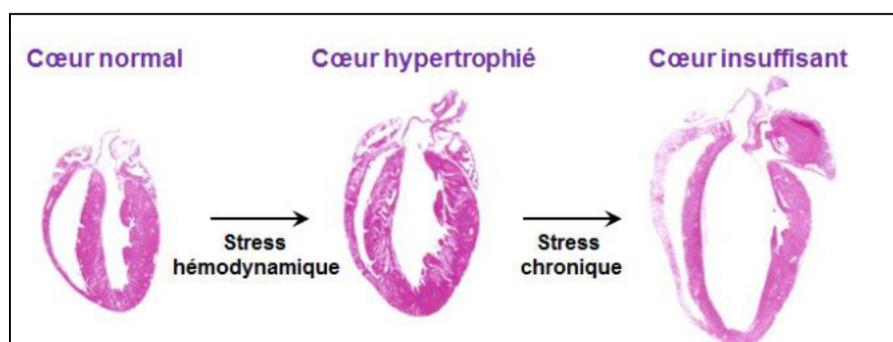


Figure 1 : Evolution du myocarde vers l'IC (d'après (8)).

En réponse à une surcharge hémodynamique, le myocarde s'adapte en augmentant sa masse musculaire afin de diminuer la pression s'exerçant sur les parois des ventricules et d'assurer un débit sanguin suffisant pour subvenir aux besoins de l'organisme. Ce processus appelé hypertrophie est caractérisé au niveau cellulaire par une augmentation de la taille des cardiomyocytes et de la synthèse protéique, une réorganisation des myofibrilles ainsi que la réexpression des gènes fœtaux. Cette hypertrophie devient pathologique dans la mesure où, à long terme, ce remodelage est délétère et altère la fonction cardiaque qui décline progressivement vers l'insuffisance cardiaque.

2/ Epidémiologie

L'IC est un problème de santé publique majeur qui touche 23 millions de personnes dans le monde (9). Malgré les avancées thérapeutiques, elle constitue un risque de morbidité élevé car sa mortalité est évaluée à 5ans. Des années 70 à 90, il y a eu une augmentation dramatique de la prévalence des IC. Cette augmentation reflète un allongement de la durée de vie car la prévalence de l'IC est de plus de 80% chez les individus âgés de plus de 65ans (9). Depuis les années 2000 la prévalence s'est stabilisée mais l'IC reste aujourd'hui la première cause de décès dans le monde provoquant la mort de 7,4 millions de personnes (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>). On estime le coût des soins et systèmes médicaux à 631 millions d'euros (10).

La plus grande base de données permettant une analyse des origines vient de l'étude EuroHeart Survey incluant 11327 patients. Elle met en évidence que la majorité des IC sont les conséquences de pathologies cardiaques ischémiques telles que l'IDM.

3/ Classification

Les symptômes les plus communs de l'IC sont une dyspnée à l'effort et/ou au repos, une fatigue chronique, des œdèmes des jambes, des palpitations et une baisse de la tension artérielle.

Il existe différentes classifications de l'IC en fonction du délai entre le début de la dysfonction ventriculaire et les manifestations cliniques, la valeur de la fraction d'éjection (FE) ou encore la localisation de l'IC (Tableau 1) (11).

Tableau 1 : Les différents types d'insuffisance cardiaque (adapté de (11)).

Délai entre la dysfonction ventriculaire et les manifestations cliniques	Pas de mécanismes d'adaptation	IC aiguë
	Mise en place des mécanismes d'adaptation	IC chronique
Valeur de la fraction d'éjection (FE)	<40-50%	IC à fraction d'éjection altérée (IC à dysfonction systolique)
	≥40-50%	IC à fraction d'éjection préservée (IC à dysfonction diastolique)
Site principal de la congestion	Circulation systémique	IC gauche
	Circulation pulmonaire	IC droite

Deux autres classifications sont rapportées en fonction de la sévérité de l'IC. La première, la classification NYHA (New York Heart Association), établie en 1928, est basée sur les symptômes cliniques fonctionnels de l'IC au repos ou à l'effort (Tableau 2). C'est la classification la plus utilisée actuellement, bien qu'elle ne prenne pas en compte l'atteinte structurelle du myocarde. La seconde

de 2001, la ACC/AHA (American College of Cardiology/American Heart Association), visant à compléter la NYHA, est basée sur l'évolution et la progression de l'IC (12).

Tableau 2 : Les deux grandes classifications (adapté de (12))

Classification NYHA		Classification ACC/AHA	
		Classe A	Forte susceptibilité de développer une IC (nombreux facteurs de risques). Pas d'anomalie structurelle ou fonctionnelle. Pas de symptôme.
Classe I	Pas de limitation de l'activité physique ordinaire, celle-ci ne provoquant pas de fatigue, palpitation ou dyspnée	Classe B	Anomalie structurelle cardiaque dont la prévalence est associée à l'IC (Infarctus myocarde, remodelage VG). Pas de signe ou symptôme clinique d'IC
Classe II	Légère limitation de l'activité physique ordinaire, celle-ci induisant fatigue, palpitation ou dyspnée. Pas de symptôme au repos.	Classe C	Pathologie structurelle associée à des symptômes d'IC tels que fatigue, dyspnée au cours de l'effort.
Classe III	Limitation franche de l'activité physique ordinaire. Pas de symptôme au repos		
Classe IV	Impossibilité de mener sans gêne une activité physique. Les symptômes sont présents au repos.	Classe D	Pathologie structurelle associée à des symptômes de l'IC durant l'effort et au repos. Nécessitant une intervention chirurgicale.

4/ Facteurs de risques et causes

En plus de l'âge, on sait que les hommes sont plus touchés mais on trouve aussi comme facteurs de risques majeurs l'hypertension, le diabète, l'obésité, l'hypertrophie du ventricule gauche et les pathologies valvulaires (9).

L'hypertension artérielle (HTA) correspond à une hyperpression du sang sur la paroi des artères ce qui entraîne à plus long terme des anomalies et des rigidifications de ces dernières. Elle constitue un risque majeur d'accident cardiovasculaire et touche 20% de la population adulte. Une HTA est caractérisée par une tension égale ou supérieure à 140 mmHg pour la pression systolique ou 90 mmHg pour la pression diastolique après plusieurs mesures répétées. Depuis 2003, une classification, définissant plusieurs niveaux d'hypertension en fonction de la tension systolique et diastolique (Tableau 3), a été mise en place par le groupe de travail de l'ESC (European Cardiac Society) (13). A partir de la catégorie normale haute il existe un risque élevé de pathologie vasculaire associée et en particulier de cardiopathies ischémiques (angine de poitrine, infarctus du myocarde).

Par ailleurs, la pression artérielle augmente indirectement l'activité du cœur pour maintenir le débit sanguin ce qui entraîne une hypertrophie ventriculaire gauche pouvant mener à une IC. Dans la cohorte de Framingham (14) 75% des IDM avaient des antécédents d'HTA. De plus, l'étude de

Rotterdam (15) démontre que les hommes et les femmes atteints d'HTA ont respectivement deux et trois fois plus de risques de développer un IDM ou une IC que leurs homologues sains.

Tableau 3 : Classification en fonction de la tension sanguine (adapté de (10))

Catégories	Tension Systolique		Tension Diastolique
Optimale	<120	Et	<80
Normale	120-129	Et/ou	80-84
Normale Haute	130-139	Et/ou	85-89
Hypertension niveau 1	140-159	Et/ou	90-99
Hypertension niveau 2	160-179	Et/ou	100-109
Hypertension niveau 3	≥180	Et/ou	≥110
Hypertension systolique isolée	≥140	Et	>90

Parmi les facteurs de risques et les causes, le diabète tient une place importante. Le diabète est lié au développement de l'IC avec une augmentation du risque d'IDM allant de deux fois pour l'homme à cinq fois pour la femme (14). Le diabète de type 2 peut résulter d'une dérégulation du système de maintien de l'homéostasie glucidique. Il se caractérise notamment par une hyperglycémie à jeun et une insulino-résistance, et représente 90 à 95% des diabétiques (16), (17). Les patients atteints de diabète peuvent développer des pathologies des artères coronaires, de l'HTA, des dysfonctions ventriculaires, qui conduisent le plus souvent à une mort par IDM.

Le dysfonctionnement de la voie de l'insuline est considéré comme un point crucial dans l'augmentation du risque d'IDM (18). Une grande variété de médiateurs sont altérés ce qui provoque une augmentation de l'apoptose des cardiomyocytes, un dérèglement de la balance énergétique, un CICR modifié, une augmentation des espèces réactives à l'oxygène comme le NO (Monoxyde d'azote) ou encore un dysfonctionnement des cellules endothéliales et des fibroblastes.

Enfin, 68% des IC ont comme point de départ un accident ischémique comme IDM (Tableau 4), ce qui fait de cette pathologie un problème de santé majeur.

Tableau 4 : L'insuffisance cardiaque en Europe (adapté de (19))

Ischémique	68%
Non Ischémique	32%
- Hypertension	53%
- Cardiomyopathies	11%
- Valvulopathies	29%
- Fibrillation atriale	43%
- Diabètes	27%
- Autres	20%

5/ L'infarctus du myocarde

5.1 Définition

Dans les années 2000 un groupe de travail, regroupant l'ESC, l'American College of Cardiology Foundation (ACCF), l'American Heart Association (AHA) et la World Heart Federation (WHF), a établi la première définition complète de l'infarctus du myocarde. Dans la troisième version de cette définition, l'IDM est défini comme une pathologie provoquant la mort des cardiomyocytes par une ischémie prolongée (20).

5.2 Symptômes cliniques et diagnostique

L'ischémie cardiaque est la première étape du développement de l'IDM et est le résultat d'un déséquilibre entre l'apport et la demande d'oxygène. Il y a alors mise en place de plusieurs symptômes tels que la nausée, une douleur dans la poitrine durant plus de vingt minutes et une syncope. Ces symptômes couplés à un électrocardiogramme (ECG) normal s'avèrent parfois liés à des pathologies d'ordres neurologiques, pulmonaires ou encore gastro-intestinales provoquant des erreurs de diagnostics. On peut séparer l'IDM en deux groupes à partir de l'ECG, les patients avec une augmentation du segment ST durant l'IDM (STEMI : ST-segment Elevation Myocardial Infarction) et les non STEMI.

Il est alors nécessaire de corréliser ces informations à un biomarqueur spécifique d'une lésion réversible ou non du myocarde. Une lésion du myocarde, provoquée par une ischémie prolongée, constitue l'étape avant la nécrose du myocarde. Elle peut être détectée dans le sang par des niveaux augmentés de Troponine cardiaque (cTn) ou de la fraction MB de la créatine kinase (CK-MB). La Troponine cardiaque I ou T (cTnI ou cTnT) est spécifique des cellules cardiaques et impliquée dans la contraction, tandis que la fraction MB de la créatine kinase (CK-MB) est l'une des trois isoenzymes cytosoliques que l'on retrouve dans le myocarde. La cTnI augmente deux à trois heures après une lésion du myocarde tandis que la CK-MB atteint sa plus forte concentration entre quatre et six heures, ce qui en plus de la spécificité tissulaire fait de la cTnI le biomarqueur le plus utilisé. Les tests de cTnI sont devenus très sensibles et sont essentiels dans le diagnostic d'un IDM. Ils sont en effet capables de différencier les patients atteints de syndromes coronaires de ceux présentant des élévations de la cTn provenant d'autres pathologies (21).

5.3 Classification

Pour la mise en place rapide d'un traitement efficace, l'IDM a été classé en cinq types avec des diagnostics cliniques différents et des stratégies thérapeutiques associées :

- L'**IDM de type 1**, encore appelé IDM spontané, est lié à une rupture d'une plaque d'athérosclérose, à une ulcération, une érosion des artères coronaires et a pour conséquence une diminution du débit sanguin ce qui aboutit à une nécrose.
- L'**IDM de type 2** est due à une ischémie provoquée par un autre évènement qu'une pathologie des artères coronaires (Figure 2).
- L'**IDM de type 3** est la mort cardiaque avec des symptômes suggérant une ischémie, avant d'avoir eu les résultats des biomarqueurs.
- Les **IDM de types 4 et 5** sont des IDM associés à des procédures de revascularisation chirurgicales.

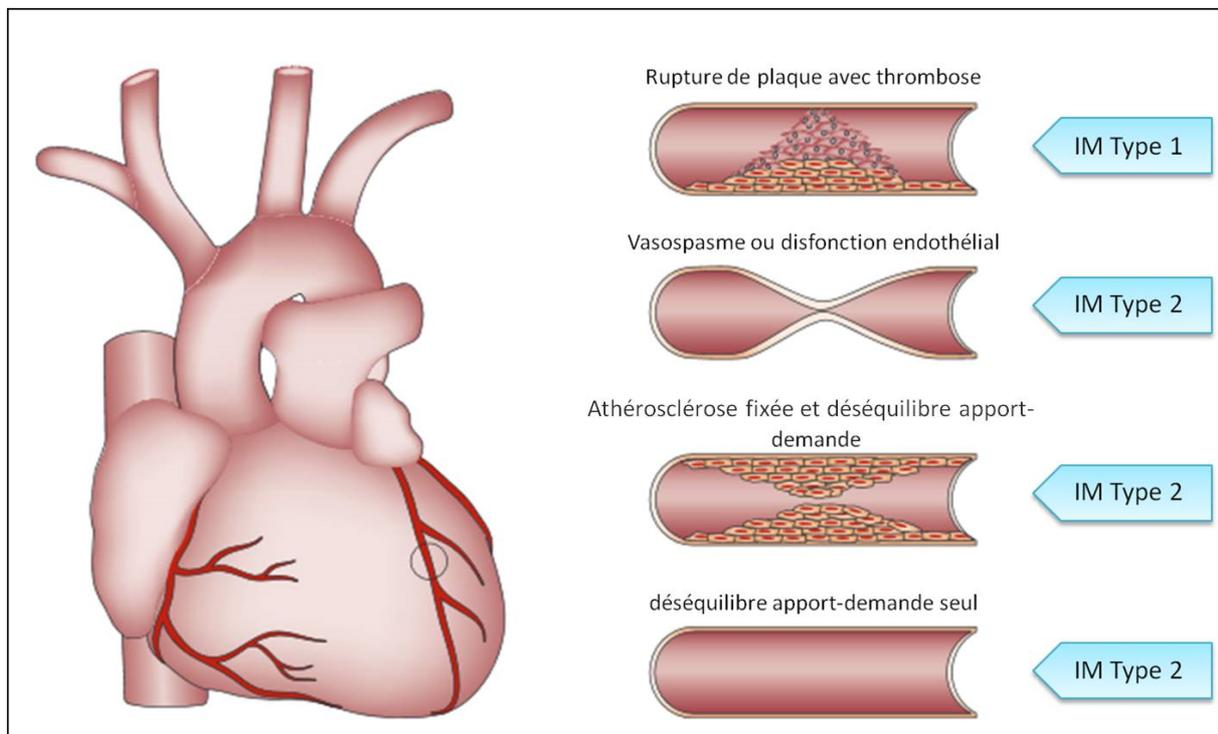


Figure 2 : Différences entre les IDM de type 1 et 2 selon l'état des artères coronaires (adapté de (20)).

L'IDM de type 1 correspond à la rupture de plaque tandis que les IDM de type 2 correspondent soit à une dysfonction endothéliale ou encore à un déséquilibre en apport d'oxygène due à une diminution du débit sanguin ou à une pathologie périphérique.

5.4 Mécanismes

Plusieurs mécanismes sont déterminants dans la mise en œuvre de l'IDM.

Au niveau des coronaires, l'occlusion partielle ou complète par rupture ou érosion de plaques représente environ 70% des IDM. Les plaques d'athérosclérose sont composées de cholestérol, calcium, de lipoprotéines ou encore de gras. Leur formation est principalement liée à une augmentation de l'apolipoprotéine Apo B, présente dans les LDL (Low Density Lipoprotein). Une hypercholestérolémie familiale, l'hypertension ou encore le diabète sont aussi des facteurs de risques importants (22). La rupture de cette plaque est la cause la plus fréquente de thrombose (23)

(Figure 2). Le thrombus va alors provoquer l'ischémie. Après cette occlusion, une reperfusion mécanique ou pharmacologique de la partie du cœur infarcté peut restaurer la zone hypoperfusée.

Les points cruciaux de la survie du myocarde sont la durée de l'ischémie, l'expansion de la zone infarcté, le statut hémodynamique durant cette ischémie et le niveau d'occlusion.

L'expansion de la zone infarcté est un phénomène central responsable du remodelage pathologique après un IDM. Une fois l'ischémie en place, la région infarcté cesse de contracter et est soumise à une pression hémodynamique importante par la partie saine du ventricule. Ce stress mécanique va induire une expansion de la taille de l'infarctus mais aussi de la périphérie encore perfusée de la zone infarcté (24). Il est donc nécessaire lors d'un IDM de procéder à une reperfusion efficace de la zone infarcté afin de limiter cette expansion.

5.5 Méthodes de reperfusion

Les méthodes de reperfusion de l'IDM dépendent principalement du délai de prise en charge du patient.

La méthode recommandée par l'ESC est l'angioplastie primaire coronarienne idéalement pratiquée dans les 90 à 120 minutes (20). Son taux de succès est actuellement de 95% (25). Cette intervention repose sur l'insertion d'un cathéter, muni d'une extrémité gonflable, dans la coronaire permettant après gonflement de redonner un diamètre normal à la coronaire en écrasant la plaque d'athérome. Cette angioplastie est complétée par la mise en place d'un stent, une prothèse métallique, afin d'offrir une résistance prolongée une fois le cathéter retiré.

La seconde méthode, appelée thrombolyse, est privilégiée en cas d'incertitude sur le temps d'accès aux centres d'angioplastie. La thrombolyse permet de dissoudre le thrombus par des agents pharmacologiques, comme l'héparine, en intraveineuse.

Enfin en cas d'échec de l'angioplastie, le pontage coronarien permet de contourner la coronaire en réalisant une dérivation par un autre vaisseau.

De façon paradoxale, ces méthodes de reperfusion essentielles pour la survie du myocarde ont un coût puisqu'elles peuvent elles-mêmes induire des lésions et une mort des cardiomyocytes (26).

Plusieurs types de lésions dues à la reperfusion sont répertoriées :

- les arythmies, que l'on peut prendre en charge par un traitement pharmacologique (β -Bloquant).
- une contraction altérée de la région, un phénomène réversible en quelques semaines.
- le « no-reflow » qui est un défaut de reperfusion de la microcirculation. Selon les études, il se produit dans 10 à 60% des cas après une reperfusion par angioplastie (25). Plusieurs facteurs sont impliqués comme le relargage de vasoconstricteurs ou de molécules inflammatoires (27).

Pour réduire l'impact de ces lésions, plusieurs approches de cardioprotection en amont ou en aval de la reperfusion ont été étudiées.

Le phénomène de post-conditionnement, le plus utilisé, est apparu en 2003 avec *Zhao et al.* qui ont démontré qu'une série de bref épisodes d'ischémie/reperfusion (I/R) sur une minute réduisait les effets cytotoxiques après la reperfusion chez la souris (28). Cet effet cardioprotecteur est diminué, quand la série de bref épisodes d'I/R se fait plus de 30 minutes après la première reperfusion de l'artère coronaire (29). Différentes approches de post-conditionnement pharmacologiques ont été testées, comme l'utilisation d'adénosine afin de prévenir le relargage par la mitochondrie de cytochrome c et donc de réduire la mort cellulaire (30). Malheureusement, il n'existe pas de preuves définitives de l'effet bénéfique sur l'homme (25).

5.6 Modèles d'études

In vitro, il existe très peu de modèles d'IDM. Le plus utilisé est la simulation d'ischémie reperfusion sur cardiomyocytes isolés de rats ou souris adultes (31). Cette ischémie simulée s'effectue soit par la mise en étuve à hypoxie soit par une modification du milieu de Krebs, classiquement utilisé pour la culture de cardiomyocytes. Ce modèle est idéal pour des études, biochimiques et de biologie moléculaire, des mécanismes cellulaires à l'aide de SiRNA, d'adénovirus ou encore de lentivirus codant pour des protéines d'intérêt.

In vivo, le modèle d'IC induit par un infarctus expérimental consiste en la ligature chirurgicale de l'artère coronaire gauche afin de produire un IDM. Après l'infarctus, la zone du myocarde non atteinte s'hypertrophie et la région péri-infarctie développe de la nécrose, de l'inflammation et de la fibrose conduisant progressivement à l'IC. Dans ce modèle, il est nécessaire de démontrer l'équivalence de la taille de la zone infarctie entre les différents animaux pour pouvoir comparer le remodelage cardiaque dans chaque groupe d'intérêt. En effet, le degré du remodelage du VG est directement proportionnel à la taille de l'infarctus (32). Le couplage de ces modèles d'étude de l'IC, avec la modification de l'expression d'un gène ou avec l'administration d'une molécule pour mieux comprendre la physiopathologie de l'IC. Ce modèle se rapproche le plus des observations cliniques (32, 33). A noter qu'il existe aussi un modèle d'ischémie reperfusion (I/R) *in vivo*, développé pour la première fois par *Michael et al.* en 1995, reposant sur la reperfusion après un temps donné d'ischémie (34). Ce modèle permet d'étudier les effets des lésions liées à l'I/R comme la nécrose des tissus ou les effets cardioprotecteurs de cette dernière (29).

II. Remodelage du myocarde post-IDM

Le processus de remodelage est le point culminant d'une série d'évènements transcriptionnels, structurels, électrophysiologiques et fonctionnels au niveau du cardiomyocyte. Ceci inclut une perte des cardiomyocytes suite à différents processus de mort cellulaire ou encore une hypertrophie des cardiomyocytes en réponse à l'activation neuro-hormonale. Des changements métaboliques comme l'insulino-résistance ou la lipotoxicité peuvent s'ajouter. Enfin, d'autres types cellulaires peuvent être impliqués comme les fibroblastes qui provoquent la fibrose.

Tout ce qui est connu du remodelage post-IDM est dérivé d'observation de cas clinique de patients et de modèles animaux d'IDM (35). Ce phénomène a été séparé en différentes étapes (36).

Il existe plusieurs phases de réparation du cœur régulées par une série d'évènements complexe (Figure 3). Ce remodelage peut être séparé en deux grandes phases : La phase **inflammatoire** et la phase **compensatrice** (37). La phase inflammatoire regroupe la mort des cardiomyocytes provoquée par l'ischémie et l'inflammation avec l'infiltration de cellules immunitaires. La phase compensatrice ou proliférative regroupe la résolution de l'inflammation mais surtout la fibrose et la revascularisation complétant ainsi un remodelage fonctionnel du cœur.

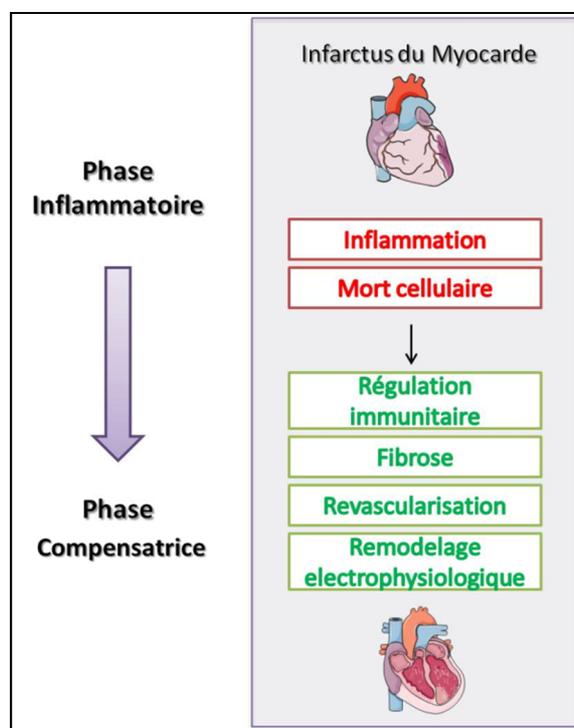


Figure 3 : Le remodelage post-IDM (Adapté de (37))

Après un IDM, la lésion du tissu et la nécrose initient la phase inflammatoire, consistant au recrutement de différentes cellules immunitaires. Après 4 jours, il y a une transition vers une phase compensatrice avec une résolution de l'inflammation, une prolifération de myofibroblastes, un dépôt de collagène, une revascularisation et la formation d'une cicatrice.

1/ La mort cellulaire

La première étape du remodelage commence avec l'ischémie et survient avec la mort des cardiomyocytes. Cette dernière peut être de type apoptotique (38), nécrotique (39) ou autophagique (40). La mort cellulaire a longtemps été considérée comme un processus non régulé. Dans les années 1980, *Horvitz et al.* (41) ont découvert, par une série d'analyses génétiques sur le nématode, un réseau de gènes régulant la mort programmée des cellules durant le développement. Dès lors de nombreuses études sont apparues sur ce processus appelé apoptose. Durant les dix dernières années, les attentions se sont portées sur les morts non apoptotiques comme l'autophagie et la nécrose.

De nombreux débats autour des éléments constituant la mort cellulaire ont débouché sur une classification établie par *Kroemer et al.* (42). Les paramètres indiquant une mort cellulaire certaine sont la perte de l'intégrité de la membrane plasmique, la fragmentation cellulaire et la phagocytose par les cellules voisines. La mort cellulaire est un processus réversible jusqu'à une phase appelée point de non-retour. Cette étape peut-être caractérisée par une activation massive des caspases, une perte du potentiel mitochondrial, une perméabilisation complète de ce dernier ou encore une exposition aux résidus de phosphatidylserine (PS) qui émettent des signaux « *mange moi* » pour les cellules voisines normales.

1.1 L'apoptose

L'expression apoptose est née pour décrire un changement morphologique de la cellule. Ce phénomène est accompagné d'un arrondissement de la cellule, d'une réduction du volume cellulaire, d'une condensation de la chromatine et d'une fragmentation nucléaire. Le terme apoptose ne s'applique donc exclusivement qu'à des morts cellulaires manifestant ces changements morphologiques. Dans un cœur humain sain, il n'existe qu'un cardiomyocyte sur 10 000 positif au test classique TUNEL. Ce nombre est multiplié par 100 en cas d'ischémie ou d'IC.

Du point de vue biochimique, l'apoptose est régulée par deux voies distinctes (Figure 4). La voie extrinsèque qui utilise les récepteurs de surface et la voie intrinsèque qui implique la mitochondrie et le RS (43). La finalité de ces voies repose sur l'activation de caspases, synthétisées sous forme de procaspases inactives, qui sont des cystéines protéases hydrolysant les peptides après les acides aspartiques (44). Elles sont organisées en catégories, les procaspases 2-8-9-10 qui sont activées, par autoclivage, quand elles se dimérisent et les procaspases 3-6-7 dites effectrices clivées par les premières procaspases (45).

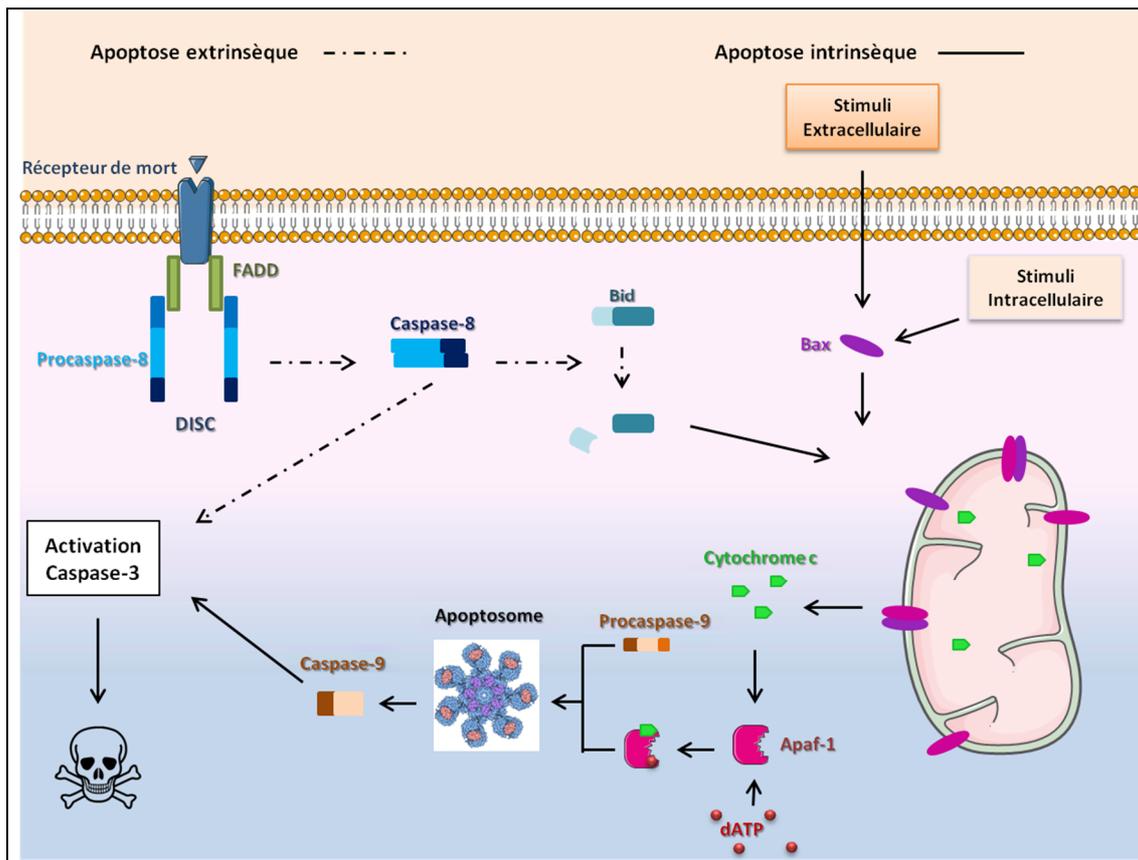


Figure 4 : Les voies de signalisation de l'apoptose (adapté de (43))

L'apoptose est médiée par la voie extrinsèque impliquant les récepteurs de mort et la voie intrinsèque mettant en jeu la mitochondrie. L'apoptose extrinsèque est activée par la liaison du ligand de mort à son récepteur, ce qui forme un complexe appelé DISC (Death induce signaling complex). La caspase-8 est ainsi activée par proximité avec le DISC et va ainsi cliver les procaspases en amont. La caspase-8 est également capable de cliver le domaine BH3 de la protéine Bid, dont la fonction carboxyl va se transloquer à la mitochondrie pour activer l'apoptose intrinsèque mitochondriale. Cette apoptose est activée par plusieurs stimuli chimiques, biologiques et physiques transduit à la mitochondrie et au réticulum endoplasmique par les protéines proapoptotiques Bcl-2 : les protéines BH3 et Bax. Ces signaux permettent le relargage de molécules apoptogènes comme le cytochrome c de la mitochondrie. Avec Apaf-1, le cytochrome c va former un complexe protéique appelé l'apoptosome qui permet l'activation de la procaspase-9 et donc le clivage des procaspases en amont.

a/ Apoptose Extrinsèque

L'apoptose extrinsèque est une apoptose induite par des signaux de stress extracellulaires qui sont médiés par des récepteurs transmembranaires spécifiques (46). Ces ligands létaux, de la famille du TNF, comme le FAS ligand (FASL), TNF α et TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand) se lient à différents récepteurs de morts correspondants, de la famille du TNFR comme le FAS, le TNF α récepteur 1 (TNRF1) ou le TRAIL récepteur 1 ou 2 (TRAILR1-2) (Figure 4).

L'initiation classique de ces voies se réalise par la liaison de molécules solubles homotrimeriques de la famille du TNF qui vont stabiliser les trois sous-unités du récepteur de la famille TNF-R. Cette trimérisation du récepteur s'amorce avant la liaison du ligand grâce à des domaines présents sur chaque monomère appelés PLAD (Pré-Ligand assembly domains) (47). Cette activation va permettre

l'assemblage d'un complexe protéique dynamique sur les domaines de mort (DD ou Death Domain) présents sur la queue cytoplasmique du TNFR (48). La première protéine recrutée est une molécule adaptatrice appelée TRADD (TNFR associated DD) caractérisée par *Hsu et al.* (49). TRADD va permettre le recrutement de RIP1 (Receptor interacting protein kinase 1), FADD (FAS protein with a DD) et le TRAF2 (TNFR associated factor 2) sur le complexe. Vient alors s'ajouter, plusieurs isoformes de c-FLIP, les cIAPs (cellular inhibitor of apoptosis proteins) et la procaspase-8. Ce complexe supramoléculaire, appelé DISC pour « Death-inducing signaling complex », régule l'activation de la caspase 8. Il faut noter qu'en fonction du récepteur le complexe comprend certaines protéines en plus ou en moins, comme pour le FAS qui ne contient pas TRADD qui est remplacé par le seul FADD. Ces complexes peuvent induire l'apoptose mais aussi dans certains cas d'autres voies de survies cellulaires. C'est le cas pour RIP1, qui polyubiquitinylé par cIAPs, va permettre le recrutement du TGFβ-activated kinase 1 (TAK1) et des TAK1-binding protein 2-3 (TAB2 et TAB3), qui ensemble vont activer le facteur de transcription NFκB, responsable de la prolifération cellulaire entre autres (50).

b/ Apoptose intrinsèque

Au contraire de l'apoptose extrinsèque, ce type d'apoptose est induit par de très nombreux *stimuli* apoptotiques comme l'hypoxie, le stress oxydatif, un stress nutritif, des dommages à l'ADN, des toxines ou encore une dérégulation des facteurs de survie. Ces *stimuli* convergent vers la mitochondrie afin d'initier la libération de protéines apoptogènes.

Les signaux de mort sont transmis par deux protéines de la famille Bcl-2 : Bax (Bcl-2-associated X protein) et Bak (BH3-only protein). Tandis que Bax est transloqué à la membrane mitochondriale, Bak est ancrée en permanence à la membrane. La façon dont Bax et Bak perméabilisent la membrane extérieure de la mitochondrie n'est pas encore connue. Cette perméabilisation permet la libération de plusieurs molécules apoptogènes dans le cytoplasme. Par exemple, le cytochrome c, élément du transport d'électron de la chaîne oxydative, se lie à Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1). Cette liaison induit un changement de conformation d'Apaf-1 aboutissant à son oligomérisation et au recrutement de la procaspase 9 pour former un heptamère appelé apoptosome (51). La procaspase 9 va ainsi s'autoactiver et cliver les caspases suivantes (Figure 4).

1.2 La nécrose

a/ définition

La nécrose est caractérisée par un gonflement des organites et une rupture de la membrane plasmique, libérant dans le milieu environnant le contenu cellulaire, ce qui déclenche une réaction inflammatoire. La mort des cardiomyocytes par nécrose serait induite par des perturbations de

l'homéostasie calcique. En effet, il a été montré qu'une augmentation de la concentration calcique intracellulaire était capable d'altérer le fonctionnement des mitochondries, d'induire leur dépolarisation et d'activer la nécrose conduisant à l'IC (39).

La nécrose a longtemps été considérée comme une mort cellulaire non régulée, mais plusieurs études ont démontré qu'elle pouvait finalement être régulée par une voie de signalisation (52). On ne connaît pas précisément la part de régulé *versus* non régulé mais il est clairement établi que la nécrose régulée est impliquée dans l'IDM et l'IC.

Trois formes de nécroses régulées ont été identifiées indépendamment : la nécrose due à une ouverture prolongée du pore de transition de perméabilité mitochondriale (MPTP), la nécroptose impliquant RIP1 et RIP 3 et une forme impliquant l'hyperactivation de la poly ADP-ribose polymérase (PARP) induite par des dommages à l'ADN (53).

Nous discuterons principalement des deux premières formes, impliquées dans l'IC, et du mécanisme commun établi par *Karch* et *Molkentin* (54).

b/ Mécanismes

Durant la nécrose une ouverture prolongée du MPTP entraîne une dysfonction mitochondriale, caractérisée par une dépolarisation de la membrane interne de la mitochondrie, la perte de la production d'ATP, un mouvement des organelles et une production de ROS (55). Cette ouverture, responsable de l'apoptose intrinsèque, permet la libération de cytochrome c et la formation de l'apoptosome. Cependant l'ouverture prolongée et la perte de la synthèse d'ATP empêche l'activation des caspases et la formation de l'apoptosome ce qui entraîne la nécrose (56). La quantité de cytochrome c libérée lors du phénomène de perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie est primordiale. La première molécule responsable de la régulation de la mort est la cyclophyline D (CypD), une peptidyl-prolyl isomérase, qui contrôle l'ouverture du MPTP à l'intérieur de la mitochondrie. Une inhibition de la CypD empêche l'ouverture du MPTP après une ischémie. Ce phénomène est aussi régulé par Bax et Bak, comme présenté plus haut, et permet le maintien de l'activité normale de la mitochondrie en condition normale. Un double KO de Bax et Bak dans des cardiomyocytes empêche l'ouverture de la partie située sur la membrane externe mitochondriale du MPTP (43).

La deuxième voie, aussi appelée nécroptose est liée à la stimulation d'un des récepteurs de mort et à l'inhibition dans le même temps d'une caspase. Par exemple, la mort par nécrose induite par le TNF α dans des cellules L929 est fortement augmentée en présence d'inhibiteur de caspases (57). Les kinases RIP 1 et RIP 3 sont des éléments importants du complexe initié avec la stimulation du récepteur de mort, facilitant la mort par nécroptose. En condition classique la caspase 8 vient inactiver par clivage RIP 1. En revanche quand la caspase 8 est inhibée ou délétée dans une souris, le

clivage n'a pas lieu et RIP1 peut aller interagir avec RIP3 pour initier la nécroptose (58). L'inhibiteur le plus connu de la nécrose, la nécrostatine 1, empêche cette interaction entre RIP1 et RIP3. L'effecteur direct de ce complexe est la MLKL (Mixed lineage kinase like), kinase qui, une fois phosphorylée, induit la nécrose notamment en produisant des pores dans la membrane plasmique (59). Récemment deux équipes distinctes ont montré que Bax et Bak étaient requis pour la nécroptose (54). En effet, un KO de Bax et Bak empêche la mort par nécroptose. L'implication de la mitochondrie et du MPTP dans la nécrose a aussi été démontré lorsque la délétion du gène Ppif, codant pour CypD, a rendu partiellement les cellules résistantes à la stimulation par le TNF α et à l'inhibition des caspases (60).

On peut donc envisager une nécrose régulée unique (Figure 5).

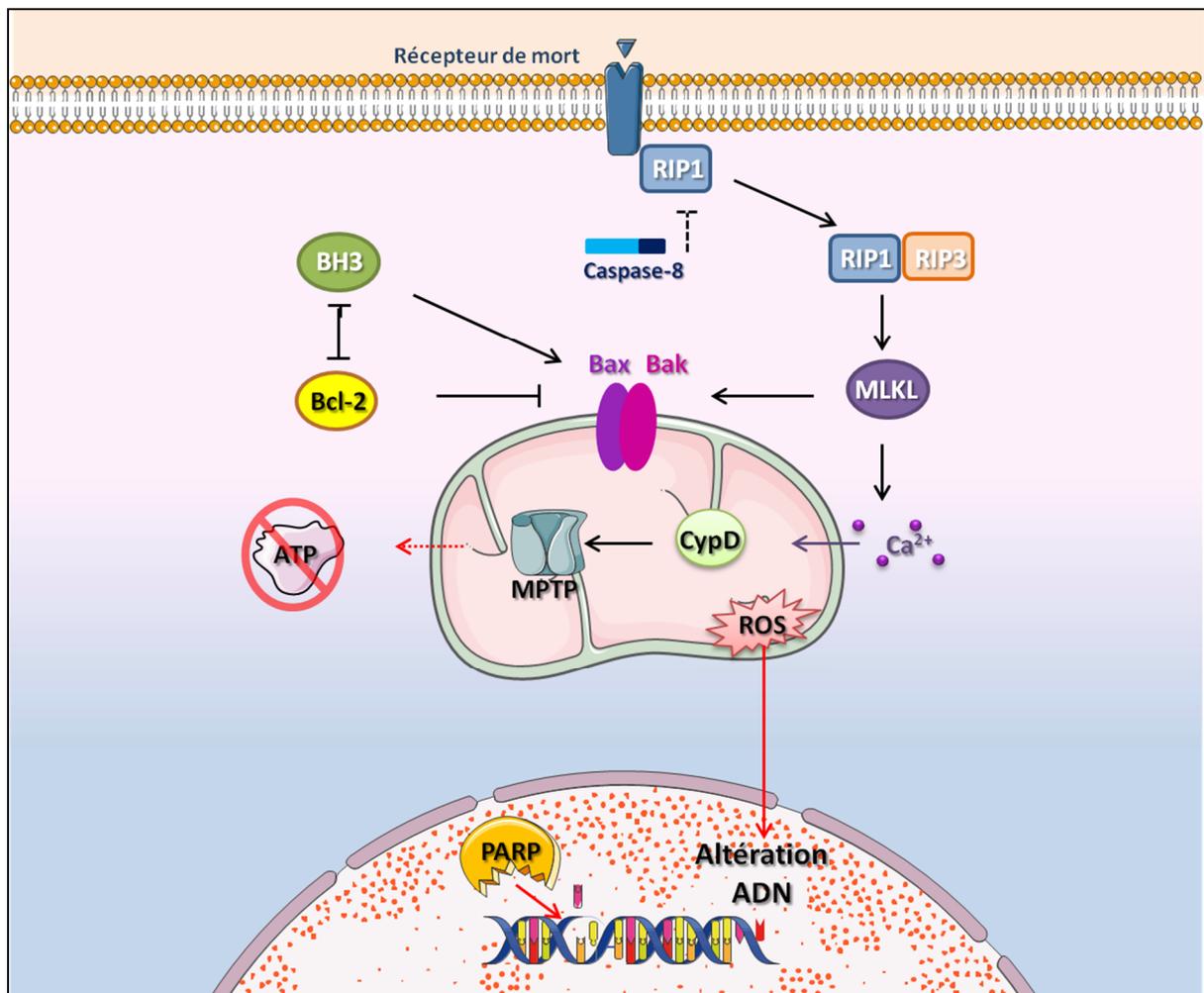


Figure 5 : La nécrose (adapté de (55))

Dans toutes les formes de nécrose la déplétion d'énergie associée à l'ouverture du pore transitoire de transition de perméabilité mitochondriale (MPTP) est centrale. La voie extrinsèque de la nécrose implique les récepteurs de mort cellulaire et les RIP kinases stimulés par l'inhibition des caspases. La voie intrinsèque inclut des senseurs de stress qui augmentent la concentration de calcium, induisant une dysfonction du MPTP et une dégradation de l'ADN menant à la suractivation de PARP. Tous les mécanismes entraînent une diminution d'ATP dans la cellule et la rupture de la mitochondrie ce qui entraîne une perte de l'intégrité membranaire et donc la nécrose.

1.3 L'autophagie

L'autophagie joue un rôle essentiel dans le cœur sain en maintenant l'homéostasie cellulaire. L'ablation d'Atg5, une protéine clé du processus, provoque l'augmentation de protéines ubiquitinylées, des mauvais alignements et des dommages dans la structure mitochondriale le tout induisant des dysfonctions contractiles (61). Durant une ischémie ou un IDM l'autophagie est augmentée et participe à l'effet bénéfique durant la phase compensée de l'IC.

L'autophagie est caractérisée par la séquestration du matériel cytoplasmique à l'aide d'autophagosomes suivie d'une dégradation par les lysosomes. Cette mort cellulaire est définie morphologiquement par une vacuolisation massive dans le cytoplasme et par l'absence de condensation de la chromatine. Il existe trois voies autophagiques qui diffèrent par le mécanisme d'entrée du matériel cytoplasmique dans le lysosome (62). Dans la microautophagie, les macromolécules cytoplasmiques sont directement englobées dans des invaginations de la membrane lysosomale. Dans l'autophagie dépendante des chaperonnes, les protéines chaperonnes Hsc70 (heat-shock cognate protein 70) prennent en charge les macromolécules possédant le pentapeptide KFERQ et permettent leur translocation à travers la membrane lysosomale. Elle concerne environ 30% des protéines cytoplasmiques. Enfin, la macroautophagie se caractérise par la formation d'un phagophore ou double membrane lipidique qui englobe une portion du cytoplasme pour former une vésicule appelée autophagosome qui fusionnera avec le lysosome. La macroautophagie est la forme d'autophagie la plus présente chez les mammifères, la plus largement étudiée et la mieux comprise.

1.4 Nécrose et apoptose au cours de l'IDM et de l'IC

a/ apoptose

Les apoptoses extrinsèque et intrinsèque sont impliquées dans l'IDM et dans l'IC.

Lors d'un IDM, une souris KO Fas montre une réduction de la zone infarctée comparé aux souris contrôles (non KO) (63). En plus de Fas, la voie extrinsèque implique le TNF. Il est intéressant de constater que la délétion du TNFR1 ou du TNFR2 n'affecte pas la taille de l'infarctus tandis que la délétion des deux augmente de façon significative la taille de la zone infarctée en réponse à une ischémie/reperfusion. Les auteurs suggèrent un rôle opposé avec un effet protecteur du TNFR2 qui reste à démontrer (64).

L'apoptose intrinsèque joue un rôle primordial lors de l'IDM. Une surexpression cardiaque spécifique de Bcl2, protéine anti-apoptotique, réduit la taille de l'infarctus, l'apoptose et la dysfonction cardiaque après une ischémie/reperfusion (65). De la même façon, la délétion du multidomaine pro-apoptotique Bax réduit la taille de la zone infarctée et la dysfonction suggérant que Bax et Bak sont des molécules clés (66).

Au contraire de l'IDM, processus durant lequel de nombreux cardiomyocytes meurent par apoptose sur une courte période, les cœurs insuffisants montrent une augmentation modérée de l'apoptose. Comme discuté plus haut, le taux de cardiomyocytes en apoptose passe de 0.001-0.002% dans des myocardes sains à 0.08-0.25% dans des cœurs insuffisants. La question du rôle de l'apoptose lors de l'IC se pose alors compte tenu du faible nombre de cardiomyocytes, en nombre absolu, en apoptose. *Wencker D.* (67) et ses collaborateurs ont répondu à cette question en utilisant une souris transgénique, dont l'expression de la caspase 8 était modifiée spécifiquement dans le cœur, permettant d'avoir un taux d'apoptose de 0.023% dans le cœur de souris. Ces animaux ont développé une cardiomyopathie sévère en 8 semaines et sont mortes en 2 à 6 mois. De plus, les anomalies fonctionnelles et structurelles du cœur de ces souris sont annulées par l'ajout d'un inhibiteur de caspase prouvant qu'un faible taux d'apoptose peut induire une IC.

b/ nécrose

La connexion la plus connue entre nécrose et IDM est l'ouverture du MPTP. Comme abordé plus haut, l'ischémie entraîne une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire et un stress oxydatif prolongé ce qui provoque l'ouverture du MPTP. Les cellules sans CypD, facteur essentiel de l'ouverture du MPTP, sont résistantes à la mort induite par ces deux stress tout en restant sensibles aux *stimuli* de l'apoptose. De la même façon, les souris KO de la CypD ont une diminution de la zone infarctée après une ischémie/reperfusion (68). Ces deux études démontrent l'importance de CypD et du MPTP dans le processus de nécrose lors de l'IDM. Le lien avec RIP1 et RIP3 lors de l'IDM est peu caractérisé. On sait cependant que la nécrostatine-1, molécule inhibitrice de l'activité de RIP1, réduit la taille de l'infarctus après une ischémie/reperfusion (69). De façon surprenante, la nécrostatine-1 n'a aucun effet sur la zone infarctée dans des souris KO pour CypD. Il existe donc une connexion entre RIP1 et CypD. *Zhang DW* (58) et ses collaborateurs identifient RIP3 comme l'acteur clé de ce processus notamment via la génération de ROS.

2/ L'inflammation

Les cardiomyocytes engagés dans un processus de mort relarguent des protéines intracellulaires dans la circulation ce qui provoque une inflammation. Ces molécules de danger appelées DAMPs (Danger associated molecular patterns) vont être reconnues par les leucocytes et ainsi induire une cascade de médiateurs de l'inflammation tels que les chemokines et les cytokines. Les mécanismes d'actions de ces DAMPs sont assez bien caractérisés et impliquent principalement les récepteurs TLR (toll like receptor) induisant une activation de la voie de signalisation des MAPK conduisant à une expression de gènes pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou encore les chemokines CC, attirant les

monocytes et les lymphocytes T. De plus durant l'ischémie l'hypoxie perturbe la fonction de barrière cellulaire des cellules endothéliales vasculaires permettant ainsi l'infiltration de leucocytes (70).

L'initiation de la phase compensatrice débute avec la résolution de l'inflammation. La libération de trois types de médiateurs par les neutrophiles en apoptose ou par les cardiomyocytes va permettre le remodelage fonctionnel post-IDM :

- L'interleukin-10 (IL-10), dont l'expression est augmentée après un IDM, supprime l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages (71).
- Plusieurs membres de la famille des TGF- β sont impliqués dans la régulation négative de l'inflammation
- Et enfin les médiateurs lipidiques tels que la résolvine ont un rôle important dans la résolution de l'infiltration des leucocytes après IDM.

Une dérégulation d'un de ces acteurs anti-inflammatoire peut entraîner un remodelage pathologique. Enfin il faut noter que les cardiomyocytes éliminés sont remplacés par du tissu fibrotique cicatriciel, ce qui contribue au remodelage (37).

3/ La fibrose

La phase réparatrice est caractérisée par une modification de la matrice extracellulaire (MEC) et une prolifération de fibroblastes remplaçant les cardiomyocytes morts.

La MEC joue un rôle essentiel dans le maintien de la géométrie et de la structure du myocarde. Les fibroblastes cardiaques, qui représentent 25% des cellules non myocytaires, sécrètent la majorité des composants de la MEC tels que les fibres de collagène de type I, III et IV, la laminine et la fibronectine (72). Les collagènes de type I, associés aux filaments épais responsables du support structurel et de la force de tension, et ceux de type III, qui forment un fin réseau de fibres, représentent 90% du collagène total du cœur. Les cellules fibroblastiques sécrètent également des enzymes, des cytokines et des facteurs de croissance et sont responsables de l'intégrité de la MEC en régulant la synthèse et la dégradation de collagène. La synthèse de collagène est induite par des facteurs de croissance pro-fibrotiques tels que le TGF- β et sa dégradation effectuée par les métalloprotéinases (MMPs), enzymes capables de couper les liaisons peptidiques (73).

La fibrose cardiaque, caractérisée par un dépôt excessif de collagène et de plusieurs composants de la MEC dans le tissu interstitiel et dans la région péri-vasculaire du myocarde, est un marqueur important de l'IC (74). Il faut distinguer l'augmentation de collagène adaptative mise en place par le cœur pour contrer l'excès de tension, du dépôt excessif d'une fibrose participant à la détérioration de la fonction cardiaque (75). La transition du dépôt de collagène adaptatif vers la fibrose

pathologique serait liée à l'intensité du stress et à la sécrétion de FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2), de TGF- β et d'hormones comme l'Endothéline 1, l'Angiotensine II et les catécholamines (76).

La transformation de fibroblastes en myofibroblastes, qui ne sont pas retrouvés dans un cœur sain, joue un rôle critique dans le développement de la fibrose. L' α -SMA (α -Smooth Muscle Actin) est un marqueur de la transformation des fibroblastes en myofibroblastes, puisque seuls les myofibroblastes l'expriment. Au niveau de la signalisation, la prolifération et la différenciation des fibroblastes peut se faire par la voie de signalisation de Smad ou de façon indépendante par la voie des MAPKs et notamment p38 que nous détaillerons plus tard dans ce manuscrit (76). L'ischémie, la tension mécanique, les cytokines induisent la transformation en myofibroblastes lors de l'IC (77). Ainsi après un IDM, la fonction des fibroblastes est perturbée et induit notamment, une augmentation de leur prolifération et de leur migration, de leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de la synthèse de collagène et de son dépôt dans la MEC.

Ainsi, l'application d'un stress mécanique chronique sur le myocarde induit l'apparition de fibrose qui affecte sa rigidité, perturbe l'hétérogénéité et la conductance électrique du cœur. La fibrose aggrave donc la dysfonction systolique et perturbe la relaxation diastolique, favorisant la survenue d'arythmies (76).

4/ Remodelage électrophysiologique

Le remodelage électrophysiologique est caractérisé par un allongement de la durée du PA. Ce remodelage électrique comprend une altération des nombreux canaux ioniques, impliqués dans le système excitation-contraction, ainsi qu'une altération des jonctions intercellulaires. Une modification du CICR, notamment au niveau du relargage du Ca^{2+} via le RYR ou de la recaptation par la SERCA2a, est un marqueur récurrent de l'altération du couplage excitation-contraction. Elle induit une diminution de la force contractile et une augmentation des troubles du rythme. Les jonctions intercellulaires (ou jonction gap) sont composés de connexines (connexine 43) et responsables de la circulation des ions et des petites molécules entre les cellules. Lors de ce remodelage électrophysiologique, on observe une diminution de la connexine 43 entraînant une diminution de la vélocité et une altération de la repolarisation.

Il est important de noter que ce remodelage n'est pas limité aux myocytes du ventricule et que les cellules de Purkinje, réseau de fibres situé à la surface de l'endocarde et spécialisées dans la conduction du signal électrique, joue un rôle important dans la génération d'arythmies ventriculaires (78).

5/ Mécanismes cellulaire du remodelage

Les pathologies impliquées dans l'IC provoquent une dérégulation de plusieurs systèmes neuro-hormonaux (stimulation du système nerveux adrénergique, système rénine-angiotensine,...) et une exposition chronique aux radicaux libres qui conduisent à l'oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides. Le processus biologique du remodelage myocardique associe quatre phénomènes simultanés. Les changements structurels hypertrophiques ventriculaires sont associés au processus adaptatif d'origine mécanique, à la fibrose et à la mort cellulaire. Ces événements conduisent au dysfonctionnement contractile et finalement à l'IC (79).

L'un des enjeux majeurs en cardiologie est de comprendre les mécanismes cellulaires qui interviennent dans la transition entre l'hypertrophie myocardique compensatrice et l'IC congestive décompensée.

Dans ce cadre, mes travaux antérieurs se sont intéressés depuis plusieurs années à la signalisation intracellulaire activée par les récepteurs β -adrénergiques et a mis en évidence une nouvelle famille de protéine directement activée par l'AMPc, appelée Epac (Protéine d'échange directement activée par l'AMPc). Elle est associée à l'hypertrophie cardiaque qui peut être considérée comme un phénomène adaptatif soit pour compenser la perte massive de cardiomyocytes après un IDM soit en réponse à une surcharge de pression (80), (81). Cependant, lorsque l'hypertrophie des cardiomyocytes atteint ses limites, un nombre important de ces cardiomyocytes entrent en apoptose. Le phénomène de mort des cardiomyocytes est un événement majeur dans cette transition. En effet, ces myocytes adultes détruits à l'occasion d'une quelconque agression ne sont pas remplacés.

L'événement le plus significatif après un IDM est le remodelage du ventricule gauche (VG). Ce remodelage cardiaque provoque des changements structurels de la paroi du VG qui conduisent à un dysfonctionnement contractile et finalement à l'IC (79). Les mécanismes fondamentaux mis en jeu au cours du remodelage ventriculaire sont multifactoriels. Un certain nombre de réponses biologiques interviennent au cours du remodelage après un épisode ischémique (82). Parmi les systèmes de transduction du signal les plus conservés dans le cœur, on retrouve les cascades de phosphorylation des MAPKs. La famille des MAPKs est composée de 3 types de kinases, p38 MAPK, ERK (extracellular signal-regulated protein kinase), et JNK (c-jun protein kinase N-terminal) (83).

Les MAPKs sont des sérines/thréonines kinases qui forment des réseaux complexes de signalisation qui peuvent être induits en cascade par un large éventail de stimuli externes. Elles régulent un certain nombre de processus cellulaires critiques dans le cœur, comme la croissance, la division, la différenciation et la survie cellulaires à travers la régulation de l'expression génique des cellules cardiaques (83).

III. Les MAPKs

1/ Généralités

Les MAPKs (Mitogen-activated protein kinase) constituent une famille de sérine/thréonine kinases conservées, impliquées dans de nombreux processus cellulaires comme la croissance, la prolifération, la survie, l'apoptose ou encore le métabolisme (83). Les MAPKs sont le résultat d'une cascade de phosphorylations impliquant en premier lieu les MEK kinases (MAPKKK), qui vont phosphoryler les MAPKKs pour arriver aux MAPKs (84). Il existe quatre grandes familles de MAPKs : les kinases régulées par des signaux extracellulaires (ERK1/2), les c-Jun NH2-terminal kinases (JNKs), les kinases p38 et la grosse MAPK (ERK5) (Figure 6). Dans les cardiomyocytes, les voies de signalisation des MAPKs peuvent être activées par les RCPGs, les récepteurs tyrosine kinase, les canaux ioniques ou encore les cytokines. Ici, nous détaillerons principalement les kinases p38 impliquées dans l'inflammation et les processus de mort cellulaires au cours de l'IC.

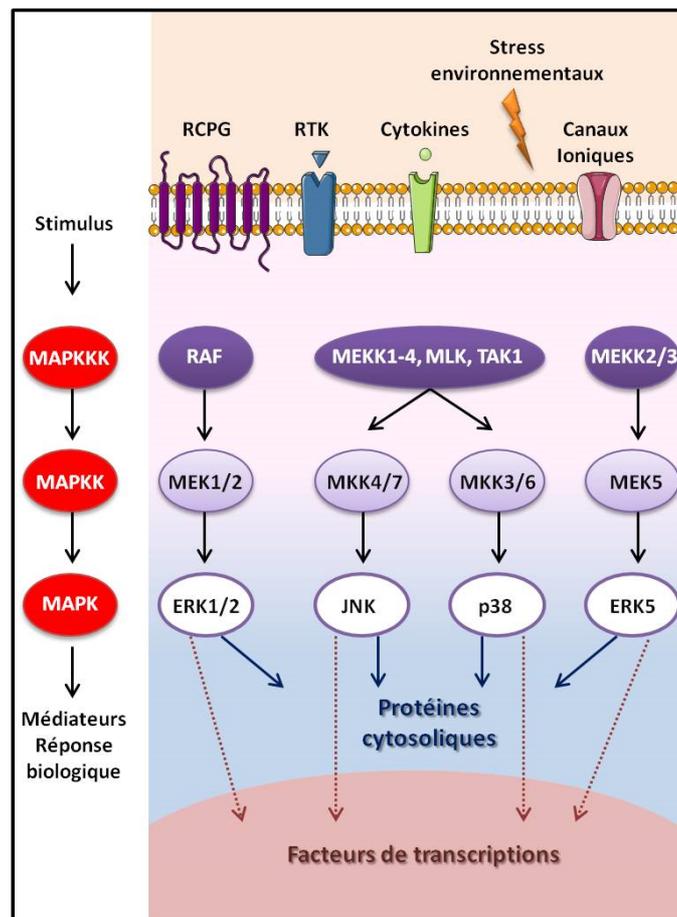


Figure 6 : Les MAPKs (adapté de (84))

Les MAPKs sont activés en cascade par trois phosphorylations consécutives. C'est le mode d'activation dit « canonique ». On retrouve ici les MAPKKKs les plus connus pour leur MAPKKs et MAPKs respectives.

2/ ERK1/2

Dans le cœur la forme la plus abondante de kinases régulées par des signaux extracellulaires est ERK1. La voie de signalisation de ERK peut être activée par les RCPGs, les RTKs ou encore les canaux calciques. Cependant la voie principale d'activation implique la petite protéine G Ras, la MAPKKK Raf, la MAPKK MEK et ERK1/2. La petite protéine G Ras est une protéine de 20 kDa qui lie le nucléotide GDP/GTP et possédant une activité GTPasique intrinsèque lui permettant d'hydrolyser le GTP. Elle est ainsi également appelée GTPase ou interrupteur moléculaire.

L'activation de ERK 1/2 augmente l'expression de c-fos et de l' α -skeletal actin, deux protéines impliquées dans l'HC. De plus, chez la souris, la surexpression de la forme constitutivement active de MEK1 sous le contrôle du promoteur α -MHC induit une HC concentrique compensée accompagnée d'une augmentation de la fonction contractile (85).

Chez la souris, l'inhibition complète de l'activité de ERK1/2 par la surexpression de DUSP6 (Dual-specificity phosphatase), une phosphatase inhibitrice de ERK1/2, ne réduit pas la capacité du cœur à s'hypertrophier après une surcharge de pression, l'infusion d'ISO/d'AngII ou l'exercice physique. Ces souris passent même plus rapidement en phase de décompensation et montrent une augmentation de l'apoptose dans le tissu cardiaque (86). Il semble donc que la voie ERK1/2 puisse ne pas être requise pour la mise en place de l'HC physiologique ou pathologique mais qu'elle joue un rôle protecteur en réponse à des *stimuli* pathologiques (87).

3/ JNKs

Découvertes dans les années 90, les c-Jun NH2-terminal kinases sont codées par trois gènes différents JNK1, JNK2 et JNK3. Tandis que les protéines JNK1 et JNK2 sont ubiquitaires, l'expression de JNK3 est restreinte au cœur, au cerveau et aux gonades (88).

L'activation de la voie JNK se fait principalement par les cytokines et différents stress cellulaires tels que l'exposition aux UV, le choc thermique, l'ischémie, les dommages à l'ADN ou le stress du RE. Les MAPKKK impliquées en amont sont MEKK1, MEKK2 et MEKK3 qui vont phosphoryler MKK4 et MKK7 directement responsables de l'activation de JNK.

Comme ERK, JNK joue un rôle important dans divers processus biologiques comme la prolifération cellulaire, l'apoptose, la survie et la mobilité cellulaire, le métabolisme et la production de cytokines. De plus, elle est impliquée dans la régulation de l'insuline, la réponse immunitaire et l'inflammation, l'obésité, le diabète, le cancer et les cardiopathies.

Depuis l'observation originale prouvant que l'activité de JNK est augmentée dans le myocarde stressé, en condition ischémique et de surpression, différentes études se sont concentrées sur son rôle dans l'hypertrophie, le remodelage et la régulation de la mort cellulaire.

En tant que voie de signalisation induite par un stress, JNK a un rôle à la fois protecteur et pathologique dans plusieurs types cellulaires. Les cardiomyocytes n'échappent pas à cette ambiguïté. L'utilisation d'inhibiteurs sélectifs de JNK a mis en évidence un rôle important dans l'apoptose des myocytes après ischémie (89). Au contraire, plusieurs études démontrent un rôle important de JNK dans la survie des myocytes après une hypoxie, notamment en ciblant AKT, protéine impliquée dans la survie cellulaire (90).

4/ ERK5

ERK5, est la voie la plus récemment identifiée. Son activation implique MEKK2 ou MEKK3 au niveau des MAPKKs, et MEK5 au niveau des MAPKKs.

ERK5 est stimulée principalement par les facteurs de croissance et de stress. Elle est impliquée dans la survie neuronale, l'athérosclérose, les cancers du sein et de la prostate. Chez la souris, une délétion globale d'ERK5 est responsable de différentes pathologies cardiovasculaires entraînant la mort à l'état embryonnaire (91). Cependant, une inactivation ciblée d'ERK5 au niveau des cardiomyocytes n'entraîne pas de pathologie lors du développement, suggérant que la létalité du KO global est due à un problème vasculaire (92).

5/ Les kinases p38

5.1 Structure et distribution

Les protéines p38 sont des kinases thréonine/sérine activées par un stress. Il existe quatre isoformes de p38 : p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ . Tandis que p38 α et p38 β sont ubiquitaires, p38 γ est principalement exprimée dans les muscles squelettiques et p38 δ dans les poumons, les reins, le pancréas et l'intestin grêle. p38 α et p38 β sont identiques à 74% et partagent la même sensibilité à un inhibiteur pharmacologique, une molécule de pyridinil imidazol, le SB203580 (93). Les formes p38 γ et p38 δ sont résistantes à cet inhibiteur, d'un facteur 10, en raison de leurs différences structurelles (94).

5.2 Mécanismes d'activation et de régulation

Comme JNK, p38 est une kinase répondant à de nombreux *stimuli* liés au stress. L'étude de la voie de signalisation de p38 est complexe car elle peut répondre à plus de soixante *stimuli* cellulaires, de façon cellules spécifiques (95). Son schéma d'activation canonique est le même que pour les autres MAPKs. Il implique MEKK1-4, MKK2/3 et TAK1 au niveau des MAPKKs qui vont activer MKK3/6 et MKK4, responsables de l'activation de p38 sur le motif conservé Thréonine-Glycine-Tyrosine. Il est important de noter que p38 peut être activée par deux voies non-canoniques, la voie

d'autophosphorylation en cis médiée par TAB1 (96, 97) et celle médiée par l'activation des TCR (T-cell receptor) via ZAP-70 (98) (Figure 7). TAB1 est une protéine d'échafaudage qui permet l'autophosphorylation de p38 mais aussi de TAK1. Ce mécanisme d'activation, décrit lors de l'ischémie (99) et de l'IC (100), est assez complexe et permet une boucle de régulation négative puisque TAB1, qui est un substrat de p38, lorsqu'il est phosphorylé ne permet plus la phosphorylation de TAK1.

La signalisation de p38 est impliquée dans de nombreux processus comme l'inflammation, la mort cellulaire et la régulation du cycle cellulaire. Au niveau pathologique, elle a un rôle dans les inflammations chroniques (maladie de Crohn), la tumorigénèse, la maladie d'Alzheimer et les pathologies cardiaques.

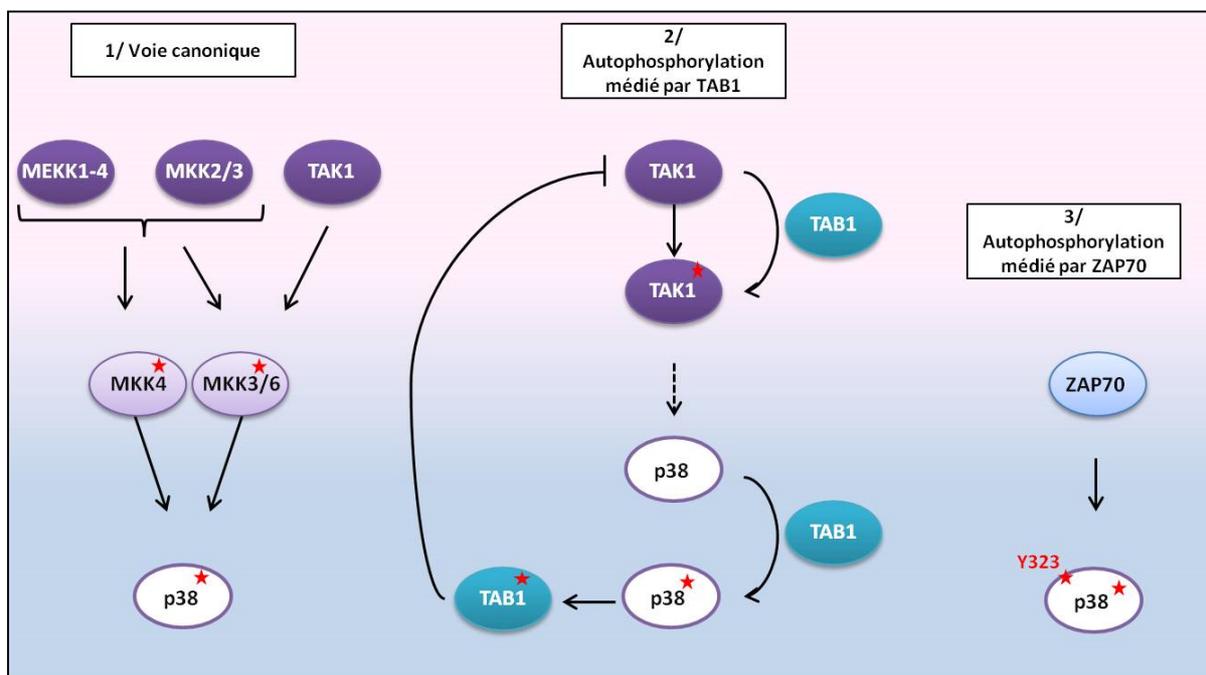


Figure 7 : Les 3 mécanismes d'activation de p38 (adapté de (95))

p38 peut être activée par 3 voies séparées : (1) La voie canonique classique par phosphorylation en cascade. (2) La voie de l'autophosphorylation médiée par TAB1, une protéine d'échafaudage qui promeut l'activation de TAK1 et de p38. Cette voie est bien caractérisée lors d'un IDM. (3) L'autophosphorylation médiée par ZAP-70. La tyrosine kinase ZAP-70 phosphoryle p38 sur la tyrosine 323 ce qui induit une autophosphorylation de p38.

5.3 Les substrats de p38

p38 est présente à la fois dans le noyau et le cytoplasme dans les cellules quiescentes. Lors de son activation, elle est transloquée dans le noyau. Il existe aussi des mécanismes de transport comme les MAP kinase activated protein kinase-2 (MAPKAPK2/3) qui une fois phosphorylées par p38 forment un complexe stable avec p38 pour l'exporter du noyau vers le cytoplasme. Un exemple de l'action coordonnée de p38 sur ses substrats dans le noyau et le cytoplasme est la direction quasi symphonique de la transcription et de la traduction durant l'inflammation. Plusieurs cytokines possèdent une région riche en élément AU dans la région UTR (Untranslated region) de leur ARNm.

La liaison de protéines sur cette région affecte la stabilité de l'ARNm de la cytokine et son abondance en tant que future protéine. Au travers de ce mécanisme, p38 augmente la stabilité des transcrits de plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-1 β , la cyclo-oxygénase-2 ou encore le TNF- α (101). p38 possède de nombreux substrats (Figure 8) et est impliquée dans de nombreux processus comme l'inflammation, la fibrose et joue un rôle important lors de l'IC post IDM.

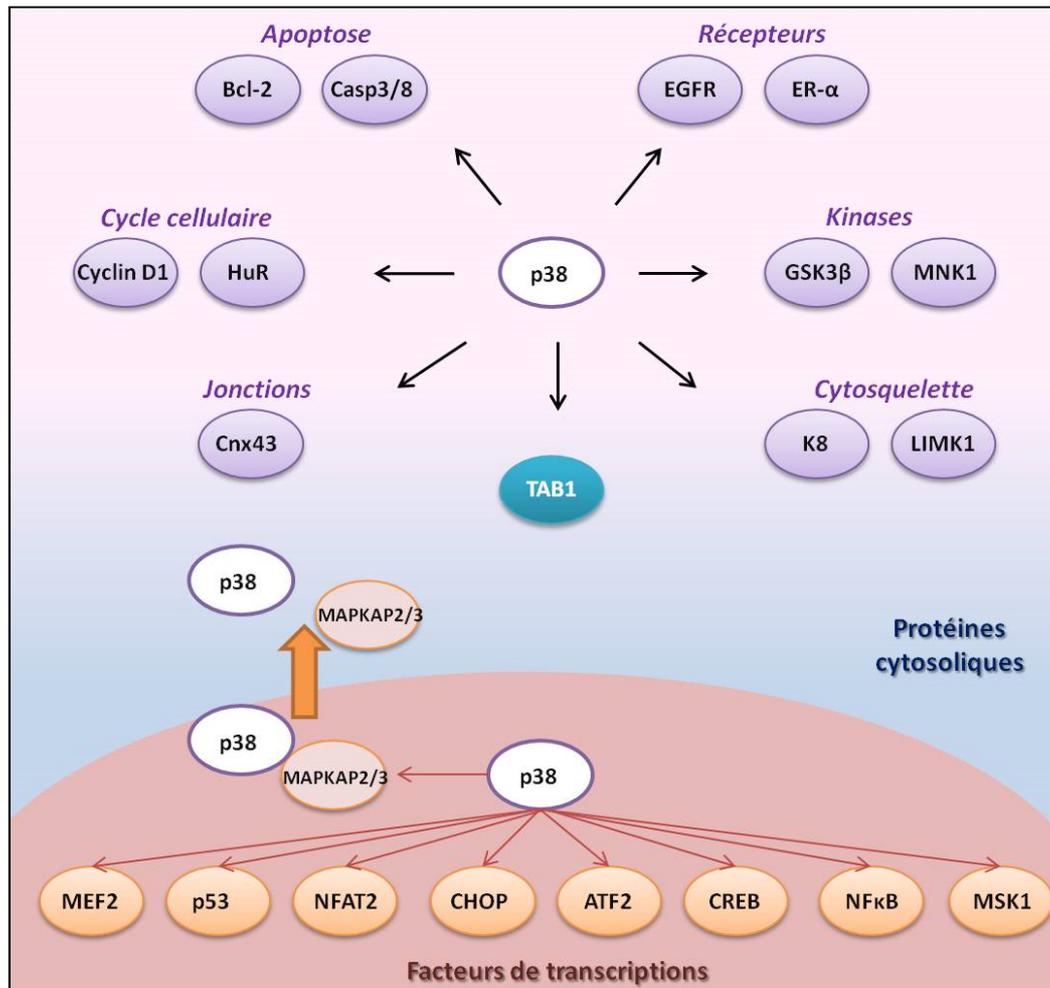


Figure 8 : Les substrats de p38 (adapté de (101))

Les différents substrats cytosoliques de p38 : Bcl-2 et les caspases 3 et 8 pour la régulation de l'apoptose, les récepteurs associés ER- α et EGFR (epidermal growth factor receptor), les kinases GSK3 β (glycogen synthase 3) et MNK1 (Map kinase interacting ser/thr kinase 1), LIMK1 (Lim domain kinase 1) et K8 (keratin 8) pour une action sur le cytosquelette, la connexine 43 (Cnx43) pour les jonctions cellulaires, Cyclin D1 et HuR (Hu antigen/embryonic lethal abnormal vision family member) pour le contrôle du cycle cellulaire.

Les cibles nucléaires : MEF2 (myocyte enhancement factor), p53, NFAT2 (nuclear factor of activated T-cells), CHOP (CREB homology protein), ATF2 (activating transcription factor 2), CREB (CCAAT enhancer binding protein), NF κ B, MSK1 (Mitogen and stress activated protein kinase 1).

5.4 Rôle dans l'inflammation

De nombreuses études montrent que les cytokines inflammatoires, comme TNF- α ou l'interleukine 6 (IL-6), sont fortement exprimées lors de l'IC et y contribuent. Ainsi, TNF- α n'est pas exprimé dans le

cœur des patients sains tandis qu'il est retrouvé dans le cœur des patients présentant une IC au stade final (102).

p38 régulant de nombreuses cytokines, il est devenu la cible de nombreuses études (103). Des souris transgéniques surexprimant MKK6 et présentant une expression accrue de l'IL-6 et de TNF- α , ont montré une augmentation du remodelage cardiaque extracellulaire (104). L'injection d'un inhibiteur de p38, le SB239068, à ces souris, réduit les taux plasmatiques de ces deux cytokines ainsi que la fibrose interstitielle et le remodelage cardiaque.

L'implication de p38 dans l'amplification de la production de ROS (Reactive Oxygen Species), molécules jouant un rôle important dans l'inflammation vasculaire, suggère que l'inhibition de p38 dans un cœur stressé pourrait être bénéfique (105).

5.5 Rôle dans la fibrose

Chez la souris, une surexpression ou activation de p38 ne provoque pas d'hypertrophie mais augmente le remodelage extracellulaire et diminue la fonction contractile (106). Dans un modèle de souris KO pour l'isoforme α de p38, une augmentation de la fibrose interstitielle est constatée (107), tandis que l'expression de la forme dominante négative de p38 α , par injection d'un adénovirus chez la souris, développe une résistance à la fibrose en réponse à une surcharge de pression (108).

De plus, un KO partiel ou total de MK2 (Mitogen activated protein kinase 2), qui est un substrat important de p38 associé à l'IC, permet la réduction de la fibrose (109). Ces études démontrent l'implication de p38 dans la fibrose au cours de l'IC.

5.6 Cardioprotection versus mort cellulaire

Un certain nombre d'études suggèrent que l'activation de p38 MAPK aggrave le remodelage du VG en favorisant l'apoptose des cardiomyocytes et la fibrose cardiaque suite à une ischémie-reperfusion (110). L'ajout d'un inhibiteur de p38 augmente l'apoptose induite par la NE sur des cardiomyocytes en culture, suggérant un rôle protecteur de p38 dans l'apoptose induit par les récepteurs β -AR (111). A l'inverse, *Thandavarayan et al.* observent une diminution de l'apoptose cardiaque et du nombre de cellules exprimant la caspase 3 chez une souris transgénique exprimant la forme inactive de p38 α , dans le cœur spécifiquement (112) (110). Enfin, la surexpression de p38 α dans des cardiomyocytes de rats nouveaux nés (NRVM) augmente l'apoptose (113), tandis que son inhibition réduit l'apoptose de cardiomyocytes en culture (114).

L'inhibition de p38 MAPK est donc l'une des interventions clés permettant d'atténuer les conséquences pathologiques de l'ischémie et la surcharge de pression (115). Récemment, des études

suggèrent que l'inhibition pharmacologique de p38 MAPK peut atténuer le remodelage et la dysfonction du VG (116), (112), (117). Néanmoins, certaines études utilisant soit des animaux p38 α -déficient (118) ou des souris knock-in p38 α -dominante-négative (119), suggèrent que la réduction de la voie de signalisation de p38 MAPK dans le cœur favorise la croissance des myocytes et exacerbe le dysfonctionnement et l'hypertrophie. Par ailleurs, la restauration de l'activité kinase de p38 par transfert de gènes à l'aide d'adénovirus au cours de l'infarctus permet une amélioration fonctionnelle significative de la fonction cardiaque associée à une augmentation de l'angiogénèse et une réduction de l'apoptose (120). Les premières observations de *Wang et al.* (113) supposaient un rôle pro-apoptotique pour p38 α et un rôle pro-hypertrophique pour p38 β dans des NRVM. Depuis ces rôles ont été quelque peu modifiés. En réponse à une ischémie simulée *Saurin et al.* (121) ont montré une augmentation de l'activité de p38 α quand celle de p38 β diminue. De plus, ces auteurs démontrent que l'inhibition de p38 α a un effet cardioprotecteur tandis que Kim et al. (122) démontrent l'implication de p38 β dans ce phénomène de protection.

Ces résultats apparaissent contradictoires, mais il faut noter que les premières études ne se sont basées que sur l'utilisation de l'inhibiteur de p38, le SB203580 qui n'est pas sélectif des isoformes. De plus, il a été montré récemment que cet inhibiteur en fonction de sa dose pouvait inhiber d'autres kinases (83). En ce sens on peut conclure que seules les études résumées dans le tableau 5 sur les effets cardioprotecteurs de l'inhibition de p38 réalisées avec des dominants négatifs et des souris résistantes à l'inhibiteur apparaissent pertinentes.

L'équipe du *Professeur Marber* a récemment démontré en utilisant une approche de mutagenèse dirigée in vivo que p38 α peut avoir deux rôles distincts et diamétralement opposés, notamment une aggravation ou une cardioprotection (123), (124).

En résumé, les inhibiteurs de p38 MAPK ont un potentiel thérapeutique dans les maladies cardiaques ischémiques (125). Toutefois, l'enthousiasme sur la "couverture" de l'inhibition pharmacologique de p38 MAPK est tempéré par les faits que p38 est impliqué dans d'innombrables processus biologiques (126). L'isoforme majeure de p38 est essentielle pour l'embryogenèse (127), et la toxicité hépatique des inhibiteurs de p38 a réduit le développement d'au moins trois programmes d'essais cliniques (128). Ces inconvénients ont augmenté l'intérêt de l'étude des mécanismes contrôlant l'activation de p38 MAPK dans l'espoir qu'elles révéleront de nouvelles cibles thérapeutiques (128).

Tableau 5 : Effets cardioprotecteurs de l'inhibition de p38 (adapté de (105))

Processus/ Pathologie	Etude	Conditions	Effets
IDM	<i>MacKay et al., 1999 (129)</i>	Culture de NRVM soumis à une ischémie simulée en présence de l'inhibiteur de p38 (SB203580).	Inhibition de l'activité de p38 et de l'activation de la caspase 3 diminuant l'apoptose.
	<i>Otsu et al., 2003 (95)</i>	Ischémie/reperfusion dans des cœurs de souris p38 α -/+.	La réduction de p38 α protège.
	<i>Tanno et al., 2003 (130)</i>	KO de MKK3 et culture de H9c2 exprimant p38 α résistant au SB203580. Ischémie/reperfusion	L'absence de MKK3 n'a pas d'effet sur l'activation de p38 post ischémie. L'activation de p38 par TAB-1 contribue aux lésions du myocarde
	<i>Kaiser et al., 2004 (114)</i>	Souris transgénique dominant négatif de p38 et de MKK6. Soumise à un IDM et culture cardiomyocytes	p38 a des effets pro-apoptotiques
	<i>Kumphune et al., 2010 (123)</i>	Souris résistante à l'inhibiteur de p38 α soumise à une ischémie globale en présence de l'inhibiteur (SB203580).	p38 α est l'isoforme active durant l'ischémie contribuant à l'IDM.
Remodelage VG	<i>Braz et al., 2003 (119)</i>	Souris transgénique dominant négatif de p38 α , MKK3 ou MKK6, soumises à un stress (TAC).	La signalisation de p38 inhibe la réponse hypertrophique du cœur adulte
	<i>Nishida et al., 2004 (107)</i>	KO spécifique de p38 α dans le cœur soumis à une TAC. Culture des cardiomyocytes.	Rôle primordial de p38 α dans la survie des cardiomyocytes en réponse à la TAC, sans effet sur la réponse hypertrophique
	<i>Ren et al., 2005 (110)</i>	Souris dominant négatif de p38 α soumis IDM	7 jours après l'IDM, la fonction systolique est augmentée, la taille de l'infarctus est réduite et il y a diminution de l'apoptose
Préconditionnement	<i>Saurin et al. 2000 (121)</i>	Surexpression dans des NRVM de p38 α ou p38 β . Ischémie simulée et inhibition par le SB203580	L'inhibition de p38 réduit la lésion et contribue à la cardioprotection. p38 α et β sont activés/désactivés différemment durant l'ischémie.
	<i>Marais et al. 2001 (131)</i>	Cœurs de rats perfusés et soumis à une ischémie/reperfusion	L'inhibition de p38 durant l'ischémie/reperfusion est cardioprotectrice
	<i>Sicard et al., 2010 (124)</i>	Préconditionnement en présence du SB203580 de souris p38 α ou p38 β résistantes à l'inhibiteur.	P38 α responsable d'un effet cardioprotecteur du SB203580

5.7 Nouvelles voies de signalisations menant à l'activation de p38 et importances dans les pathologies cardiaques

L'une des hypothèses pour expliquer le rôle ambivalent de p38 α est la mise en jeu de voies d'activation distinctes induisant une localisation et l'activation de substrats différents lors des stress (132), (125).

L'identification de protéines permettant de moduler l'activité de p38 α est déterminante pour cibler des inhibiteurs de la voie délétère et des activateurs de la voie protectrice de p38 MAPK.

L'auto-activation non canonique de p38 médiée par TAB-1 est une voie en cours d'étude prometteuse puisqu'elle induit l'apoptose des cardiomyocytes et que cette interaction avec p38 modifie la signalisation de p38 α en comparaison à la voie dite canonique (97), (133), (134).

Ces modes d'activation classiques et non classiques sont connus pour entraîner une localisation différentielle de p38 dans la cellule et ainsi phosphoryler des substrats distincts ayant pour conséquences des effets phénotypiques divergents (135).

GADD45 (Growth arrest and DNA-damage-inducible 45) est une protéine connue pour jouer un rôle important dans la promotion de l'activation de la voie classique de p38 (136).

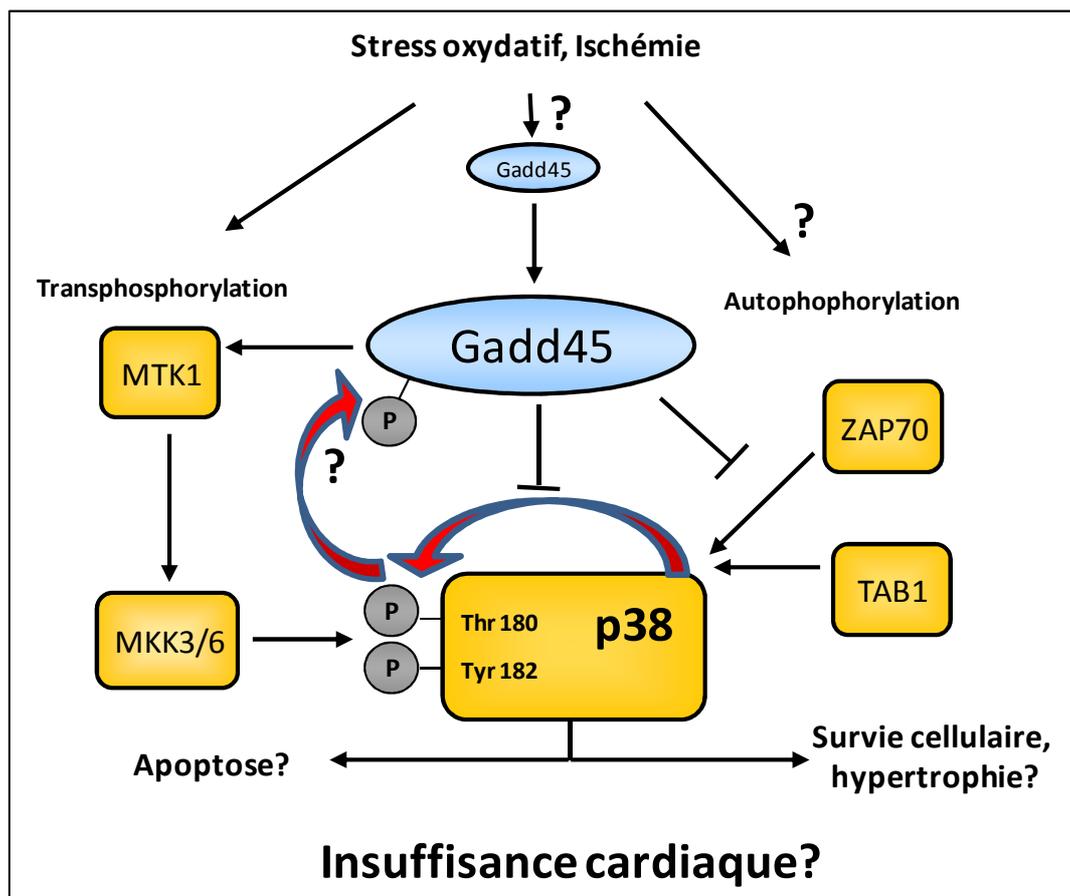


Figure 9 : Nouvelles voies d'activation de p38

p38 peut être activé par 3 voies de signalisations détaillées dans ce chapitre. Récemment GADD45 a été trouvé comme un régulateur de l'activation de p38 à travers la voie alternative ZAP-70 mais aussi en bloquant l'autophosphorylation de p38 ou encore en agissant sur la voie canonique via MTK1.

Tous les membres de la famille GADD45 peuvent se lier à une région non catalytique autoinhibitrice dans la partie N-terminale de la kinase MTK1. Cette liaison permet l'activation de MTK1 et donc de p38 (136) . MTK1 joue un rôle important dans la régulation de la mort cellulaire et est également impliquée dans la pathogenèse de l'IC à la fois dépendante de l'activité de p38 et de JNK (137).

Par ailleurs, une étude a récemment démontré que GADD45 joue un rôle direct dans l'inhibition de l'autophosphorylation de p38. De cette façon, GADD45 peut inhiber ZAP-70 et conduire à l'inactivation de p38 en empêchant la phosphorylation du site Tyr323 de p38 α (98).

Ainsi GADD45 peut agir comme un modulateur de l'activation de p38 MAPK en favorisant une voie (classique) au détriment d'une autre (non-classique). Comme ces voies d'activation de p38 ont différents substrats en favorisant et en inhibant une voie plutôt que l'autre, GADD45 peut être en mesure d'orienter les conséquences physiologiques de l'activation de p38, sans changement notable de son niveau d'activation. Ce qui pourrait expliquer les résultats divergents observés avec l'inhibition pharmacologique. Ainsi, une meilleure compréhension du rôle de GADD45 dans la régulation de l'activité de p38 est cruciale.

IV. GADD 45

1/ Structure

1.1 Les différentes isoformes

La famille de gènes Growth Arrest and DNA damage-inducible 45 (GADD45) code pour trois protéines α , β et γ . Chez l'homme, les gènes GADD45 sont localisés sur les chromosomes 1 pour α , 19 pour β et 9 pour γ . Sur quatre transcrits de GADD45 α , seul deux codent pour une protéine. Tandis que GADD45 β code pour une protéine, GADD45 γ produit trois transcrits dont deux codants pour une protéine. Ces isoformes pour α et γ sont produits par épissage alternatif mais pour l'instant on ne connaît aucune différence fonctionnelle entre ces isoformes (138).

GADD45 α a été le premier membre identifié par screening d'une banque d'ADNc provenant de cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) ayant subi une irradiation aux ultraviolets (UV) (139). GADD45 β , nommé MyD118 à l'origine, a été découvert par analyse génique d'une lignée cellulaire de leucémie myéloïde induite par IL-6 (140). Enfin, GADD45 γ a été trouvé dans la souris lors d'une stimulation par l'IL-2 (141).

1.2 Les protéines

Les protéines de la famille GADD45 sont d'environ 18kDa, acides avec un pHi de 4 à 4,2. Leurs séquences sont assez homologues avec 55 à 57% d'acides aminés identiques. En 2008, la résolution par résonance magnétique nucléaire (RMN) de la structure de la forme humaine de GADD45 α (142), suivi par celle de GADD45 γ de souris, par cristallographie (143), a permis de constater que ces deux protéines possèdent les mêmes structures secondaires, à savoir cinq hélices α et cinq feuillets β (Figure 10).

Les protéines GADD45 peuvent interagir les unes avec les autres pour former des homo ou des hétéro dimères. Par exemple les régions comprenant les acides aminés 33 à 61 et 132 à 165 de GADD45 α sont essentielles pour l'oligomérisation. Chez la souris, une mutation sur la seconde ou la troisième hélice α de GADD45 γ bloque le phénomène de dimérisation mais aussi sa fonction d'inhibiteur de croissance cellulaire. *Schrag et al.* rapportent ainsi que le domaine central de ces protéines est crucial pour la dimérisation mais aussi pour l'interaction avec d'autres protéines (144).

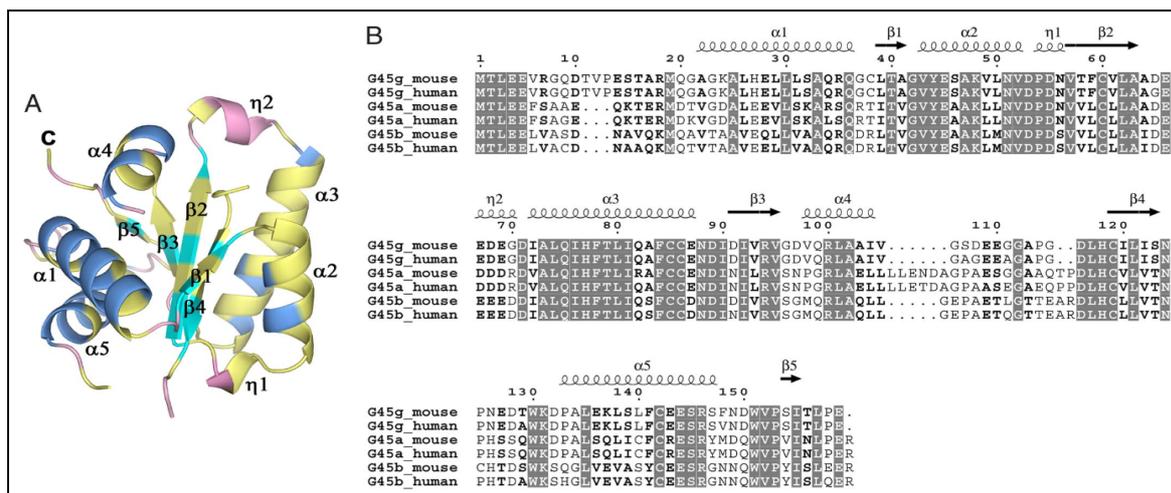


Figure 10 : Structure monomérique de GADD45 (adapté de (143))

A. Structure 3D en hélice alpha et feuillet beta. Toutes les parties en jaunes correspondent aux acides aminés conservés entre les différentes isoformes. En bleu les régions non conservés. B. Alignement des séquences des différentes isoformes de GADD45.

1.3 Les sites d'interactions

En plus de sa capacité à s'oligomériser, GADD45 peut interagir avec de nombreuses protéines comme PCNA, CDK1, MTK1, p38, MKK7 et p21. GADD45 ne possède pas d'activité enzymatique, c'est donc par une interaction qu'il va exercer ses fonctions.

En réponse à un stress, Les trois membres de la famille GADD45 peuvent interagir directement avec la kinase MTK1/MEKK4, permettant l'induction de l'apoptose via la voie de signalisation p38. Les résidus N-Ter de GADD45β sont essentiels pour dissocier le domaine auto-inhibiteur de MTK1, ce qui permet l'activation de MTK1 par dimérisation et phosphorylation sur la thréonine 1493 (136). GADD45β peut aussi s'associer à MKK7, kinase activée par MTK1, grâce à son hélice α-3 et l'inactiver via ses boucles 1 et 2 en occupant son site de liaison à l'ATP (145). De plus, GADD45α peut interagir directement avec p38 dans sa région comprise entre les acides aminés 71 et 96 (146).

GADD45α et β participent à la réparation de l'ADN par leur interaction avec PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) dans le recrutement des sites d'ADN endommagés. Cette liaison avec PCNA se fait par la région C-terminal pour α et β tandis que l'isoforme γ a besoin de sa région centrale et C-terminale pour cette interaction (146).

1.4 Régulation de GADD45

A l'heure actuelle, de nombreux éléments régulateurs ont été trouvés dans les promoteurs des gènes GADD45. Il existe des sites de liaison pour des facteurs de transcription tels que Egr1 (Early growth response 1), WT1 (Wilms tumor 1), Oct-1, NF-YA et NF-κB. De plus, sur le troisième intron de GADD45α se trouve des sites de liaisons pour p53, AP-1 (un complexe hétéromérique composé de c-Fos, c-Jun, ATF et JDP), NF-AT et BRCA1 (Figure 11), (147).

Concernant p53, il se lie à GADD45 α après une irradiation aux UV, l'ajout d'un agent alkylant ou une radiation ionisante (148). L'activité du promoteur GADD45 est aussi augmentée lors d'une co-expression de p53 et WT1 ou Egr-1, facteurs de transcription connus pour interagir avec p53, mais pas par l'expression de p53 seul (149).

Le suppresseur de tumeur BRCA1 est une phosphoprotéine nucléaire possédant un domaine d'activation transcriptionnel en C-terminal capable d'induire GADD45 α . Il peut se fixer sur trois régions de la séquence de GADD45, dans le premier intron, sur le site de ZBRK1 situé sur le troisième intron ou encore dans la Oct-1 et CCAAT box du gène. Oct-1 est un facteur de transcription important dans l'activation du promoteur de GADD45 lors d'une irradiation aux UV. Sur le troisième intron BRCA1 lié à ZBRK1 réprime l'activité du promoteur de GADD45. Cependant un stress environnemental provoque la dégradation de ZBRK1 et donc permet l'activation par BRCA1 (150).

La régulation de GADD45 α et γ par NF- κ B est médiée par c-Myc, un facteur de transcription et oncogène fréquemment impliqué dans de nombreux cancers. C-Myc inhibe le promoteur de GADD45 en interagissant avec les régions riches en GC (151).

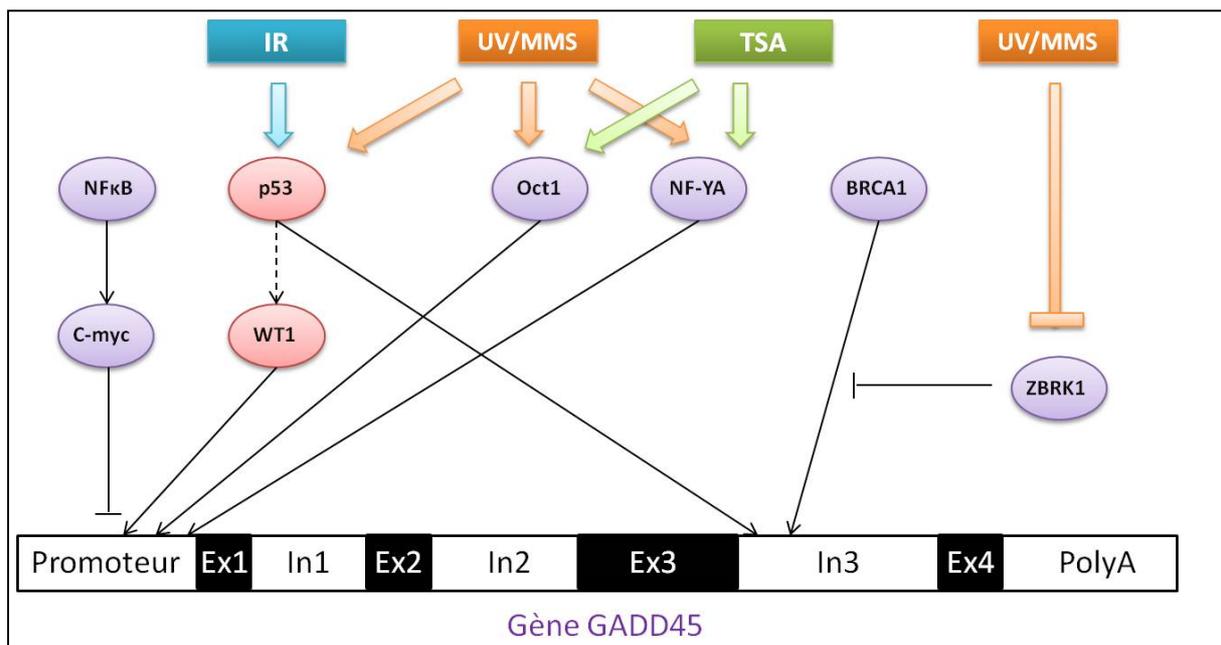


Figure 11 : Modulation de GADD45 (adapté de (151))

Les différents stress cellulaires (IR : Infrarouge, UV : Ultraviolet, MMS : Methyl methane sulfonate) vont induire via l'action de différentes protéines (Oct-1, WT1, NF-YA, p53, c-myc, BRCA1 pouvant être inhibé par ZBRK1) une expression ou une répression de GADD45.

2/ Signalisation et fonctions

2.1 GADD45 dans la réparation de l'ADN et l'épigénétique

Le rôle de GADD45 dans la machinerie de la réparation de l'ADN n'est pas encore complètement compris. L'utilisation de souris GADD45 α KO, a montré que la perte de GADD45 entraînait une instabilité du génome, une diminution du NER (nucleotide excision repair) qui est un système de réparation de plusieurs nucléotides excisés par une endonucléase 3'-5' et réparés à l'aide d'une polymérase et d'une ligase, une augmentation du niveau de mutation et une forte susceptibilité à la tumorigénèse (152). La réparation de l'ADN médiée par GADD45 implique son interaction avec PCNA. Après des dommages sur l'ADN, PCNA modifie sa localisation nucléaire vers les sites de réplication de l'ADN provoquant ainsi un changement dans le NER, dans le MMR (MisMatch Repair) et le BER (Base excision repair) (153). Tandis que l'interaction de GADD45 avec PCNA stimule ce processus, une délétion de GADD45 empêche PCNA d'aller sur les sites d'ADN endommagés et réduit donc la réparation de l'ADN (154).

Son implication dans la réparation de l'ADN est reliée à sa faculté à rapprocher physiquement différentes protéines de l'ADN. Les modifications épigénétiques peuvent être partiellement attribuées à la capacité de GADD45 à se lier aux histones, ou encore à modifier l'accessibilité à l'ADN endommagé (155). La déméthylation de l'ADN médiée par GADD45 est controversée mais apparaît reliée au NER. Récemment, *Sytnikova et al.* ont démontré la capacité de GADD45 α à se lier à l'ARN, formant ainsi des ribonucléoprotéines permettant une régulation post-transcriptionnelle (156).

2.2 GADD45 et contrôle du cycle cellulaire

Il existe quatre phases au cycle cellulaire : La phase G1 permettant la préparation à la duplication du génome, la phase S de duplication du génome, la phase G2 préparant à la division cellulaire et enfin la phase M de division cellulaire. Trois points de contrôles régulent ce cycle : pour le passage de G1 à S (G1/S), celui de S à G2 (S/G2) et enfin de G2 à M (G2/M).

L'arrêt du cycle cellulaire est un mécanisme cellulaire de défense essentiel pour préserver l'intégrité du génome et prévenir la réplication d'ADN endommagé. De ce fait, l'instabilité du génome due à la perte des points de contrôle du cycle cellulaire est fréquemment associée à la tumorigénèse.

La régulation des différentes phases du cycle est effectuée par des protéines régulatrices, les cyclines et les cyclin-dépendant kinases (CDK) (157).

GADD45 est impliqué dans le contrôle de deux points de contrôle, G1/S et G2/M (Figure 12), (147).

Concernant G1/S, le moins caractérisé, une surexpression des trois isoformes de GADD45 dans des lignées de cellules cancéreuses (M1 et H1299) entraîne une accumulation de cellules arrêtées en phase G1 (158). A long terme, ces cellules arrêtées en G1, peuvent entrer en apoptose.

Une micro-injection d'un vecteur d'expression codant pour GADD45 α dans des fibroblastes humains provoque l'arrêt des cellules en phase G2/M (141). C'est lors de ce point de contrôle que GADD45 est le mieux caractérisé, puisqu'il interagit avec le complexe CDK1/Cyclin B1. Ce complexe qui facilite le passage G2/M, est inhibé de deux façons par GADD45 : Les isoformes α et β se lient à CDK1 et provoquent la dissociation du complexe tandis que l'isoforme γ inhibe l'activité enzymatique du complexe sans le dissocier (159). Une délétion de la région centrale d'acides aminés de GADD45 entraîne une incapacité à inhiber le complexe CDK1/Cycline B1 et par conséquent empêche l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M dans des fibroblastes (160).

GADD45 est donc un acteur majeur de contrôle du cycle cellulaire.

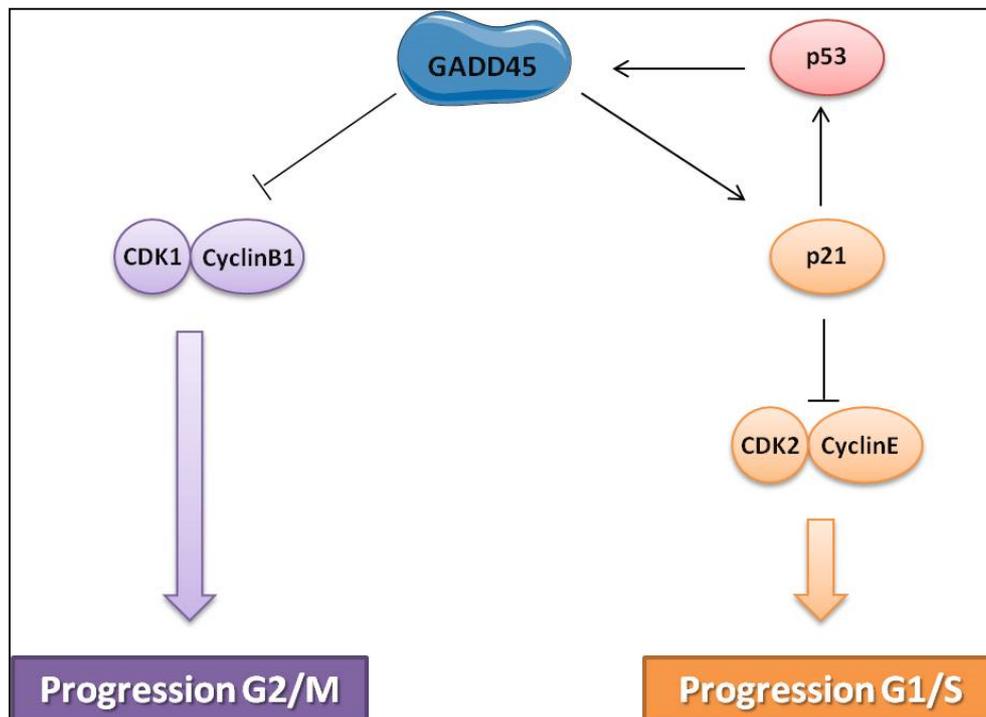


Figure 12 : GADD45 et le cycle cellulaire (adapté de (147))

GADD45 inhibe la formation du complexe CDK1/Cyclin B1 pour bloquer la progression G2/M. Son interaction avec p21 bloque la progression G1/S.

2.3 GADD45 et apoptose/survie cellulaire

Les cellules exposées à un stress, causant des dommages à l'ADN ou perturbant la croissance cellulaire, vont connaître l'arrêt de leur cycle cellulaire jusqu'à la réparation de ce problème. Cependant, si les dommages sont trop grands ou que le stress est prolongé, la cellule va enclencher un processus d'apoptose.

GADD45 joue un rôle important dans l'induction de l'apoptose, tout particulièrement via son action sur les MAPK de la voie p38 et JNK. Cependant, en fonction de l'isoforme et du type cellulaire son rôle peut aussi être anti-apoptotique et donc favoriser la survie cellulaire.

Comme présenté plus haut, GADD45 peut interagir avec MEKK4 ou encore p38 pour activer les voies de signalisations JNK et p38. Par exemple, MEKK4 est activé par la liaison des isoformes β et γ (136) et est responsable de l'apoptose par la voie de p38 dans des cellules endothéliales et épithéliales (161) (162), tandis qu'il augmente la survie des cellules hématopoïétiques (163). Il est intéressant de noter que GADD45 ne fait pas que moduler l'activité de ces kinases de stress, puisque son expression est aussi sous le contrôle de p38. L'inhibition de p38 par son inhibiteur spécifique entraîne une diminution de l'expression des trois isoformes de GADD45 (164). On peut dès lors envisager une boucle de rétrocontrôle entre GADD45 et ces MAPKs (Figure 13).

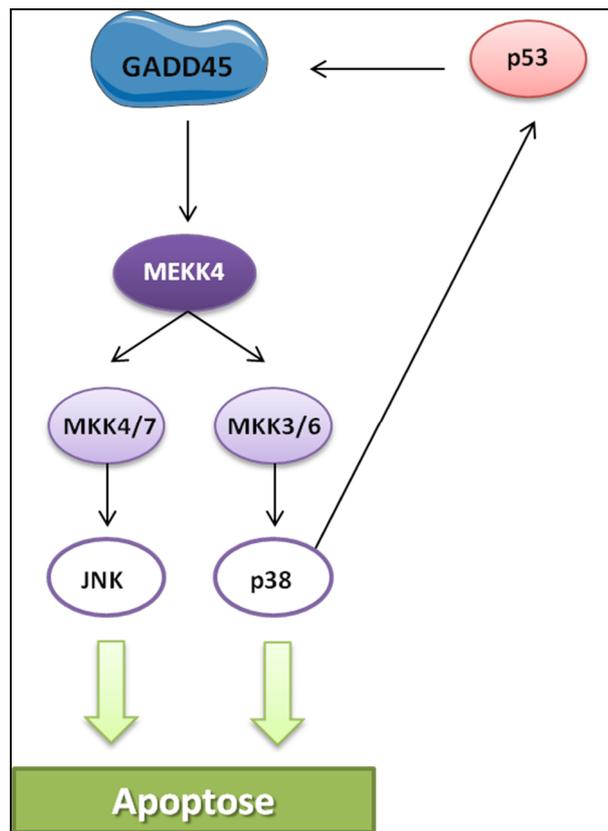


Figure 13 : Apoptose et GADD45 (adapté de (147))

L'interaction de GADD45 sur le domaine N-terminal de MTK1 entraîne l'activation du domaine kinase de MTK1 ce qui entraîne une cascade menant à l'apoptose.

Les effets pro-survie de GADD45 sont médiés par NF- κ B qui est connue pour son activité anti-apoptotique. Ce dernier augmente l'expression de c-myc qui inhibe l'expression des isoformes α et γ . De cette façon, l'extinction des deux isoformes entraîne un blocage de l'apoptose induite par la voie p38/JNK (165). Plusieurs études rapportent un rôle «pro-survie» de l'isoforme β . Les lymphocytes infiltrés T1 helper de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, présentent une forte augmentation de GADD45 β et sont particulièrement résistantes à l'apoptose (166). De plus, une surexpression de GADD45 β dans les fibroblastes humains protège ces cellules de la mort programmée (167).

Les protéines GADD45 sont essentielles dans les réponses aux stress environnementaux médiés par les voies p38 et JNK. Cependant le basculement de la cellule vers la survie ou l'apoptose est un mécanisme complexe qui n'est pas uniquement dépendant de l'activation de GADD45 mais qui dépend aussi du stimulus et du type cellulaire.

2.4 Autres fonctions

GADD45 joue aussi un rôle important dans la différenciation cellulaire que ce soit durant le développement embryonnaire ou dans l'organisme mature. *Kaufmann et al.* (168) montre une expression différente des trois isoformes au cours de l'embryogénèse qui est aussi tissu spécifique. Ainsi GADD45 α est plus présent durant les phases tardives et plus particulièrement dans les ganglions, alors que l'isoforme β est présente dans les phases précoces et dans le mésoderme. Enfin, GADD45 γ est important dans les phases tardives et fortement exprimé dans le système nerveux.

GADD45 γ est aussi impliqué dans la différenciation des gonades en testicules lors de l'embryogénèse. Cette détermination sexuelle primaire se fait à l'aide du gène SRY. Des souris KO GADD45 γ XY sont nées avec une infertilité voir un phénotype intersexe (169). Dans des souris surexprimant une forme inactive de GADD45 γ , la voie des p38 MAPK est perturbée, ce qui entraîne une diminution de l'expression de SRY. Ces observations confirment le rôle de l'isoforme γ dans la détermination du sexe masculin (170).

Une étude récente sur la thermogénèse du tissu adipeux brun ouvre une nouvelle voie inexplorée concernant l'implication des protéines GADD45 dans le métabolisme. Le tissu adipeux brun est spécialisé dans la conversion de l'énergie chimique en chaleur. En réponse au froid ce tissu augmente le métabolisme et promeut la perte de graisse. En recherchant des régulateurs de l'activité des estrogen-related receptors (ERR) par screening, *Gantner et al.* (171) ont identifié GADD45 γ comme un régulateur d'UCP1 (uncoupling protein 1), responsable de la transformation de l'énergie chimique, et de la capacité oxydative dans le tissu adipeux brun. Les souris KO GADD45 γ ne sont pas capables d'induire la thermogénèse en réponse au froid via UCP1. Les auteurs ont ensuite démontré que GADD45, régule l'expression des ERR responsables du programme de thermogénèse, par la voie de signalisation p38 MAPK.

Les protéines GADD45 sont donc impliquées dans de nombreux processus cellulaires. A ce jour, leurs rôles dans de nombreux tissus comme le cerveau, le tissu adipeux ou encore le cœur n'ont pas encore été complètement caractérisés.

2.5 GADD45 et la physiopathologie cardiaque

Il existe seulement quatre études des protéines GADD45 dans le myocarde, démontrant l'étendue du travail à effectuer afin de connaître le rôle exact de ces protéines GADD45.

En 2003, *Steenbergen et al.* ont étudié, par puce à ADN, le profil de patients humains atteints de cardiomyopathies dilatées. Cette étude a permis de mettre en évidence une diminution de l'expression de GADD45 β et de FLIP, deux protéines impliquées dans les effets anti-apoptotiques médiés par NF- κ B (172). Le rôle anti-apoptotique et protecteur de GADD45 β dans le cœur est renforcé par l'étude de *Wang et al.* réalisée en 2008 (173), qui montre une diminution de l'expression de la protéine lors d'une hypertrophie pathologique. La co-expression de GADD45 β avec MKK7, une MAPKK inductrice de l'hypertrophie via JNK, empêche le développement de l'hypertrophie. En 2010, *Kim et al.* ont constaté une augmentation de l'expression de GADD45 β , dans des cœurs de rats, avec un modèle d'ischémie/reperfusion court in vivo. De plus cette augmentation est associée à une apoptose médiée au niveau moléculaire par p38 α et p53 (174, 175).

Le rôle des autres isoformes de GADD45 dans le cœur n'a jamais été étudié, tout comme l'implication de ces protéines dans l'IC induite par une ischémie.

OBJECTIFS DE LA THESE

Le remodelage post-IDM est un processus multifactoriel assez bien connu. Il est caractérisé par une inflammation, une mort cellulaire, une fibrose et un changement électrophysiologique. La voie de signalisation des MAPKs et plus particulièrement la kinase p38 est connue pour influencer ses différentes étapes et mener à l'IC. Cette kinase est régulée lors de l'apoptose par une protéine appelée GADD45 (136). GADD45 est connue pour son impact, dans le domaine du cancer, sur le contrôle du cycle cellulaire (160) ou encore sur l'apoptose et la survie cellulaire. Il a été démontré récemment qu'il existe une corrélation entre l'abondance d'ARNm de GADD45 et le niveau d'hypertrophie des cardiomyocytes chez des patients atteints de cardiomyopathie hypertrophique (172). *Wang et al.* (173) ont renforcé l'hypothèse d'une implication de GADD45 dans l'hypertrophie cardiaque, en démontrant qu'une co-expression de GADD45 β avec MKK7, dans des cardiomyocytes de rats nouveaux-nés, empêche le développement de l'hypertrophie.

Malgré l'implication de la protéine GADD45 dans de nombreux aspects du développement potentiel de l'IC, via l'apoptose ou l'inflammation, le rôle et la prévalence de chaque isoforme de GADD45 dans les pathologies cardiaques n'est pas encore établi.

Nous avons donc cherché à évaluer la prévalence de chaque isoforme dans des conditions d'ischémies simulées in vitro et d'IC après IDM chirurgicale.

Après avoir identifié l'isoforme exprimée nous avons étudié l'impact de GADD45 lors de l'IDM et de l'IC post-IDM, mais aussi les interactions de GADD45 avec la p38 MAPK.

METHODES

1/ Matériels et modèles

1.1 Anticorps

Protéine cible	Dilution	Types et espèces	Fournisseur	Utilisation
α-actinine sarcomérique	1/100	IgG monoclonales de souris	Sigma-Aldrich	Immunomarquage
Bax	1/1000	IgG monoclonales de lapin	Cell Signaling	Immunoblot
Caspase 3 clivé	1/1000	IgG monoclonales de lapin	Cell Signaling	Immunoblot
Caspase 8	1/1000	IgG monoclonales de lapin	Cell Signaling	Immunoblot
GADD45α	1/1000	IgG Polyclonales de souris	Santa Cruz	Immunoblot
GADD45β	1/1000	IgG monoclonales de souris	Santa Cruz	Immunoblot
GADD45γ	1/1000	IgG monoclonales de souris	Santa Cruz	Immunoblot
GAPDH	1/2500	IgG monoclonales de lapin	Cell Signaling	Immunoblot
GFP	1/1000	IgG monoclonales de lapin	Cell Signaling	Immunoblot
HSP27	1/1000	IgG monoclonales de souris	Cell Signaling	Immunoblot
Myc tag	1/1000	IgG monoclonales de lapin	Cell Signaling	Immunoblot
P38 MAPK	1/2000	IgG monoclonales de lapin	Cell Signaling	Immunoblot
P-P38 MAPK (tyr180)	1/1000	IgG monoclonales de lapin	Cell Signaling	Immunoblot
P-P38 MAPK (tyr323)	1/1000	IgG polyclonales de lapin	ECMBiosciences	Immunoblot
RIP1	1/1000	IgG monoclonales de lapin	Cell Signaling	Immunoblot
P-TAK1	1/1000	IgG monoclonales de lapin	Cell Signaling	Immunoblot
TAK1	1/1000	IgG monoclonales de lapin	Cell Signaling	Immunoblot
vinculin	1/100	IgG monoclonales de souris	Sigma-Aldrich	Immunomarquage
Ubiquitine mono et poly	1/1000	IgG polyclonales de souris	Enzo	Immunoblot

1.2 Plasmide

Le plasmide codant GADD45 γ a été construit dans un vecteur pCMV6-Myc-DDK précédemment par le Dr. Pierre Sicard. La séquence codant GADD45 γ a été insérée en C-terminale après les tags Myc et DDK.

1.3 Souris KO

Les souris KO GADD45 γ ont été achetées au Jackson Laboratory sous la référence « B6.129S1-Gadd45gtm1Flv/J ».

Un vecteur de ciblage contenant un gène de résistance à la néomycine a été utilisé pour remplacer l'exon 4 et une partie de l'exon 3 du gène. La construction a été électroporé dans des souches

dérivées de cellules embryonnaires (ES). Les cellules ES positives ont été injectées dans des blastocystes de souris C57BL/6. Les animaux chimériques ont été rétrocroisés C57BL/6 pour 12 générations par le laboratoire donateur du *Dr. Richard Flavell* (Yale University School of Medicine).

Elle possède un phénotype particulier avec une réduction de l'hypersensibilité au contact et une capacité d'activation des voies JNK et p38 réduite dans les lymphocytes T Helper (176).

Le génotypage a été effectué à partir d'une extraction d'ADN des queues de souris à l'aide du kit Extract-N-AMP (Sigma) et la PCR (Polymérase Chain Reaction) à partir des trois couples d'amorces suivants : 5'-GGCATCGACTCTGACCTTGT-3', 5'-ACTGGCGTAGGGAAACAGTG-3' et 5'-CTCCAGACTGCCTTGGGAAAA-3'.

1.4 Modèle d'IDM in vivo

Afin d'étudier le remodelage post-IDM nous avons utilisé un modèle de souris de ligature permanente (177). Les souris sont anesthésiées avec 2% d'isoflurane accompagné d'un analgésique (buprenorphine 0.1mg/kg) et intubée. Une thoracotomie sur le côté gauche est effectuée afin d'accéder au cœur, puis une ligature est effectuée à l'aide d'un fil de nylon de 8-0 (Figure 14).

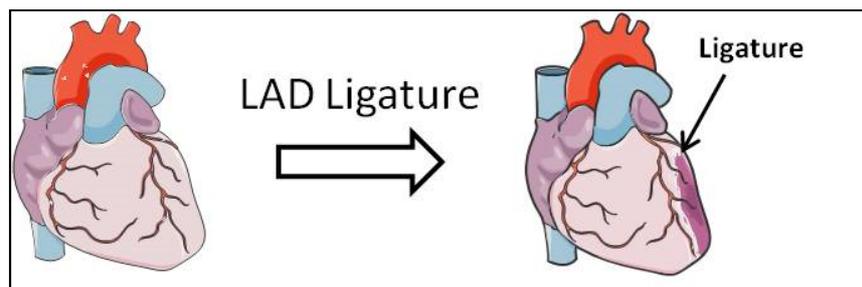


Figure 14 : IDM avec ligature de l'artère coronaire gauche descendante (LAD)

L'ischémie est vérifiée par une pâleur de la zone infarctée et par l'élévation du segment ST sur l'ECG. Une fois les paramètres vitaux de la souris vérifiés, le site de la thoracotomie est refermé. Concernant la souris Sham la même procédure est effectuée sans la ligature de l'artère coronaire gauche.

1.5 Injection d'AAV9

Les vecteurs AAV9 codant pour la GFP (AAV9-cTnT-GFP) ou pour GADD45 γ (AAV9-cTnT-GADD45 γ) ont été construits et amplifiés au Penn Vector Core (Department of Pathology and Laboratory Medicine, School of Medicine, University of Pennsylvania).

L'expression de ces deux protéines est sous la dépendance d'un promoteur cTnT. Des souris C57BL/6J de 8 semaines ont reçu une injection dans la veine jugulaire, après anesthésie avec 1% d'isoflurane, d'AAV9-cTnT-GFP ou d'AAV9-cTnT-GADD45 γ dissous dans du sérum physiologique (3.10¹¹ particules virales/ml).

4 semaines après l'injection, les souris ont subi une échocardiographie puis ont été euthanasiées et le cœur a été récupéré pour vérification de l'expression par immunoblot et imagerie fluorescente.

1.6 Culture Primaire de cardiomyocyte de souris adultes et de rats nouveaux-nés

a/ Cardiomyocytes de rats nouveaux-nés (CRVNs)

Les CVRNs sont isolés à partir de cœurs de rats âgés d'un jour. Après prélèvement des cœurs et élimination des oreillettes, les tissus ventriculaires sont coupés en petits morceaux afin d'augmenter le contact avec la solution enzymatique qui va les digérer. Cette solution enzymatique contient de la collagénase A (Roche Applied Science) et de la pancréatine (Sigma Aldrich) diluées dans un tampon ADS (1,16M de NaCl, 200mM d'HEPES, 10mM de NaH₂PO₄, 55mM de glucose, 3,4mM de KCl et 8,3mM de MgSO₄). Le mélange de tissus ventriculaires et de solution enzymatique est incubé 20 min à 37°C sous agitation. Le surnageant est récupéré, ajouté à 1ml de sérum de veau nouveau né (NCS) pour inactiver les enzymes, puis centrifugé 6 min à 1500 rpm (rotation par minute). Après élimination du surnageant, le culot cellulaire est à nouveau repris dans du NCS afin d'inactiver le reste d'enzymes et de conserver les cellules et est placé à 37°C. L'ensemble de ces opérations est répété 5 à 6 fois jusqu'à digestion complète des cœurs. Les suspensions cellulaires obtenues après chaque digestion sont regroupées en une seule. Afin d'isoler les cardiomyocytes des autres types cellulaires (fibroblastes, cellules endothéliales et hématies), une centrifugation de la suspension cellulaire est effectuée sur un gradient de Percoll (Sigma Aldrich) pendant 30 min à 3000 rpm. Le Percoll, composé de particules de gel de silice, permet de produire un gradient de densité. Deux solutions de densité différente, le Top et le Bottom Percoll sont réalisées et déposées l'une sur l'autre. Chaque type cellulaire ayant une densité propre, se déposera à un endroit différent du gradient et sera ainsi séparé (Figure 15). Après aspiration des fibroblastes, les fractions de cardiomyocytes sont recueillies, regroupées et remises en suspension dans de l'ADS permettant de diluer et d'éliminer le Percoll. Une dernière centrifugation est effectuée pour récupérer les cardiomyocytes. Les cellules sont ensuiteensemencées à raison de 250000 cellules par puits (boîtes 24 puits) ou 500000 cellules par puits (boîtes 12 puits) dans un milieu composé de DMEM (Gibco) et de Milieu 199 (Gibco) supplémentés par 10% de sérum de cheval, 5% de NCS et 1% d'antibiotiques (pénicilline + streptomycine). Un jour après leur ensemencement, les cellules sont incubées dans le même milieu mais sans sérum (milieu J1) afin de sevrer les cellules et d'empêcher l'activation des voies de signalisation par les sérums. Les cultures cellulaires sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂.

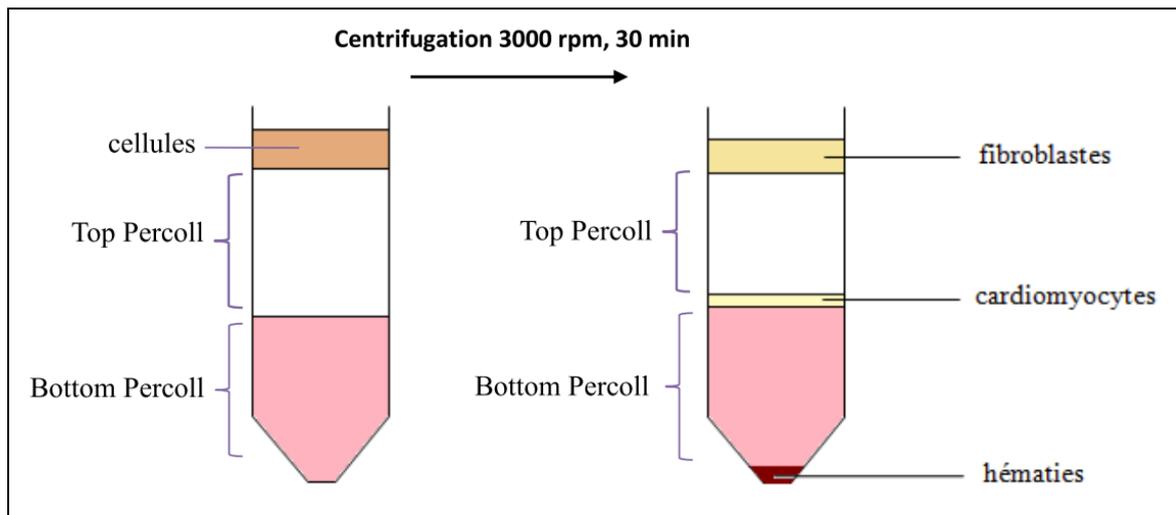


Figure 15 : Isolement des cellules ventriculaires de cœurs de rats nouveaux nés sur gradient de Percoll

Deux solutions de densités différentes appelées Top et Bottom Percoll, sont préparées et déposées l'une sur l'autre. Les cardiomyocytes ont une densité intermédiaire à celle de ces deux solutions tandis que les fibroblastes ont une densité inférieure. Ainsi après centrifugation à 3000 rpm pendant 30 min de la suspension cellulaire déposée sur le gradient de Percoll, les cellules sont séparées. Les cardiomyocytes se situent entre le Top et le Bottom Percoll, les fibroblastes, au-dessus du Top Percoll et les hématies, au fond du tube. Rpm: rotations par minute.

b/ Cardiomyocytes adultes de souris

La souris adulte est anesthésiée par injection de pentobarbital (300mg/kg) et d'héparine (150 unités). Le cœur est rapidement mis sur la glace dans un tampon Krebs-Henseleit modifié (KHB) composé de 118,5 mM de NaCl, 25 mM de NaHCO₃, 4,75 mM de KCl, 1,18 mM de KH₂PO₄, 1.19 mM de MgSO₄, 11mM de D -glucose, et 1,4 mM de CaCl₂. Le cœur est canulé sur un système de Langendorff et est perfusé à 3mL/min avec une solution de KHB à 37°C et contenant 95% d'oxygène et 5% de CO₂. Cette solution de KHB est complétée avec 0.05% de collagénase I (Roche) pour la digestion. Le cœur est ensuite récupéré puis découpé, écrasé sur un tamis de 180µm permettant de récupérer les cellules (124).

La suspension cellulaire a été centrifugée à 100g pendant 2 min pour sédimenter les myocytes qui ont ensuite été remises en suspension dans du milieu M199 complet (milieu M199 avec de la pénicilline (100 UI/ml), de la streptomycine (100 IU/ml), de la L-carnitine (2mM), de la créatine (5mM) et de la taurine (5mM)) et placés dans des plaques à 6 puits revêtues de laminine avant l'incubation dans 5% de CO₂ à 37 ° C. Au bout d'une heure, le milieu a été aspiré, ne laissant que des cellules adhérentes et préchauffée milieu frais complet M199.

1.7 Ischémie Simulée

L'ischémie simulée permettant l'étude in vitro des effets d'une ischémie sur les cardiomyocytes est réalisé à l'aide d'un tampon KHB appauvri en oxygène contenant 137mM de NaCl, 3,8mM de KCl, 0,49mM de MgCl₂, 0,9mM de CaCl₂ et 40mM d'HEPES auquel on ajoute :

- 10mM de 2-deoxyglucose qui est une molécule de glucose modifiée, le groupement hydroxyle est remplacé par un hydrogène, qui ne peut pas subir de glycolyse et qui va entrer en compétition avec le glucose et inhiber la production de glucose-6-phosphate.
- 20mM de sodium lactate qui est un régulateur de pH acide et permet donc de se situer à un pH légèrement acide (pH6.5).
- 1mM de sodium dithionite qui acidifie la solution et capte l'O₂.

Les cardiomyocytes sont exposés à ce milieu pour plusieurs durées définies et sont ensuite lavés dans du PBS avant d'être utilisés pour des manipulations d'immunoblot ou d'immunomarquage.

2/ Méthodes

2.1 Fonction Cardiaque

a/ Echocardiographie

Le phénotype cardiaque des souris KO et WT a été étudié par échocardiographie avant et après IDM par LAD. Les animaux sont anesthésiés avec 1% d'isoflurane et examinés à l'aide d'un échocardiographe Vivid7 (GE Healthcare). Les mesures de dimensions ventriculaires et les paramètres se font à l'aide du logiciel d'analyse du Vivid7 (Figure 16). À partir des dimensions mesurées on peut déduire la fraction d'éjection (FE), aussi appelé FS (Fraction de raccourcissement), qui correspond au calcul suivant : $FE \text{ (en \%)} = (LVIDd - LVIDs) / LVIDd$.

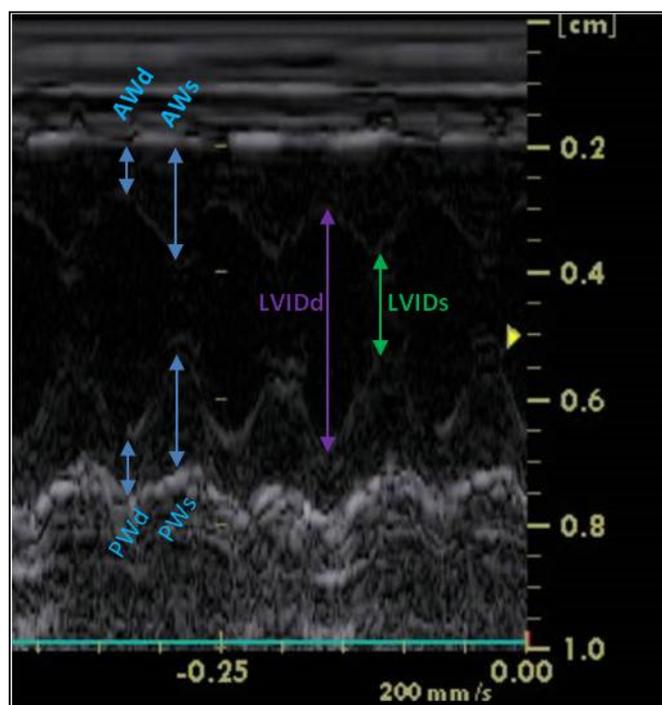


Figure 16 : Exemple des paramètres mesurés sur une échocardiographie de souris adulte (Image du Dr. Yannis Sainte-Marie)

AW : Paroi antérieure, PW : Paroi postérieure, LVIDd et LVIDs : Diamètre interne du ventricule gauche lors de la diastole et de la systole.

b/ Courbe pression-volume (PV loop)

Après 28 jours d'IDM, une mesure invasive de la pression hémodynamique est réalisée sous anesthésie générale (1,5% isoflurane avec 100% oxygène). Un cathéter de conductance (Millar instrument) est introduit dans le VG à travers l'artère carotide droite. Après stabilisation, le signal est enregistré à un taux de 1000/sec à l'aide d'un système de conduction (MPVS, Millar instrument) couplé à un convertisseur digital (AD instrument). Les données sont analysées avec LabChart pro software (AD instrument) et donnent le graphique présenté en Figure 17.

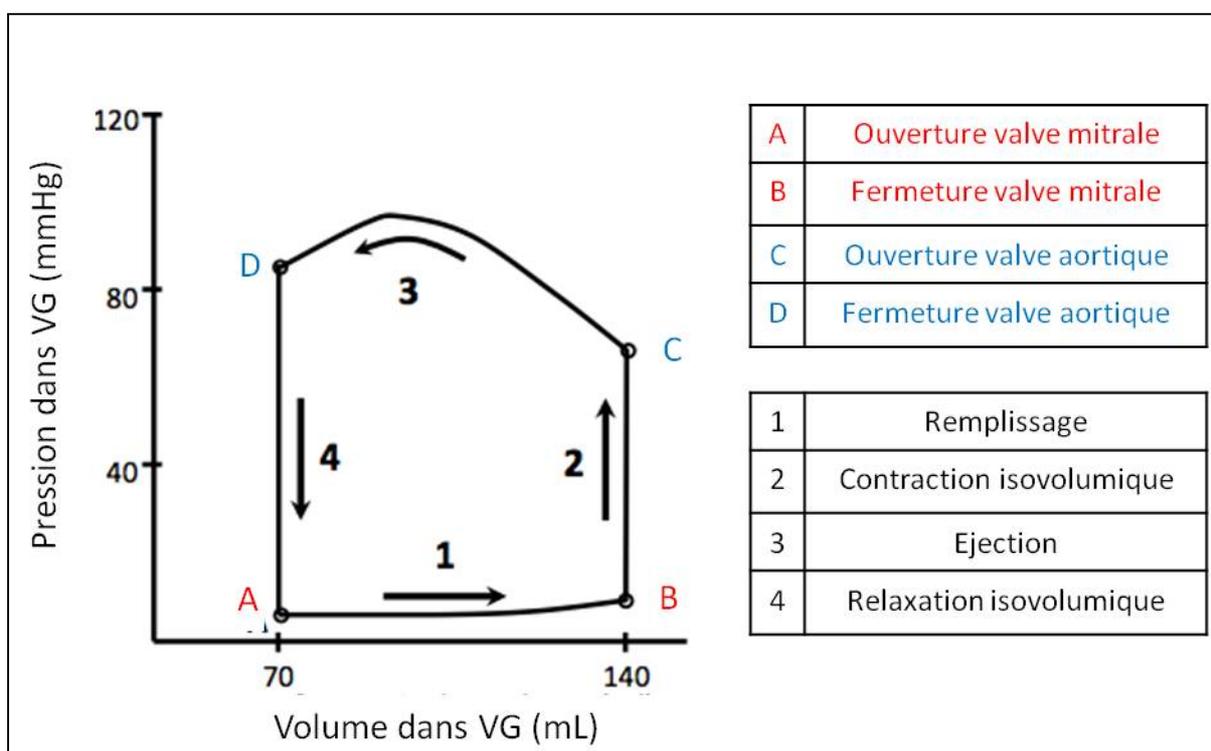


Figure 17 : Courbe pression/volume

Courbe de pression en fonction du volume où l'on peut avec 4 points le remplissage du VG, la contraction, l'éjection et la relaxation.

2.2 Paramètres histologiques

a/ Fibrose

Les cœurs ont été inclus dans de l'OCT (Dako) dans l'azote puis coupés au cryostat (Leica) avec une épaisseur de 10µm. L'aire fibrotique est visualisée après coloration au Trichrome de Masson qui permet de visualiser le collagène présent lors de la fibrose.

b/ Zone infarctée

Les souris sont euthanasiées 48 heures après l'IDM et le cœur est coupé en plusieurs sections d'1mm d'épaisseur. Ces coupes sont incubées 10minutes à 37°C dans du Triphenyltetrazolium chloride (TTC) qui est un composé réduit en Triphénylformazan (TPF), un colorant rouge, dans les tissus vivants sous

l'effet de déshydrogénases. Dans les tissus nécrosés le TTC n'est pas réduit ce qui permet de visualiser et quantifier, à l'aide d'un scanner de lame puis du software Image J, la zone infarctée après un IDM.

2.3 TUNEL

La détection d'apoptose in situ a été réalisée à l'aide du kit DeadEnd™ Fluorimetric TUNEL system (Promega). Le système TUNEL mesure l'ADN fragmenté de cellules apoptotiques en incorporant, à l'extrémité 3'OH de l'ADN, du dUTP-12-fluorescéine en utilisant la désoxynucléotidyl transférase terminal recombinante enzyme (rTdT). La rTdT va former une queue par polymérisation (dUTP TdT médiée par Nick-End Labeling). La fluorescéine couplée sur le dUTP-ADN peut ensuite être visualisée directement par microscopie à fluorescence.

2.4 Libération de LDH

Pour la mesure de nécrose nous avons regardé la libération de lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture de CRNV à l'aide du kit LDH cytotoxicity assay (Biovision) en accord avec le protocole du fabricant.

La LDH est une oxydoréductase présente dans une grande variété d'organismes. Lors d'une nécrose, les cellules libèrent la LDH. Elle catalyse la conversion de pyruvate en lactate ce qui entraîne une production de NADH à partir du NAD⁺. Dans le kit que nous utilisons cette génération de NADH réagit à une sonde colorimétrique produisant une coloration quantifiable à 450nm.

2.5 Immunoblots

Cette technique permet de mettre en évidence une protéine spécifique au sein d'un lysat cellulaire. Elle est composée d'une étape d'électrophorèse permettant de séparer les protéines, d'une étape de transfert indispensable au marquage des protéines par des anticorps spécifiques et enfin d'une étape de révélation

a) Electrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Les protéines sont d'abord séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide. Les échantillons sont dilués au demi dans du tampon de charge de Laemmli (125mM Tris, 10% glycérol, 0,001% bleu de bromophénol, 2% SDS, 5% β-mercaptoéthanol), puis incubés 5 min à 95°C. Les protéines sont ainsi dénaturées et chargées négativement par le sodium dodécyl sulfate (SDS) et le β-mercaptoéthanol. Les échantillons migrent ensuite sous l'action d'un champ électrique de 80 V pendant 30 min dans un premier gel de tassement à 5% d'acrylamide (17% bis acrylamide 30:0.8, 0.125mM Tris pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% ammonium persulfate, 0.001% Temed). Les protéines sont ensuite séparées pendant 1h30 à 120 V dans un gel à 8, 10 ou 12% d'acrylamide

(suivant la taille de la protéine d'intérêt) (pH 8,8) immergé dans un tampon de migration (0.3% Tris, 1.44% glycine, 0.1% SDS).

b) Transfert des protéines sur une membrane de nylon.

En fin d'électrophorèse, les protéines sont transférées du gel de polyacrylamide vers une membrane de PVDF (polyvinylidène difluoride) (Bio-Rad) pendant 1h30 à 4°C sous l'action d'un champ électrique de 120 V. La membrane a été préalablement activée par de l'éthanol absolu et équilibrée par du tampon de transfert (0.3% glycine, 0.3% Tris, 20% méthanol). Cette étape permet de charger la membrane positivement afin qu'elle retienne les protéines (chargées négativement).

c) Révélation

Les sites de liaisons non spécifiques des anticorps sont saturés par incubation des membranes pendant 1h dans du tampon 0,1% TTBS (0.1% Tween, 24.2% Tris, 292.2% NaCl) contenant 3% de BSA. Les membranes sont ensuite incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dirigé spécifiquement contre la protéine d'intérêt puis 1h avec un anticorps secondaire couplé à une enzyme, la peroxydase. Entre chaque étape, les membranes sont lavées avec du 0,1% TTBS pendant 15 min, puis 3 fois pendant 5 min.

Les protéines d'intérêt sont mises en évidence par chimioluminescence. Les membranes sont incubées pendant 5 min avec du Clarity (Bio-rad) qui contient le substrat de la peroxydase. Le substrat est oxydé par l'enzyme et émet un signal lumineux. Le signal est quantifié par densitométrie à l'aide du logiciel Image Lab (Bio-Rad).

2.6 Phos-tag

La technologie Phos-Tag développé en 2009 par *Kinoshita et al.* repose sur l'utilisation de molécule de Manganèse (Mn²⁺) couplé à une structure moléculaire permettant uniquement la fixation des protéines phosphorylées. Ces protéines seront dès lors plus lourdes et vont moins migrées sur un gel de polyacrylamide SDS-PAGE classique créant un décalage (shift). Cette méthode couplée à un immunoblot permet de détecter les phosphorylations d'une protéine (178).

2.7 PCR quantitative

L'extraction des ARNs a été réalisée à l'aide de Trizol® (Invitrogen). Les ADNs complémentaires (ADNc) ont ensuite été synthétisés en utilisant le kit iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad). Un contrôle négatif ne contenant pas de reverse transcriptase a été effectué à chaque fois pour vérifier l'absence de contamination avec de l'ADN génomique. La PCRq a été réalisée sur un StepOne (Applied Biosystems) dans une plaque 96 puits, avec 1.5ng d'ADNc, des paires d'amorces spécifiques de souris

et le SsoFast™ EvaGreen Supermix (Bio-Rad). Le gène de la GAPDH a été utilisé comme gène de référence et a été amplifié à l'aide des amorces.

Gène	Séquence amorce 5'-3'	Séquence amorce 3'-5'
A-skeletal actin	5'-TACCACCGGCATCGTGTTG	5'-CCAGGTCCAGACGCATGAT
BNP	5'-AGCTGCTGGAGCTGATAAGA	5'-GTTACAGCCCAAACGACTGAC
B-MyHC (β-myosin heavy chain)	5'-ACTGTCAACACTAAGGGTCA	5'-TTGGATGATTTGATCTTCCAG
Collagène 1	5'-TCAAGATGTGCCACTCTGACT	5'-TCCATGTTGCAGTAGACCTTG
Collagène 3	5'-GATGGAAACCCTGGATCAGA	5'-GCACCAGGAGAACCATTTTC
GAPDH	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC	5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCC
GADD45α	5'-CAGTCACTCCCCACGCTGAT	5'-GAACTCGGCCCTTGACA
GADD45β	5'-CGGAAGGCCTCCGACACT	5'-ACGAACCCAAGAGGCAAAAA
GADD45γ	5'-GCGAGGCAGGTGTGACTCA	5'-CCTTTCTTTCCCCTCCTTCA

ARTICLE

1/ Introduction

Le remodelage post-IDM est influencé par la voie des MAPKs et plus particulièrement par la voie de p38. Son activation, par la voie canonique classique, est connue pour induire une fibrose cardiaque, des dysfonctions contractiles et une IC (105, 110).

Une des protéines capable de réguler l'activité de p38 est la growth arrest and DNA-damage-inducible 45 (GADD45) (146). Cette protéine connue pour ses effets sur le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et capable de promouvoir l'apoptose en réponse à des stress physiologiques est particulièrement étudiée dans le cancer mais son rôle n'est que très peu décrit dans le cœur (179). Les études existantes dans le cœur ont montré une augmentation de l'expression de GADD45 lors de stress pharmacologiques à l'Angiotensine II ou encore suite à une ischémie (174). Compte tenu du lien entre p38 et GADD45 et de leurs rôles respectifs dans les mécanismes de remodelage et de mort cellulaire, nous avons voulu étudier le rôle potentiel de GADD45 lors du remodelage post-IDM et la signalisation impliquée.

2/ Résultats

La première étape de notre projet était d'identifier l'isoforme de GADD45 pouvant être dérégulée lors d'une ischémie simulée sur cardiomyocytes de souris adultes isolés ou après un IDM in vivo. C'est l'isoforme γ qui est apparue augmentée dans les deux cas tandis que les isoformes α et β ne présentaient aucun changement dans leurs expressions.

Nous avons focalisé la suite de l'étude sur GADD45 γ , à l'aide de deux modèles distincts :

- Une surexpression d'un AAV 9 codant GADD45 γ , sous le contrôle du promoteur cTnT permettant de mimer la surexpression de GADD45 γ au cours de l'IDM.
- Et une souris KO de GADD45 γ permettant de vérifier l'impact de l'absence de Gadd45g sur le remodelage cardiaque post-infarctus.

La surexpression de GADD45 γ , dans nos souris adultes, après 28 jours, une modification de la fonction cardiaque avec une dilatation cardiaque accompagnée d'une diminution de la FE comparé aux contrôles. De plus, on trouve une augmentation de la fibrose avec une augmentation de l'expression en ARNm des collagènes 1 et 3. Une hypertrophie des cardiomyocytes corrélée à une réexpression des gènes foétaux, est associée à une diminution de leur nombre due à une augmentation de leur mort par apoptose. Ces premiers résultats ont montré qu'une surexpression de

GADD45 γ dans les cardiomyocytes est délétère, conduit à une mort des cellules cardiaques et donc contribue au développement d'une IC.

La souris KO de GADD45 γ nous a permis d'explorer le remodelage induit par un IDM. Notre hypothèse après les résultats précédant était que la suppression de GADD45 γ pouvait prévenir ce remodelage. 28 jours après un IDM les souris KO GADD45 γ présente une dilatation cardiaque et une dysfonction cardiaque plus faible comparé aux WT. Au niveau de la fibrose, les niveaux de collagènes et la circonférence de la cicatrice sont moins élevés chez les KO comparés aux WT. Enfin de façon surprenante le nombre de cellules apoptotiques est diminué non seulement après 28 jours mais aussi 48 heures après l'IDM. GADD45 γ participe donc au remodelage post-IDM et particulièrement au niveau de la mort cellulaire.

Dès lors nous nous sommes intéressés aux mécanismes par lesquels GADD45 γ pouvait influencer la mort des cardiomyocytes. Dans notre modèle de surexpression de GADD45 γ , il y a une augmentation de la phosphorylation de p38, de l'expression de Bax, des formes clivées de la caspase 8 et de RIP1. De plus, dans le modèle de souris KO après un IDM, il existe une diminution comparé aux WT de ces marqueurs suggérant que GADD45 γ régule p38, RIP1 et la caspase 8 pour induire l'apoptose des cardiomyocytes.

D'après les connaissances sur la régulation de p38 par GADD45, nous avons voulu vérifier si ces effets étaient p38 dépendant. Les effets de la surexpression de GADD45 γ sur l'apoptose mesurée par TUNEL, et sur les formes clivées de RIP1 et caspase 8 sont réduit de façon significatifs par l'ajout de l'inhibiteur de p38, le SB203580, mais aussi en présence de Si-RNA RIP1 et caspase 8, confirmant que les effets de GADD45 γ sur l'apoptose sont p38 dépendant et médiée par RIP1 et caspase 8.

3/ Conclusion

Notre travail démontre l'importance de GADD45 γ dans le développement de l'IC post IDM et plus particulièrement dans le phénomène de mort des cardiomyocytes par apoptose. En combinant des approches in vivo et in vitro nous avons pu mettre en évidence une voie de signalisation de mort cellulaire dépendante de GADD45 γ par l'activation de p38.

Gadd45 γ regulates cardiomyocyte death and post-myocardial infarction left ventricular remodelling

Alexandre Lucas^{1,2}, Jeanne Mialet-Perez^{1,2}, Danièle Daviaud^{1,2}, Angelo Parini^{1,2}, Michael S. Marber³, and Pierre Sicard^{1,2*}

¹INSERM, UMR-1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, 1 Avenue Jean Poulhes, 31432 Toulouse, France; ²University Paul Sabatier, CHU of Toulouse, 31432 Toulouse, France; and ³Cardiovascular Division, King's College London, The Rayne Institute, St. Thomas' Hospital, London, UK

Received 13 April 2015; revised 8 September 2015; accepted 8 September 2015; online publish-ahead-of-print 15 September 2015

Time for primary review: 33 days

Aims Post-infarction remodelling is accompanied and influenced by perturbations in mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling. The growth arrest and DNA-damage-inducible 45 (Gadd45) proteins are small acidic proteins involved in DNA repair and modulation of MAPK activity. Little is known about the role of Gadd45 in the heart. Here, we explored the potential contribution of Gadd45 gamma (γ) isoform to the acute and late phase of heart failure (HF) after myocardial infarction (MI) and determined the mechanisms underlying Gadd45 γ actions.

Methods and results The Gadd45 γ isoform is up-regulated in murine cardiomyocytes subjected to simulated ischaemia and in the mouse heart during MI. To mimic the situation observed during MI, we enhanced Gadd45 γ content in cardiomyocytes with a single injection of an adeno-associated viral (AAV9) vector encoding Gadd45 γ under the cTNT promoter. Gadd45 γ overexpression induces cardiomyocyte apoptosis, fibrosis, left ventricular dysfunction, and HF. On the other hand, genetic deletion of Gadd45 γ in knockout mice confers resistance to ischaemic injury, at least in part by limiting cardiomyocyte apoptosis. Mechanistically, Gadd45 γ activates receptor-interacting protein 1 (RIP1) and caspase-8 in a p38 MAPK-dependent manner to promote cardiomyocyte death.

Conclusion This work is the first to demonstrate that Gadd45 γ accumulation during MI promotes the development and persistence of HF by inducing cardiomyocyte apoptosis in a p38 MAPK-dependent manner. We clearly identify Gadd45 γ as a therapeutic target in the development of HF.

Keywords Post-myocardial ischaemia remodelling • Cardiomyocytes • Gadd45 γ • Cell signalling • Cell death

1. Introduction

The growth arrest and DNA-damage-inducible 45 (Gadd45) family includes three isoforms: α , β , and γ , known to elicit pleiotropic effects, inducing cell cycle arrest, DNA repair, and ultimately promoting apoptosis in response to physiological stress.^{1–3} The effects of Gadd45 are mediated through interactions with protein partners, including p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK).⁴ Despite its relationship with p38 MAPK and intense interest in the cancer field, little is known about the role of Gadd45 in the heart.

Few previous studies have evaluated the hypothesis that Gadd45 isoforms may have relevance to cardiac physiopathology. Tantalizingly, some studies have shown that acute stressors, such as angiotensin II or transient ischaemia, can increase Gadd45 β and/or γ mRNA levels,^{5–7} which could play a role in ischaemia/hypoxia-induced cardiomyocyte death. In addition, patients with chronic idiopathic or hypertrophic

cardiomyopathy have an alteration of Gadd45 isoform transcript abundance.^{8,9} These observations imply that expression levels of Gadd45 isoforms are possibly associated with cardiac dysfunction, but it is unknown whether this association is causal, casual or adaptive.

At present, the role of Gadd45 in the heart is still unclear. Nonetheless, extrapolating experimental data from other cell types, the protein appears to play a pivotal role in driving p38 MAPK activation through the canonical pathway, a route known to lead to cardiac fibrosis, contractile dysfunction, and heart failure (HF).^{10–12}

The fundamental mechanism of left ventricular (LV) remodelling is multifactorial and well known.¹³ However, the molecular mechanisms that promote myocyte loss, during the course of remodelling after an ischaemic episode, have not been clearly defined. In this context, our aim was to explore the potential contribution of Gadd45 isoforms during the development of HF after myocardial infarction (MI). The study presented here demonstrates the critical role of Gadd45 γ

* Corresponding author. Tel: +33 531224122; fax: +33 561325616, E-mail: pierre.sicard@inserm.fr, sicard123@yahoo.fr

overexpression in cardiomyocytes during the acute and chronic phases of MI. A single intravenous injection of an adeno-associated virus 9 (AAV9) vector expressing Gadd45 γ under the control of cTNT promoter induces LV dysfunction and progression to HF. In addition, Gadd45 γ knockout (KO) mice are protected from ischaemic injury, at least in part, via limited cardiomyocyte apoptosis. Using cultured primary cardiomyocytes, we show that Gadd45 γ is capable of activating receptor-interacting protein 1 (RIP1) and caspase-8 in a p38 MAPK-dependent manner to promote cardiomyocyte apoptosis. Our results suggest the critical importance of the Gadd45 γ pathway in the development of HF.

2. Methods

2.1 Antibodies and chemicals

All chemicals were purchased from Sigma Aldrich Chimie (France) except for SB203580 hydrochloride (Tocris, UK, catalogue no. 1402). The following antibodies were purchased from Sigma: Gadd45 γ (catalogue no. SAB4500177), α -actinin (catalogue no. SAB3300072), and vinculin (catalogue no. V9131); from Cell Signaling (USA): total p38 MAPK (catalogue no. 9212; T-p38), diphospho-p38 MAPK (catalogue no. 9211; polyclonal; p-p38), GFP (catalogue no. 2956), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; catalogue no. 5174), RIP1 (catalogue no. 3493), caspase-8 (catalogue no. 4790), Bax (catalogue no. 2772), cleaved caspase-3 (catalogue no. 9661), total TGF- β -activated kinase 1 (TAK1; catalogue no. 4505), phospho-TAK1 (Thr184/187 catalogue no. 4508), HSP27 (ser82 catalogue no. 9709), and Myc-Tag (catalogue no. 2276); from Santacruz (USA): Gadd45 α (catalogue no. Sc-792) and Gadd45 β (catalogue no. Sc-133606); from Enzo Lifesciences (France) mono- and polyubiquitinated proteins (catalogue no. PW8810). Recombinant Gadd45 α (catalogue no. GWB-4B5123), Gadd45 β (catalogue no. GWB-P0190H), and Gadd45 γ (catalogue no. GWB-P0189G) were purchased from GenWay Biotech (USA).

2.2 Knockout mice

Gadd45 γ homozygous KO mouse model and wild-type (WT) littermates (B6.129S1-Gadd45gtm1Flv/J, stock number 007015, The Jackson Laboratory, USA) were used in this study. Mice were housed in a pathogen-free facility and handled in accordance with the principles and procedures outlined in the ARRIVE guidelines.¹⁴

Genotyping of mice by PCR was performed using the following three primers: 5'-GGCATCGACTCTGACCTTGT-3', 5'-ACTGGCGTAGGG AACAGTG-3', and 5'-CTCCAGACTGCCTTGGGAAA-3'.

All animal experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of the University of Toulouse. Moreover, this investigation conformed to the guidelines for ethical care of experimental animals of the European Union (2010/63/EU).

2.3 In vivo HF model

To resolve the influence of Gadd45 γ on the acute and late phase of post-MI remodelling, we used our established murine model of permanent coronary ligation.^{15–17} In brief, mice were anaesthetized by 2% isoflurane inhalation with analgesia (buprenorphine 0.1 mg/kg s.c.), and ventilated by orotracheal intubation. A left thoracotomy was performed to expose the heart and, using an 8-0 nylon suture, the left anterior descending (LAD) coronary artery was tied by the edge of the left atrium. Ischaemia was verified by the sudden regional paleness of the myocardium and ST elevation. The thoracotomy site was closed while increasing positive end-expiratory pressure and the mice recovered. Only LAD ligation was omitted in the sham procedure.

2.4 Injection of recombinant AAV vectors

The AAV vectors bearing the cardiac troponin T (cTNT) promoter driving the expression of enhanced green fluorescent protein (AAV9-cTNT GFP)

and mouse Gadd45 γ (AAV9-cTNT Gadd45 γ) were provided by Penn Vector Laboratory (PA, USA). For intravenous injection, mice were anaesthetized with 1% isoflurane in oxygen, while viral solution (3×10^{11} vector genomes (vg)/mouse)¹⁸ was slowly injected via the jugular vein. For all procedures, depth of anaesthesia was monitored by foot-pinch reflex.

Four weeks after vector administration, animals were euthanized and hearts were processed for cryosectioning and fluorescence microscopy. Ten-micrometre cryosections were used for documenting eGFP expression by fluorescence microscopy. To determine the distribution of eGFP expression in the myocardium, a minimum of four fields at $\times 20$ magnification were captured from midventricular sections of each heart. The percentage of the total tissue fractional area showing eGFP expression was calculated using the threshold function in ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

2.5 Cardiac function: echocardiography and pressure-volume (PV) loop analysis

The cardiac phenotypes of Gadd45 γ KO and littermate mice were characterized using echocardiography before and after LAD ligation. Animals were anaesthetized with 1% isoflurane and examined with non-invasive echocardiography (echocardiograph Vivid 7 ultrasound; GE, USA). Cardiac ventricular dimensions were measured on M-mode images on at least five occasions in the number of animals indicated.

At the end of the study (Week 4), invasive haemodynamic measurements were performed under general anaesthesia (1.5% isoflurane v/v in 100% O₂), as previously described.¹⁹ Briefly, a 1.2-FG conductance catheter (Millar Instruments, Houston, TX, USA) was introduced into the left ventricle through the right carotid artery. After stabilization, the signals were continuously recorded at a sampling rate of 1000/s using the PV conductance system (MPVS, Millar Instruments, USA) coupled with a PowerLab/4SP analogue and with a digital converter (AD Instruments, UK). Data were analysed by using the LabChart Pro Software (AD Instruments). At the end of the experiments, anaesthetized animals were sacrificed by cervical dislocation. Hearts were rapidly excised and prepared for histology, proteins, and RNA extraction.

2.6 Histology

Hearts were embedded in OCT (Dako, France) and cut into 10 μ m thickness sections which were stored at -80°C . Fibrotic area was determined by picosirius red or Masson Trichrome and quantified using the ImageJ software. Cardiomyocyte diameters were evaluated after vinculin immunofluorescence (IF) staining (200–250 cardiomyocytes/heart; $n = 11$). The absolute number of cardiomyocytes per heart was calculated with an established three-dimensional stereological method.²⁰ Briefly, we used the principle of Delesse (area density = volume density) to estimate the volume fraction of cardiomyocytes (Vv Myo %) in 10 randomly visual fields (cardiomyocytes, connective tissue, and blood vessels were counted separately). The mean cardiomyocyte volume (V Myo) was calculated according to the equation: $V \text{ Myo} = \pi (\text{mean diameter}_{\text{cardiomyocyte}}/2)^2 \times \text{mean length}_{\text{cardiomyocyte}}$. The absolute number of cardiomyocytes per left ventricle was estimated according to the calculation: $(Vv \text{ Myo} \times \text{LV Volume})/V \text{ Myo}$, where the total tissue volume of the left ventricle (LV Volume) was obtained by dividing its weight by its specific gravity (1.0048), and the cell number was given in 10^6 .

2.7 Infarct size

Infarct size was determined using Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. Mice were euthanized 48 h after MI and the heart was quickly excised and sliced into six 1.0-mm-thick sections perpendicular to the long axis of the heart. The sections were then incubated with 1% TTC at 37°C for 10 min and then scanned. The infarct area was measured using the ImageJ software and myocardial infarct sizes were expressed as a percentage of the left ventricle area.

2.8 Primary cardiomyocyte isolation and culture

WT mice were anaesthetized with intraperitoneal pentobarbital (300 mg/kg) and heparin (150 units). Hearts were rapidly isolated and placed in ice-cold modified Krebs-Henseleit buffer (KHB; 118.5 mmol of NaCl, 25.0 mmol of NaHCO₃, 4.75 mmol of KCl, 1.18 mmol of KH₂PO₄, 1.19 mmol of MgSO₄, 11.0 mmol of D-glucose, and 1.4 mmol of CaCl₂). The excised heart was mounted onto a Langendorff apparatus and retrogradely perfused at a constant flow of 3 mL/min with KHB equilibrated with 95% O₂ and 5% CO₂ at 37°C. Adult ventricular myocytes from WT mice were isolated, washed, and resuspended in complete M199 medium with penicillin (100 IU/mL), streptomycin (100 IU/mL), L-carnitine (2 mM), creatine (5 mM), and taurine (5 mM) as described previously,²¹ plated on laminin-coated six-well plates prior to incubation in 5% CO₂/room air at 37°C. After 1 h, the medium was aspirated, leaving only adherent cells and fresh prewarmed complete M199 medium.

For neonatal cardiomyocyte culture, Sprague-Dawley rats of 2–3 days old were sacrificed by decapitation and hearts were removed and dissociated with collagenase type II 0.1% (Bovallay, France) as described previously.²² Myocyte enrichment was performed by centrifugation through a discontinuous Percoll gradient and resultant suspension of myocytes was plated onto gelatin-coated culture dishes. Cells were cultured for 24 h in culture medium [4 : 1 DMEM/M199 containing 10% horse serum, 5% newborn calf serum, penicillin/streptomycin antibiotics; Lifetech Invitrogen, USA). Plasmid transfections with Gadd45 γ -Myc-DDK-tagged (catalogue no. RC201364; Origene Technologies, USA) constructs were performed using Lipofectamine 2000 reagent (Life Technologies, USA).

The selected siRNA for Gadd45 isoforms (α , β , and γ), RIP1, and caspase-8 (ON-TARGET plus SMART pool siRNA, Dharmacon, USA) were transfected for 48 h using Dharmafect reagent according to the manufacturer's recommendations.

2.9 Simulated ischaemia protocol

Simulated ischaemia was induced by exposing isolated cardiomyocytes for the specified duration (5, 15, and 30 min) to modified KHB (137 mM NaCl, 3.8 mM KCl, 0.49 mM MgCl₂, 0.9 mM CaCl₂, and 4.0 mM HEPES) with 10 mM 2-deoxyglucose, 20 mM sodium lactate, and 1 mM sodium dithionite at pH 6.5.²¹ Following simulated ischaemia, the myocytes were washed briefly in PBS and fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde in PBS for immunocytochemistry experiments or solubilized in sample loading buffer. For IF, the specimens were analysed using confocal microscopy on an inverted microscope (Leica SP5 system, Mannheim, Germany) equipped with a blue diode and argon and helium neon lasers using a 63 \times /1.4 numerical aperture oil immersion lens.

2.10 TUNEL assay

In situ Cell Death Detection kit, DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, USA) for *In Situ* Apoptosis Detection, was used for terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL). The heart sections or the culture cardiomyocytes were treated according to the manufacturer's instructions and co-stained with α -actinin and 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Slides were applied with mounting media and covered with a glass cover. A confocal microscope Zeiss LSM 780 and a Zeiss cell observer Z1 videomicroscope (Carl Zeiss, Germany) fluorescence microscope were used to visualize the TUNEL-positive cardiomyocyte, and ImageJ software was used to analyse the images.

2.11 LDH release assay

For quantitative assessment of cardiomyocyte necrosis, LDH release in culture medium was measured using the LDH Cytotoxicity Assay Kit according to the manufacturer's instructions (Biovision, USA).

2.12 Immunoprecipitation

Cells were harvested in RIPA/lysis buffer. After protein quantification, 300 μ g of protein in 300 μ L of lysate was incubated with 3 μ g of antibodies against Myc-Tag overnight at 4°C using a rotator followed by another 2 h incubation with Protein G Plus/Protein A Agarose beads (Santacruz, catalogue no. SC-2003). The beads were washed three times with ice-cold lysis buffer. Protein complexes were released by 5 min of boiling in SDS sample buffer, resolved by SDS-PAGE, and subjected to immunoblotting.

2.13 PAGE and western blot analysis

Cardiac cells or tissue proteins were extracted; separated on 10 or 15% SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene difluoride membranes, and stained with the Ponceau S solution. After scanning, the membranes were rinsed with distilled water for 3 min, until the staining was completely eliminated, we proceeded with the blocking for 1 h with 4% non-fat milk in Tris-buffered saline (pH 7.4) containing 0.1% Triton X-100; and probed overnight at 4°C with the appropriate primary antibody (1/100–1/1000). After washing and exposure for 2 h at room temperature to horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, antibody-antigen complexes were visualized by enhanced chemiluminescence as described previously.²³ Immunoblots were revealed by enhanced chemiluminescence ECL plus (GE Healthcare, USA), scanned with Chemidoc MP (Bio-Rad, USA), and quantified by densitometry using the Image Lab software (Bio-Rad, USA). The total protein level in the blot lanes obtained by Ponceau S staining was used to normalize all our proteins of interest.²⁴ Then, the p38 MAPK phosphorylation status was calculated using the pp38/total p38 ratio obtained from separate gels. The cleaved RIP1 and cleaved caspase 8 were quantified using cl-RIP1/RIP1 or cl-caspase 8/caspase 8 ratio obtained from the same gels. Quantification for the other proteins (Gadd45 γ , cleaved caspase-3, Bax) was done using the GAPDH acquired from separate gels. The fold increase or decrease was compared against the control condition (t0 or sham or AAV9 GFP).

2.14 Quantitative PCR

RNA was extracted from tissue with RNAeasy kit (Qiagen, USA) and measured on Nanodrop spectrophotometer. Reverse transcription was performed with Iscript select (Bio-Rad, USA). Quantitative PCR experiments were conducted with a StepOne (Lifetechnology Applied Biosystem, USA) using Sofast EvaGreen supermix (Bio-Rad, USA) and specific primer pair for mice: GADD45 α [forward (F) 5'-CAGTCACTCCCCACGCTGAT; reverse (R) 5'-GAACTCGGCCCTTGACA], GADD45 β (F 5'-CGG AAGGCCTCCGACACT; R 5'-ACGAACCCAAGAGGCAAAAA), GADD45 γ (F 5'-GCGAGGCAGGTGTGACTCA; R 5'-CCTTTCTTTCCCC TCCTTCA); α -Skeletal Actin (F 5'-TACCACCGGCATCGTGTTG; R 5'-CCAGTCCAGACGCATGAT); brain natriuretic peptide (BNP; F 5'-AAGCTGCTGGAGCTGATAAGA; R 3'-GTTACAGCCCAACGAC TGAC); β -myosin heavy chain (β -MyHC; F 5'-ACTGTCAACTAA GAGGGTCA; R 5'-TTGGATGATTTGATCTTCCAGGG), Collagen 1 (F 5'-CTCAAGATGTGCCACTCTGACT; R 5'-CTCCATGTTGCAGTA GACCTTG), and Collagen 3 (R 5'-GATGGAAACCCTGGATCAGA; R 5'-GCACCAGGAGAACCATTTTC). PCRs were performed using the following cycle conditions: denaturation 10 s at 95°C, annealing 5 s at 60°C, and extension 8 s at 72°C. GAPDH (F 5'-ACCACAGTCCATGCC ATCAC; R 5'-CACCACCCTGTTGCTGTAGCC) was measured as a reference gene. Data were analysed with Data Assist (Lifetech Applied Biosystem, USA).

2.15 Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Experimental groups were compared using the Mann-Whitney test for independent samples. Differences between more than two groups were analysed by two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple group comparisons test, where appropriate. A value of $P < 0.05$ was considered significant. Analyses were performed using the GraphPad Prism 5 software.

3. Results

3.1 Gadd45 γ isoform accumulates in cardiomyocytes subjected to ischaemia and in the infarcted myocardium

In the first instance, we determined the relative expression of the three Gadd45 isoforms in normal mouse myocardium. We observed very low levels of all Gadd45 isoforms in normal murine heart (see Supplementary material online, *Figure S1A*). As a control, we verified the specificity and sensitivity of all three antibodies for Gadd45 α , β , and γ using recombinant Gadd45 α , β , and γ proteins (see Supplementary material online, *Figure S1B*). Since Gadd45 proteins are known as stress sensors,³ we evaluated the expression levels of all three Gadd45 isoforms during ischaemia. Isolated adult cardiomyocytes from WT mice were subjected to simulated ischaemia for 5, 15, and 30 min, a sufficient duration to activate p38 MAPK (*Figure 1A*).²¹ As expected, simulated ischaemia caused robust p38 dual phosphorylation and was associated with a rapid accumulation of the Gadd45 γ isoform (*Figure 1A*) in both the nucleus and the cytoplasm (*Figure 1B*), whereas Gadd45 α and β isoform expression levels were unchanged (see Supplementary material online, *Figure S1C*).

Gadd45 γ regulation seems to be fast and efficient; therefore, we examined how Gadd45 γ is regulated. Lal and Gorospe²⁵ have reviewed the mechanisms that control Gadd45 expression at both transcriptional and translational levels. In our case, since the increase occurs in only 5 min, we hypothesized that Gadd45 γ might be regulated by the ubiquitin proteasome system (UPS) in stressed cardiomyocytes. Results are presented in Supplementary material online, *Figure S2A–C* and demonstrate that Gadd45 γ accumulation is the result of less ubiquitination and/or proteasome inhibition during ischaemia.

Next, we used a mouse model of MI in order to determine the relative mRNA and protein expression of the three Gadd45 isoforms in the heart. We found that Gadd45 γ mRNA and protein levels were gradually increased during the acute and latter phase after LAD permanent ligation, specifically in the non-infarct area (*Figure 1C and D*). On the other hand, Gadd45 α undergoes no fluctuations of protein levels during ischaemia, whereas Gadd45 β protein level is expressed only in the infarcted area in the latter phase after MI (see Supplementary material online, *Figure S1D*). To summarize, our data show that Gadd45 γ accumulates in cardiomyocytes after acute and chronic cardiac ischaemia.

3.2 Gadd45 γ overexpression in cardiomyocytes induces HF

To better understand the role of Gadd45 γ during HF development and to mimic the up-regulation observed in the post-MI remodelling process, we used an AAV of serotype 9 expressing Gadd45 γ under the control of the cardiac-specific cTNT promoter (AAV9-cTNT Gadd45 γ). Twenty-eight days after control AAV9-cTNT-eGFP injection, GFP expression in mouse ventricular myocytes was documented by fluorescence microscopy and a transduction rate of $75 \pm 4.5\%$ was observed with a dose of 3×10^{11} vg/mouse (data not shown).

Twenty-eight days after AAV9-cTNT-Gadd45 γ injection, Gadd45 γ mRNA was overexpressed 40-fold and protein level by 4-fold in the heart, compared with AAV9-cTNT-GFP-injected animals ($n = 11$ in each group; *Figure 2A and B*). This level of Gadd45 γ overexpression was very similar to that observed during the post-MI remodelling process (*Figure 1C and D*). No changes were observed in mRNA levels of the other Gadd45 isoforms (*Figure 2A*).

Next, we studied the cardiac function, fibrosis, and biological markers of cardiac remodelling after 28 days. Interestingly, Gadd45 γ overexpression led to cardiac dilatation (LV dimension during systole, LVIDs) with a decrease in cardiac function (fractional shortening, FS) compared with control AAV9-cTNT-GFP-injected mice (see Supplementary material online, *Table S1 and Figure 2C*). In addition, AAV9-cTNT Gadd45 γ -treated mice showed a significant decrease in cardiac output and deterioration in the PV relationship ($P < 0.05$; see Supplementary material online, *Table S1; Figure 2D and E*).

The cardiac dysfunction was associated with an increase in interstitial fibrosis (*Figure 3A and B*) and overexpression of collagen-1 and -3 mRNA (*Figure 3C*). Using vinculin IF analysis, we observed an increase in cardiomyocyte diameter (*Figure 3D and E*). These results were associated with a re-expression of foetal genes involved in cardiac hypertrophy with a significant increase in BNP and β -MyHC mRNA expression (*Figure 3F*). We postulated that Gadd45 γ overexpression induced cardiac hypertrophy. However, the heart weight-to-body weight ratio (HW/BW; *Figure 3G*) and LV anterior and posterior wall dimensions measured by echocardiography (see Supplementary material online, *Table S1*) were not significantly different between the two groups. Therefore, we hypothesized that this cardiomyocyte hypertrophy was the results of a compensatory response due to the loss of cardiomyocytes. Indeed, we measured an absolute loss of cardiomyocytes in AAV9-cTNT Gadd45 γ ventricles compared with AAV9-cTNT-GFP ventricles (*Figure 3H*). Interestingly, this correlated with increased cardiomyocyte apoptotic events in cryosections from AAV9-cTNT-Gadd45 γ (*Figure 3I and J*).

Taken together, our results demonstrate that Gadd45 γ overexpression in cardiomyocytes is deleterious and leads to cardiomyocyte death and the development of HF.

3.3 Gadd45 γ deletion reduces cardiac remodelling after chronic MI

Since Gadd45 γ accumulated in the heart during MI and its overexpression induced cardiac remodelling, we postulated that Gadd45 γ deletion would prevent cardiac remodelling after MI. To test this hypothesis, we studied the cardiac function and the remodelling process after MI in WT or Gadd45 γ KO mice (*Figure 4A*). Cardiac infarct size measured 48 h after LAD ligation was similar between WT and KO mice (see Supplementary material online, *Figure S3A and B*). Pre-MI, WT and KO hearts had comparable chamber dimensions and ventricular function, but as early as 1 week post-MI, KO animals displayed significantly less dilated hearts and had preserved cardiac function compared with WT littermates (see Supplementary material online, *Table S2*). Interestingly, LV dilatation and dysfunction remained more marked in the MI WT group than the MI KO group, up to the termination of the study ($P < 0.05$; *Figure 4B*). Twenty-eight days after ischaemic injury, each group was analysed by invasive haemodynamic with LV PV loop analysis under anaesthesia. MI WT mice demonstrated a significant decrease in cardiac output and ejection fraction and deterioration in the PV relationship ($P < 0.05$; see Supplementary material online, *Table S2; Figure 4C and D*). In contrast, MI Gadd45 γ KO mice did not show a significant loss in functional performance or the rightward shift in the PV relationship during either diastole or systole, compared with sham mice (see Supplementary material online, *Table S2; Figure 4C and D*).

Twenty-eight days after MI, mice were analysed for morphometry and histology. HW/BW ratio was significantly decreased in Gadd45 γ KO mice after MI compared with WT mice, suggesting decreased

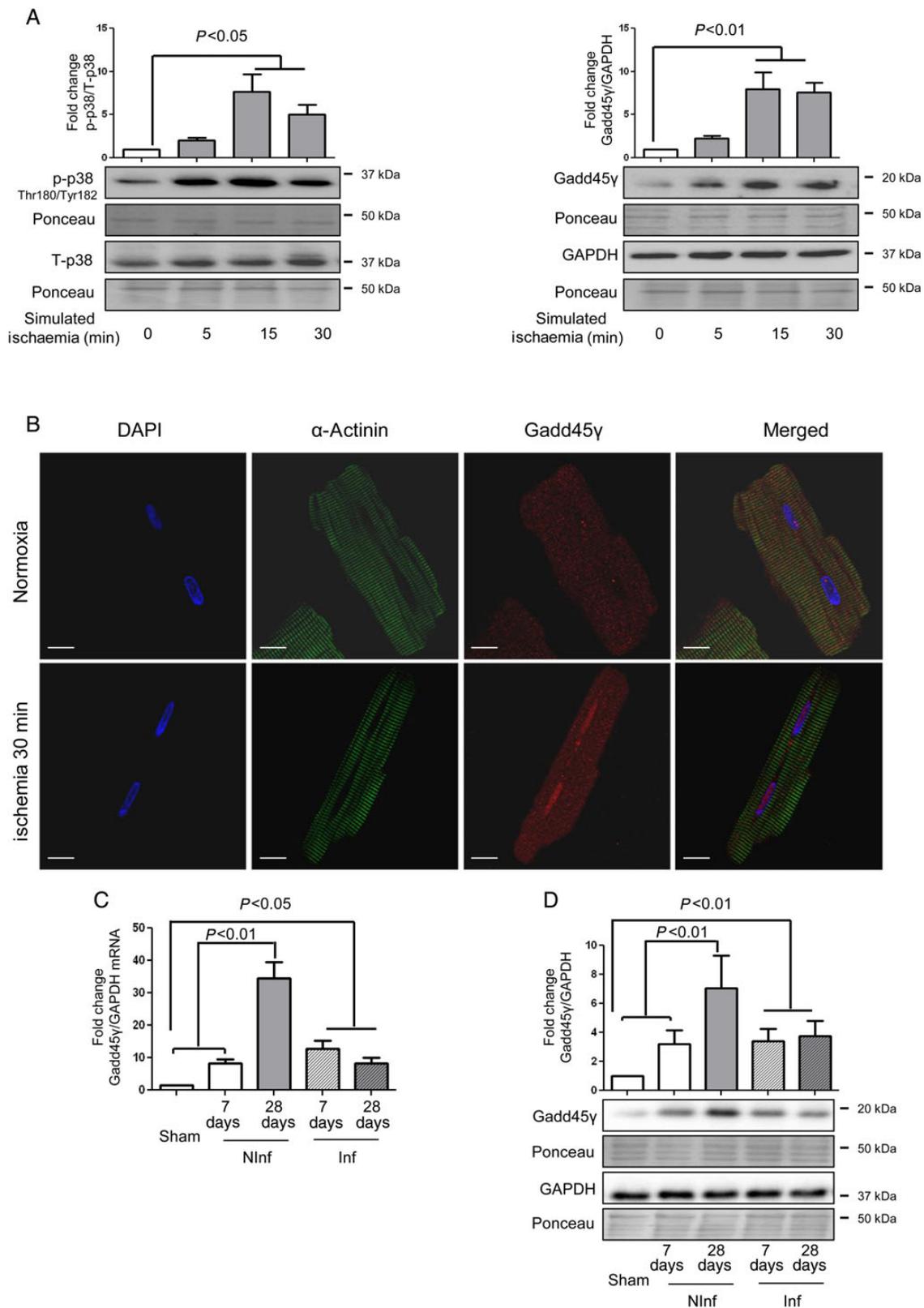


Figure 1 Relative expression of Gadd45 γ in cardiomyocytes during ischaemia. (A) Representative immunoblots and quantification showing the expression of phospho-p38 MAPK, total p38 MAPK, Gadd45 γ , and Ponceau S staining in isolated cardiomyocytes subjected to simulated ischaemia for up to 30 min ($n = 4$ /group). (B) Representative confocal images showing that Gadd45 γ is overexpressed mostly in nucleus of isolated cardiomyocytes after 30 min of simulated ischaemia (scale: 15 μ m) ($n = 3$ /group). (C) Quantitative PCR analysis showing an increase in Gadd45 γ mRNA levels after 7 and 28 days of permanent LAD ligation in non-infarcted area (NInf) and infarcted area (Inf; $n = 6$ /group). (D) Representative immunoblots and quantification showing Gadd45 γ , GAPDH expression, and Ponceau S staining after 7 and 28 days of permanent LAD occlusion in NInf and Inf area ($n = 3$ /group). Results are expressed as means \pm SEM.

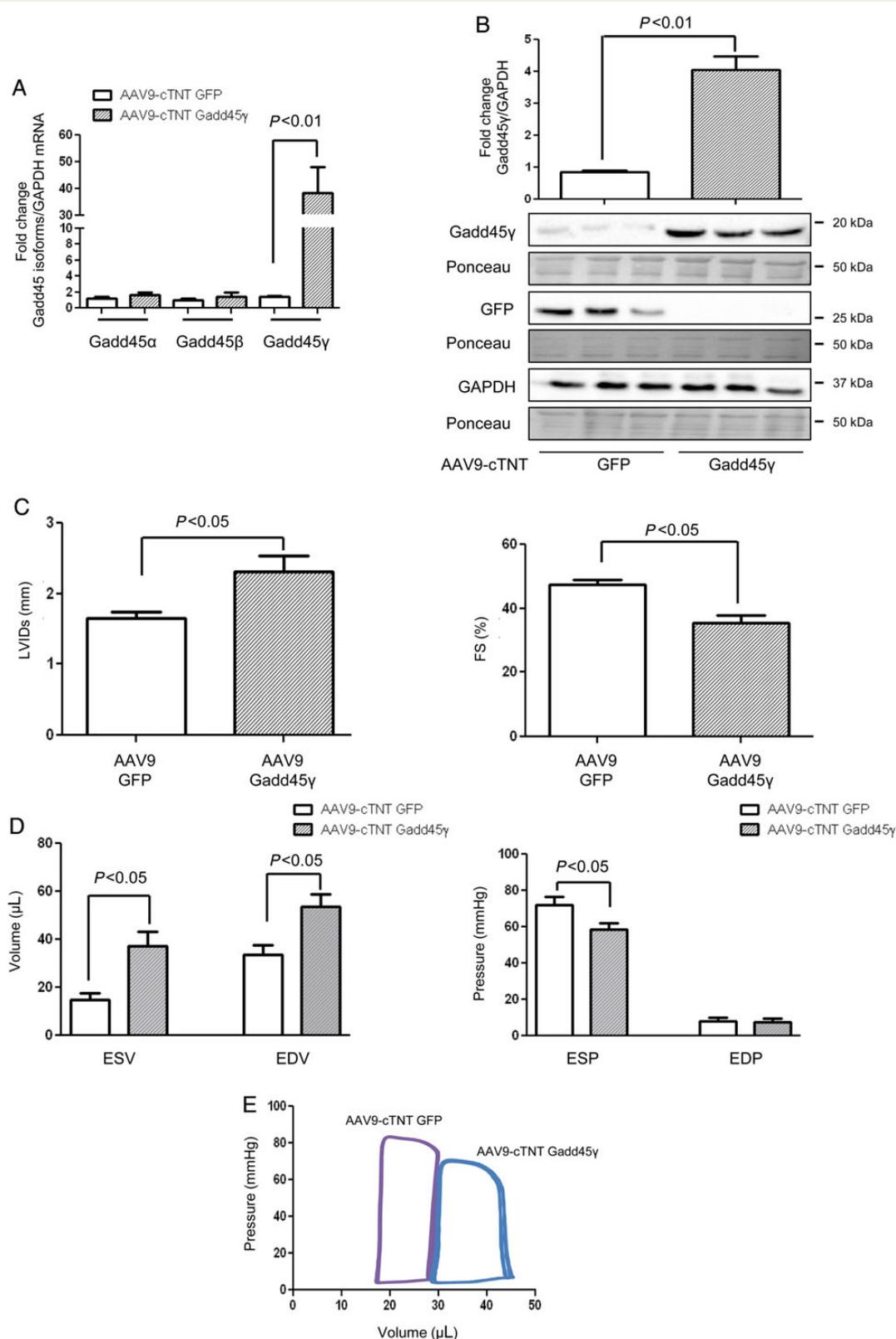


Figure 2 Functional effect of cardiomyocyte-specific Gadd45 γ overexpression on cardiac function 28 days after AAV9 transduction. (A) mRNA expression by real-time RT-PCR of Gadd45 α , Gadd45 β , and Gadd45 γ in the hearts of mice transduced with AAV9-cTNT-Gadd45 γ compared with AAV9-cTNT-GFP ($n = 6$ /group). (B) Representative immunoblots and quantification of Gadd45 γ , GFP, GAPDH expression, and Ponceau S staining in cardiomyocytes ($n = 3$ /group). (C) Echocardiographic data of AAV9-cTNT GFP and AAV9 cTNT-Gadd45 γ -exposed mice with LVIDs and FS ($n = 11$ /group). (D and E) Invasive haemodynamic assessment by analysis of murine LV pressure–volume loops collected under anaesthesia ($n = 11$ /group). In (D) end-systolic (ESV) and end-diastolic (EDV) volumes appear on the left and end-systolic (ESP) and end-diastolic (EDP) pressures appear on the right. Results are expressed in means \pm SEM.

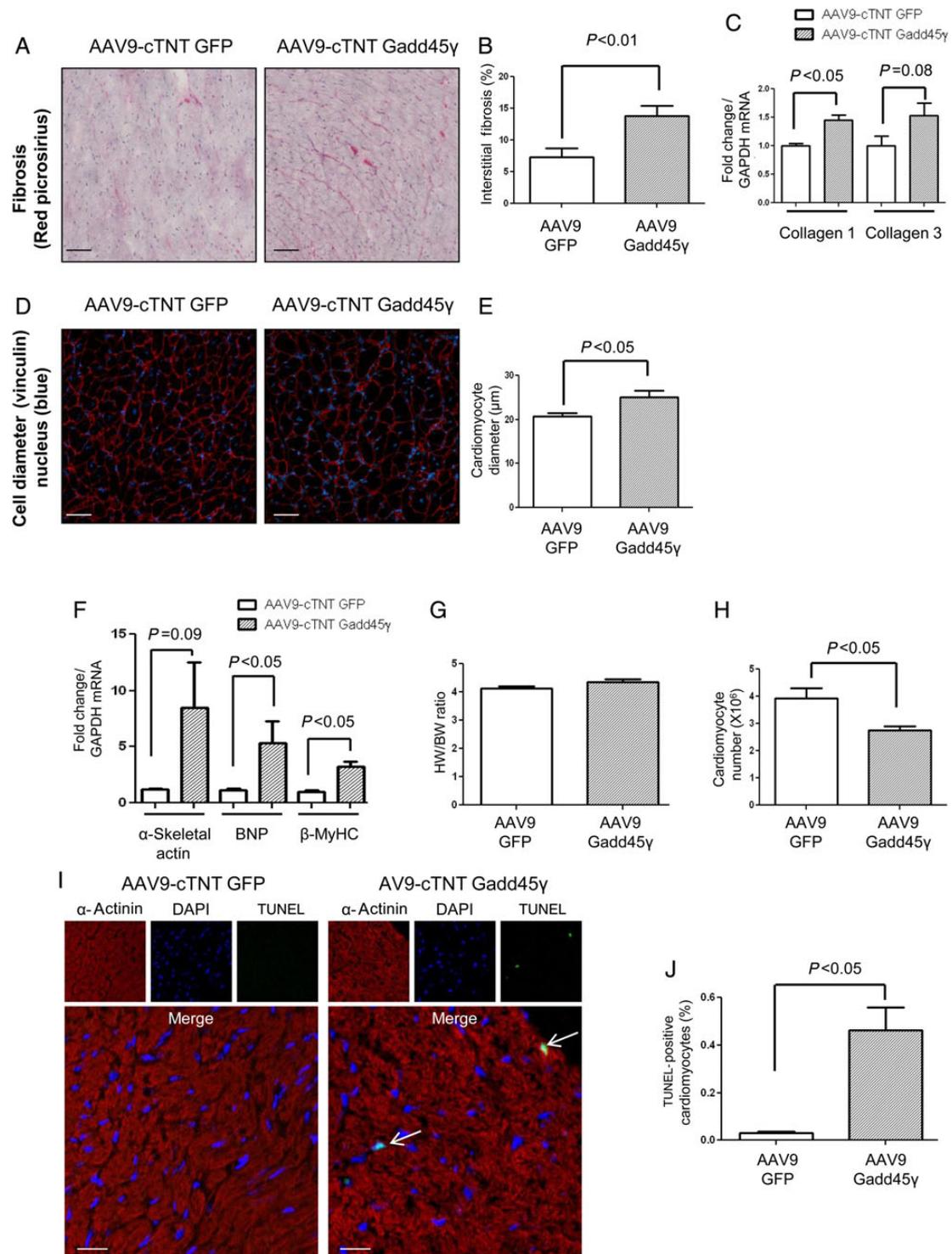


Figure 3 Impact of Gadd45 γ overexpression on cardiac morphometry and histology 28 days after AAV9-cTNT-Gadd45 γ or AAV9-cTNT-GFP injection. (A) Representative images of picosirius red staining in AAV9-treated hearts. (B) Picosirius red quantification showing an increase in fibrosis in AAV9 cTNT-Gadd45 γ -treated animals (scale 50 μ m; $n = 11$ /groups). (C) Cardiac collagen-1 and -3 mRNA expression by real-time RT-PCR in AAV9 cTNT-Gadd45 γ -injected animals compared with AAV9-GFP-injected mice ($n = 11$ per group). (D) Representative images of vinculin immunostaining in cardiac cryosections from AAV9-treated mice. (E) Quantification of cardiomyocyte diameter in AAV9 cTNT-Gadd45 γ -injected animals compared with GFP ($n = 11$ /groups). (F) Cardiac mRNA expression of α -skeletal actin, BNP, and β -MyHC by real-time RT-PCR in AAV9 cTNT-Gadd45 γ -injected animals compared with AAV9-GFP-injected mice ($n = 11$ per group). (G) HW/BW ratios in AAV9 cTNT-Gadd45 γ - and AAV9 cTNT-GFP-injected animals ($n = 11$ /group). (H) Quantification of the absolute number of cardiomyocytes in cryosections of AAV9-cTNT Gadd45 γ or GFP hearts stained with vinculin ($n = 11$ /group). (I) Representative images showing cardiomyocytes positive for terminal deoxynucleotidyl-transferase dUTP nick-end labelling (TUNEL) from AAV9 cTNT-Gadd45 γ - and AAV9 cTNT-GFP-injected animals (scale = 40 μ m; $n = 11$ /group). (J) Quantification of the number of TUNEL-positive cardiomyocytes as a percentage of total cardiomyocytes ($n = 11$ /group). Results are expressed in means \pm SEM.

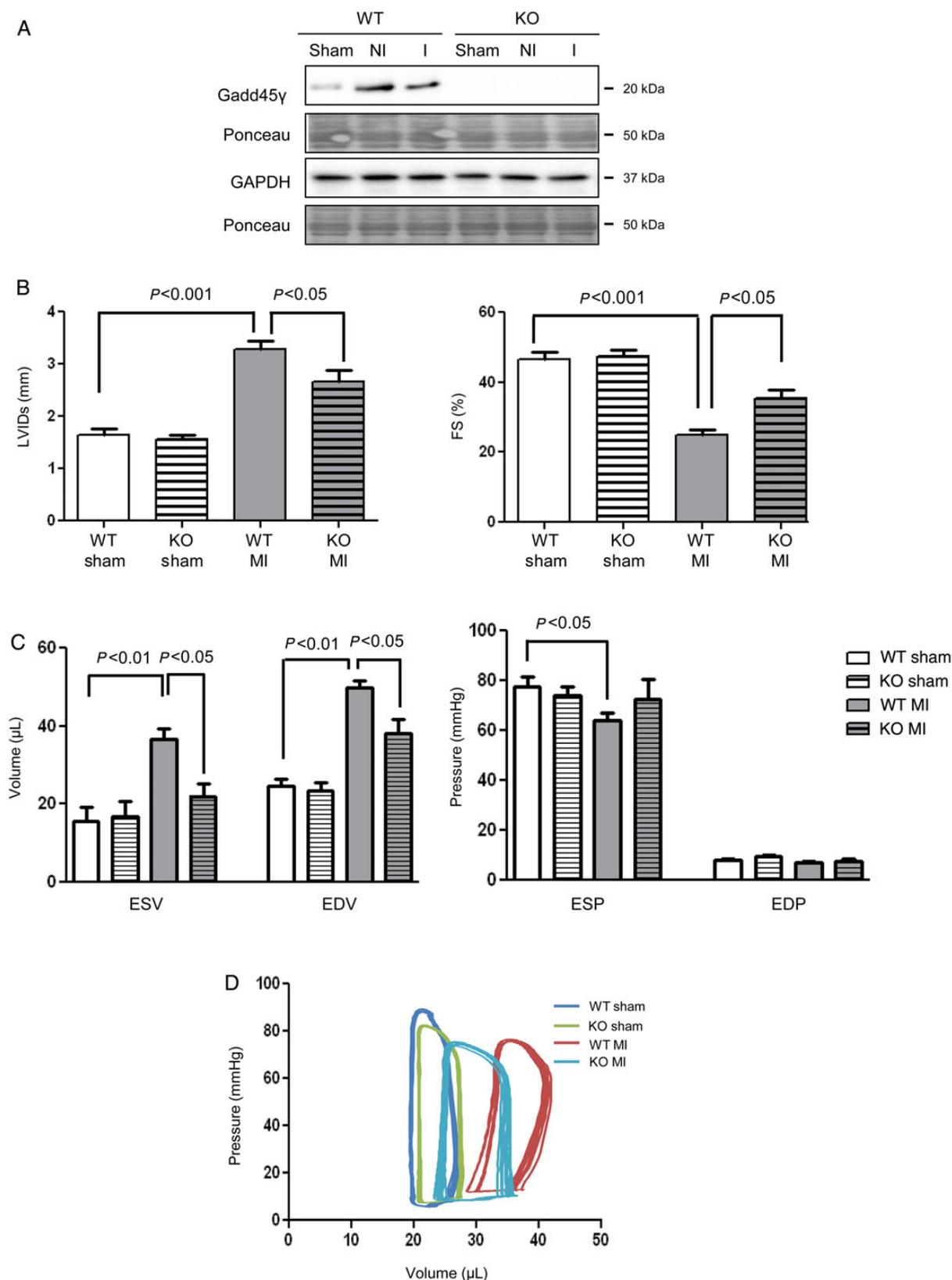


Figure 4 Gadd45 γ KO mice are protected from HF following MI compared with WT animals. (A) Representative immunoblots of Gadd45 γ expression 28 days following MI in the myocardium of WT and KO mice ($n = 4$ /group). (B) Echocardiography data of WT and Gadd45 γ KO animals 28 days after sham surgery or permanent LAD ligation with LVIDs and FS ($n = 12$ /groups). (C and D) Invasive haemodynamic assessment by analysis of murine LV pressure–volume loops collected under anaesthesia. In (C), end-systolic (ESV) and end-diastolic (EDV) volumes appear on the left and end-systolic (ESP) and end-diastolic (EDP) pressures appear on the right. Measurements were made 28 days after sham surgery or LAD ligation in WT and Gadd45 γ KO animals ($n = 12$ /group). Results are expressed in means \pm SEM.

post-MI hypertrophy and HF in Gadd45 γ -deficient hearts (Figure 5A). Next, we examined the re-expression of foetal gene as a marker of pathological hypertrophy and found a significant increase in α -skeletal actin, BNP, and β -MyHC at 4 weeks post-MI in WT mice, while this increase was much less pronounced in the KO mice ($P < 0.05$, Figure 5B–D).

The extent of myocardial fibrosis was determined on histological sections at 4 weeks post-MI. We observed a very marked decrease in the scar circumference and interstitial fibrosis, but no difference in the scar thickness, in KO hearts compared with WT hearts (Figure 5E–H). In addition, collagen mRNA expression was decreased in the KO hearts (Figure 5I). We postulated that the improved cardiac function and remodelling process observed in KO animal was associated with less cardiomyocyte apoptosis. Interestingly, we found a 45% decrease of TUNEL-positive cardiomyocyte at 48 h (data not shown) and 28 days after MI (Figure 5J and K) in the remote myocardium.

3.4 Gadd45 γ induces RIP1 and caspase-8 cleavages to promote cardiomyocyte death in a p38 MAPK-dependent manner

We investigated the mechanisms by which Gadd45 γ influenced cell death by immunoblot analysis of the proteins involved in the regulation of apoptotic signalling in ischaemic myocardium in which Gadd45 γ was increased (Figure 6A–D) or deleted (Figure 6E–I).

Gadd45 γ overexpression in cardiomyocytes 4 weeks after AAV9-cTNT Gadd45 γ injection resulted in increased p38 MAPK phosphorylation (Figure 6A), Bax overexpression (Figure 6B), and cleaved forms of RIP1 and caspase-8 (Figure 6C and D). In WT animals, 1 day or 28 days after permanent LAD ligation, we found a significant increase in the phosphorylation of p38 MAPK (Figure 6E), native and cleaved RIP1 (Figure 6F), and cleaved caspase-8 (Figure 6G) in both infarcted and non-infarcted myocardium. Conversely, in Gadd45 γ KO myocardium, these changes were attenuated in both the early and late remodelling phases (Figure 6E–G). In addition, apoptosis was prevented since both Bax and cleaved caspase-3 expressions were diminished in KO hearts compared with WT hearts after MI (Figure 6H and I). Thus, our results suggest that Gadd45 γ may regulate p38 MAPK, RIP1, and caspase-8 activity to induce cardiomyocyte apoptosis. It is interesting to note that Gadd45 γ does not modulate Tp38 expression (see Supplementary material online, Figure S4A and B), but only its phosphorylation.

Next, we investigated whether the pro-apoptotic effect of Gadd45 γ was dependent on p38 MAPK activation, RIP1 and caspase-8 *in vitro*. To address this question, we overexpressed Gadd45 γ in neonatal cardiomyocytes and measured apoptotic markers. Gadd45 γ overexpression increased the number of TUNEL-positive nuclei and activated specific apoptotic signals, including p38 MAPK and its downstream substrate HSP27, cleaved RIP1, cleaved caspase-8, and cleaved caspase-3, in neonatal cardiomyocytes (Figure 7A–C). On the other hand, Gadd45 γ overexpression did not seem to activate necrosis since LDH release was not increased in neonatal cardiomyocytes (see Supplementary material online, Figure S5A). In addition, in cardiomyocytes subjected to simulated ischaemia, LDH release was not modified by Gadd45 γ deletion (see Supplementary material online, Figure S5B). We next measured whether the pro-apoptotic effect of Gadd45 γ was dependent on p38 MAPK activation. The use of the p38 MAPK inhibitor SB203580 significantly decreased apoptotic cardiomyocytes and was associated with a reduction of HSP27 phosphorylation and the cleaved

forms of RIP1, caspase-8, and caspase-3 (Figure 7A–C). To confirm the role of RIP1/caspase-8 in this signalling pathway, we used a silencing RNA strategy. Either siRNA RIP1 or siRNA caspase-8 significantly reduced the number of apoptotic cells and decreased cleaved caspase-3 induced by Gadd45 γ overexpression (Figure 7A, B, D, and E). These results demonstrate that Gadd45 γ overexpression activates p38 MAPK and promotes cardiomyocyte apoptosis through a RIP1/caspase-8-dependent mechanism.

4. Discussion

Our work demonstrates for the first time the critical importance of Gadd45 γ in the development and persistence of HF after MI, particularly in the balance of the cell death process. Using *in vivo* and *in vitro* approaches, we were able to characterize the signalling pathway involved in Gadd45 γ -dependent cell death through p38 MAPK phosphorylation. We observed that Gadd45 γ was significantly increased in the heart following MI.

Due to the relative inability of adult cardiomyocytes to divide and according to the nature of the signalling stimulus, the cardiomyocyte can either survive, leading to beneficial or maladaptive hypertrophy, or undergo apoptosis (programmed cell death), which promotes LV failure and dilatation. Here, the Gadd45 γ KO mice had significantly less remodelling and better cardiac function than the WT mice following the induction of MI. In addition, the Gadd45 γ overexpression in cardiomyocytes using AAV9 is associated with the development of HF. The ongoing cell loss due to apoptosis 4 weeks after AAV9-cTNT Gadd45 γ injection *in vivo* was significantly greater than the AAV9-cTNT GFP-injected mice. Thus, we believe that the ongoing remodelling is driven by continued cell loss when Gadd45 γ is overexpressed. The mechanism by which Gadd45 γ promotes cardiac dysfunction can be attributed to an activation of p38 MAPK signalling pathway.

The role of p38 MAPK in Gadd45-mediated apoptotic cell death has been demonstrated in some other cell types.²⁶ Indeed, our data are supported by other studies focused on the role of Gadd45 in cancer cells, which show that the repression of expression has been considered as a survival mechanism, as cancer cells with low Gadd45 can evade the apoptotic pathway.^{27,28} In our work, Gadd45 γ overexpression can activate a number of apoptotic proteins and therefore participated in cardiac cell death. The signalling pathway by which Gadd45 γ /p38 MAPK promotes specifically cardiac cell death is complex and incompletely understood. Recently, it has been demonstrated that p38 MAPK could regulate apoptosis through RIP1.²⁹ RIP1 is known to induce cardiac cell death as its inhibition with necrostatin reduces myocardial cell death and infarct size.^{30,31} We found that cardiomyocyte death induced by Gadd45 γ overexpression is dependent on caspase-8 and RIP1 (Figure 7). In response to stress, caspase-8 plays an essential role in the regulation of apoptotic and non-apoptotic signalling pathways. RIP1 can be cleaved by caspase-8, abrogating NF- κ B activation and together with the cleaved product, interacts with TRADD and FADD, leading to an increase of death receptor-induced apoptosis.³² Using SB203580, we were able to reduce cardiomyocyte death (Figure 7A–C) induced by Gadd45 γ overexpression. Our results demonstrate for the first time that Gadd45 γ regulates the cleavage of the necroptotic RIP1 and caspase-8 in a p38 MAPK-dependent manner during MI.

In cardiomyocytes, the impact of Gadd45 isoforms on p38 MAPK activity is unexplored. All Gadd45 family members bind a non-catalytic autoinhibitory region in the N-terminal portion of the kinase MEKK4 (also known as MTK1), and this binding relieves autoinhibition and

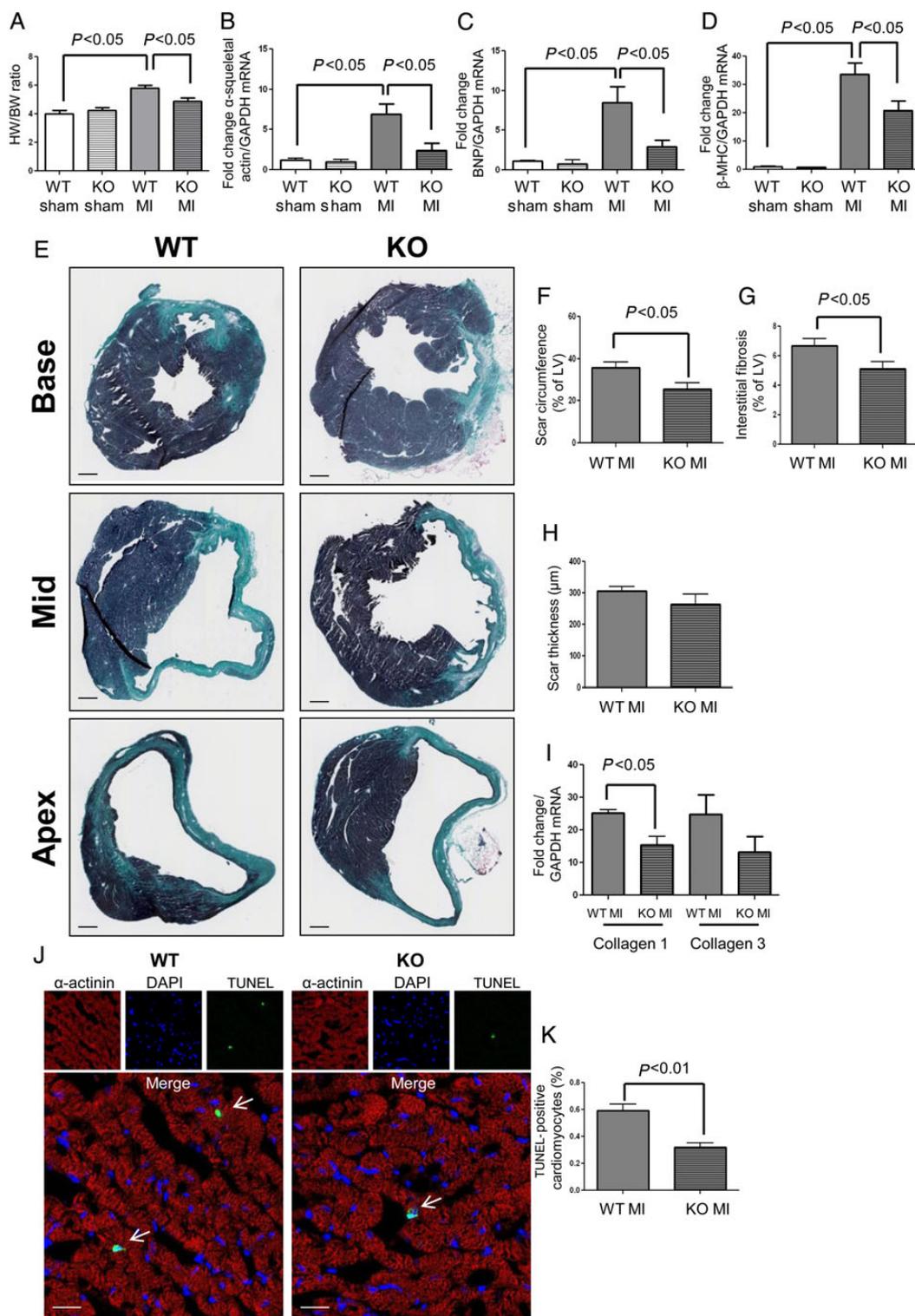


Figure 5 Morphometric and histological analysis of WT and Gadd45 γ KO animals 28 days post-MI. (A) HW/BW ratios ($n = 12$ /group). (B–D) Relative expression by real-time RT-PCR of α -skeletal actin (B), BNP (C), and β -MyHC (D) as markers of pathological hypertrophy in the WT and Gadd45 γ KO with or without MI ($n = 12$ /group). (E) Representative images of Masson's trichrome staining on cryosections from base to apex in WT and Gadd45 γ KO hearts 28 days after MI. (F) Scar circumference was measured and expressed as per cent of total area of LV myocardium ($n = 8$). (G) Interstitial myocardial fibrosis was measured and expressed as per cent of total area of remote ventricle in KO heart compared with WT 28 days after MI (scale 500 μ m). Results are expressed in means \pm SEM ($n = 8$ /groups). (H) Scar thickness measurement in WT and KO mice 28 days after MI ($n = 8$). (I) Collagen-1 and -3 mRNA expression by real-time RT-PCR in Gadd45 γ KO heart compared with WT 28 days after MI ($n = 8$ per group). (J) Representative images showing cardiomyocyte positive on TUNEL from the remote area of WT and Gadd45 γ KO hearts 28 days after MI (scale = 40 μ m; $n = 7$ /group). (K) Quantification of TUNEL-positive cardiomyocytes in Gadd45 γ KO hearts and WT hearts 28 days after MI ($n = 11$ /group). Results are expressed in means \pm SEM.

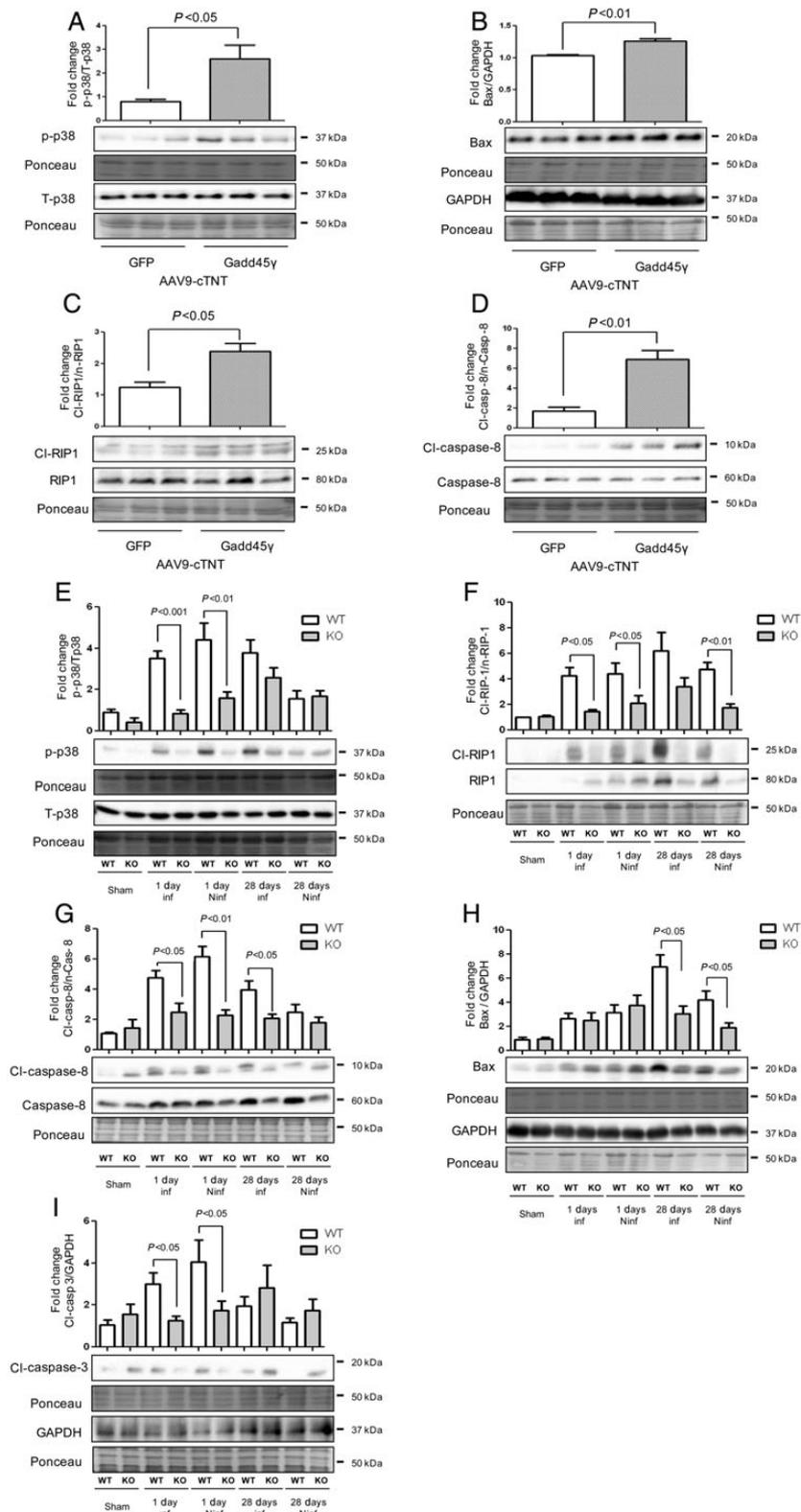


Figure 6 (A–D) Gadd45 γ overexpression increases cell death protein markers in the heart. Representative immunoblots and quantification showing the expression pattern of (A) p-p38, T-p38 with Ponceau S staining, (B) Bax expression pattern against GAPDH with Ponceau S staining, (C) native and cleaved RIP1 with Ponceau S staining, (D) native and cleaved caspase-8 with Ponceau S staining in WT AAV9 cTNT-GFP- or -Gadd45 γ -injected animals. Results are expressed in means \pm SEM ($n = 6$ /groups). (E–I) Gadd45 γ KO decreases ischaemia-induced cell death proteins markers in the heart after 28 days of permanent LAD ligation. Representative immunoblots and quantification showing the expression pattern of (E) p-p38, T-p38 with Ponceau S staining, (F) native and cleaved RIP1 with Ponceau S staining, (G) native and cleaved caspase-8 with Ponceau S staining, (H) Bax expression against GAPDH with Ponceau S staining, (I) cleaved caspase-3 against GAPDH with Ponceau S staining in WT and Gadd45 γ KO animals after sham operation, or after 1 day and 28 days of MI in NInf and Inf area. Results are expressed in means \pm SEM ($n = 5$ /groups).

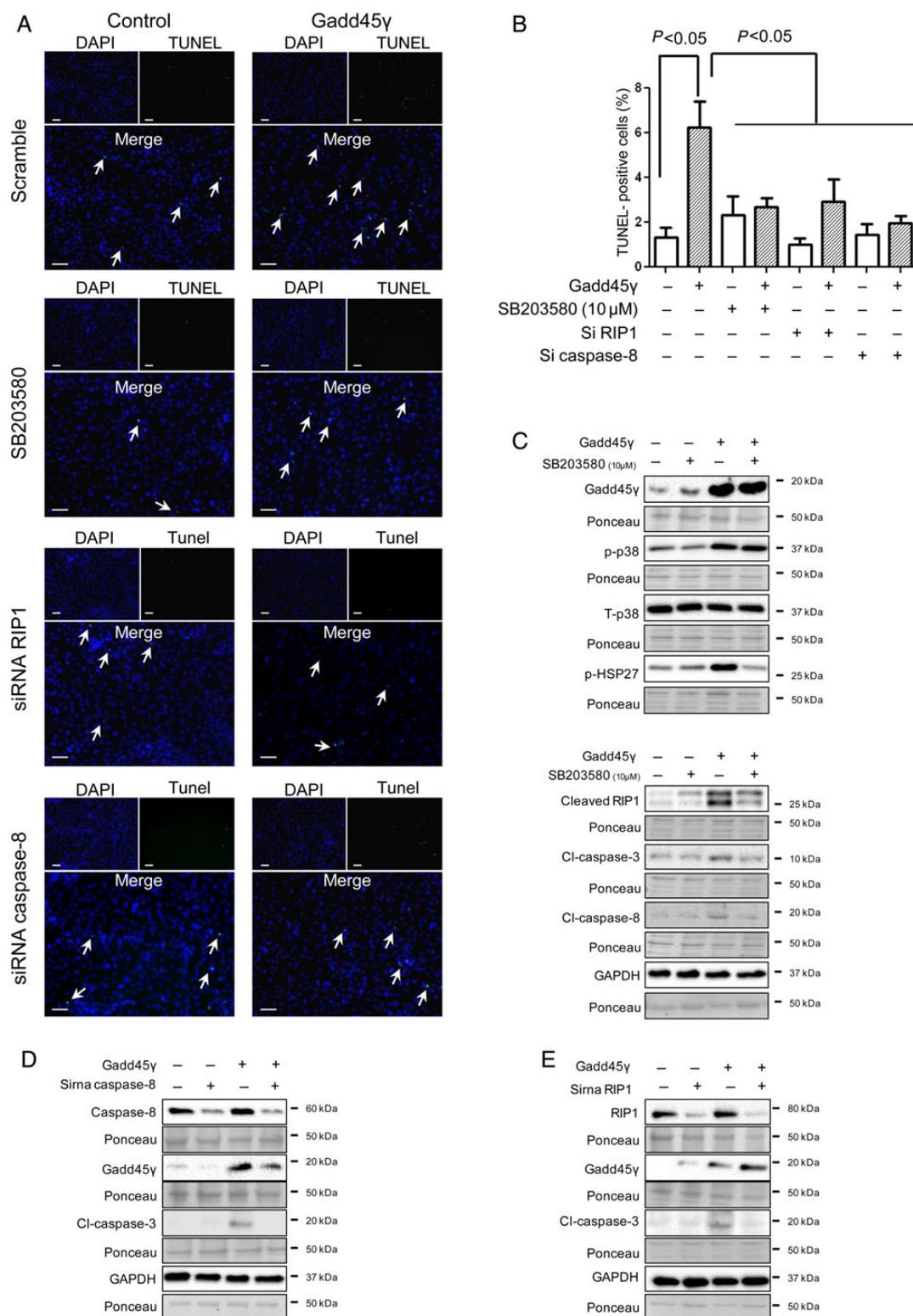


Figure 7 Gadd45 γ promotes cardiomyocyte death in a p38 MAPK-, RIP1-, and caspase-8-dependent manner. (A) Representative images showing cardiomyocyte nuclei positive for TUNEL in neonatal cardiomyocytes with or without Gadd45 γ overexpression in the presence of scrambled siRNA, RIP1 siRNA, caspase-8 siRNA, or SB203580 (10 μ M). (B) Quantification showing the number of TUNEL-positive myocyte nuclei as a per cent of total nuclei (DAPI staining) after Gadd45 γ overexpression ($n = 9$). (C) Representative immunoblots showing the expression pattern of p-p38, T-p38, p-HSP27, cleaved caspase-8, cleaved RIP1, cleaved caspase-3, Gadd45 γ , GAPDH, and Ponceau S staining in neonatal cardiomyocytes subjected to Gadd45 γ overexpression with or without 10 μ M of SB203580 ($n = 6-9$). Values are mean \pm SEM. (D) Representative immunoblots showing the expression pattern of caspase-8, cleaved caspase-3, Gadd45 γ , GAPDH, and Ponceau S staining in neonatal cardiomyocytes subjected to Gadd45 γ overexpression with or without caspase-8 siRNA ($n = 6-9$). (E) Representative immunoblots showing the expression pattern of RIP1, cleaved caspase-3, Gadd45 γ , GAPDH, and Ponceau S staining in neonatal cardiomyocytes subjected to Gadd45 γ overexpression with or without RIP1 siRNA ($n = 6-9$).

activates MTK1, and therefore promotes the classical canonical activation of p38 MAPK.^{33,34}

The exact mechanism by which p38 MAPK is able to activate RIP1/caspase-8 is not exactly known, but we postulate that it is through the inhibition of TAK1. In 2003, Cohen's group elegantly demonstrate that p38 MAPK is able to inhibit TAK1 activation through TAB1.³⁵ TAK1 activity seems to play a major role during MI, as its activation was able to promote cellular survival after ischaemia–reperfusion injury³⁶ while its inhibition induced cardiomyocyte death and remodelling through the activation of the necroptosis complex (RIP1/RIP3/caspase-8).^{37,38} In the present study, we investigated the phosphorylation status of TAK1 with or without Gadd45 γ , and found that the absence of Gadd45 γ induced TAK1 phosphorylation in the remote zone after MI compared with the WT animals (see Supplementary material online, Figure S6A), whereas the overexpression of Gadd45 γ reduced TAK1 phosphorylation (see Supplementary material online, Figure S6B). In conclusion, we demonstrate that Gadd45 γ overexpression during MI activates p38 MAPK, which promotes TAK1 inhibition, in turn activating the RIP1/caspase-8 axis to induce apoptosis. Our work clearly identifies Gadd45 γ as a therapeutic target in the development of HF and suggests that limiting its pro-apoptotic activity after MI will limit maladaptive remodelling.

5. Limitations of this study

The *in vivo* results of MI remodelling presented in this study are based on a global KO of Gadd45 γ and despite the fact that we used several methods to study the molecular pathway in isolated cardiomyocytes, we cannot guarantee that Gadd45 γ deficiency of other cell types may have contributed to the observed effects on the heart. In addition, Gadd45 γ overexpression in cardiomyocytes (AAV9-cTNT strategy) cause an absolute loss of cardiomyocytes due to an increase in apoptotic events, but the 3D stereologic analysis used in the study is an indirect read-out of absolute number of cardiomyocytes and the TUNEL-positive α -actinin double staining cannot exactly determine which the cell types are TUNEL-positive nuclear signal, even when interrogating with a confocal microscope. In another way, our work cannot exclude the role of Gadd45 γ in inflammatory cells or fibroblasts in the contribution of the development of cardiac remodelling after MI. Furthermore, our report does not provide a comparison between apoptotic and necroptotic cell death in the development of cardiac remodelling process after MI. Consequently, we cannot definitively conclude that apoptosis is the principal form of cell death in post-ischaemic myocardial damage. Nevertheless, we believe that the alteration of myocardial remodelling after Gadd45 γ overexpression in mice demonstrates an important role of the apoptotic signalling pathway in cardiac remodelling and does not seem to involve necrosis (see Supplementary material online, Figure S5A and B). Additional studies will be needed to compare the relative contribution of each form of cell death in this disease model.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

Acknowledgements

We gratefully thank Marianne Dutaur (INSERM UMR-1048) and Madjid Zanoun (confocal microscope, INSERM UMR-1048) for their technological assistances. We are grateful to Cédric Baudelin and their

staff for animal housing (UMS US006/INSERM/UPS). We thank Frank Lezoualc'h for the critical reading of the manuscript (INSERM UMR-1048).

Conflict of interest: none declared.

Funding

This work was supported by grants from Fondation pour la Recherche Medicale (FRM to P.S.), Fondation Cœur et Recherche (to P.S. and A.L.), and l'Association Française contre les Myopathies (AFM; to P.S.) and from INSERM (to A.P.).

References

- Salvador JM, Brown-Clay JD, Fornace AJ Jr. Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 2013;**793**:1–19.
- Hollander MC, Fornace AJ Jr. Genomic instability, centrosome amplification, cell cycle checkpoints and Gadd45a. *Oncogene* 2002;**21**:6228–6233.
- Vairapandi M, Balliet AG, Hoffman B, Liebermann DA. GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. *J Cell Physiol* 2002;**192**:327–338.
- Bulavin DV, Kovalsky O, Hollander MC, Fornace AJ Jr. Loss of oncogenic H-ras-induced cell cycle arrest and p38 mitogen-activated protein kinase activation by disruption of Gadd45a. *Mol Cell Biol* 2003;**23**:3859–3871.
- Kim MY, Seo EJ, Lee DH, Kim EJ, Kim HS, Cho HY, Chung EY, Lee SH, Baik EJ, Moon CH, Jung YS. Gadd45beta is a novel mediator of cardiomyocyte apoptosis induced by ischaemia/hypoxia. *Cardiovasc Res* 2010;**87**:119–126.
- Liu L, Zhu J, Glass PS, Brink PR, Rampil IJ, Rebecchi MJ. Age-associated changes in cardiac gene expression after preconditioning. *Anesthesiology* 2009;**111**:1052–1064.
- Rysa J, Aro J, Ruskoaho H. Early left ventricular gene expression profile in response to increase in blood pressure. *Blood Press* 2006;**15**:375–383.
- Steenbergen C, Afshari CA, Petranka JG, Collins J, Martin K, Bennett L, Haugen A, Bushel P, Murphy E. Alterations in apoptotic signaling in human idiopathic cardiomyopathic hearts in failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;**284**:H268–H276.
- Wang J, Wang H, Chen J, Wang X, Sun K, Wang Y, Wang J, Yang X, Song X, Xin Y, Liu Z, Hui R. GADD45B inhibits MKK7-induced cardiac hypertrophy and the polymorphisms of GADD45B is associated with inter-ventricular septum hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;**372**:623–628.
- Li M, Georgakopoulos D, Lu G, Hester L, Kass DA, Hasday J, Wang Y. p38 MAP kinase mediates inflammatory cytokine induction in cardiomyocytes and extracellular matrix remodeling in heart. *Circulation* 2005;**111**:2494–2502.
- Ren J, Zhang S, Kovacs A, Wang Y, Muslin AJ. Role of p38alpha MAPK in cardiac apoptosis and remodeling after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2005;**38**:617–623.
- Vahebi S, Ota A, Li M, Warren CM, de Tombe PP, Wang Y, Solaro RJ. p38-MAPK induced dephosphorylation of alpha-tropomyosin is associated with depression of myocardial sarcomeric tension and ATPase activity. *Circ Res* 2007;**100**:408–415.
- Gandhi MS, Kamalov G, Shahbaz AU, Bhattacharya SK, Ahokas RA, Sun Y, Gerling IC, Weber KT. Cellular and molecular pathways to myocardial necrosis and replacement fibrosis. *Heart Fail Rev* 2011;**16**:23–34.
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 2010;**8**:e1000412.
- Webb IG, Sicard P, Clark JE, Redwood S, Marber MS. Myocardial stress remodelling after regional infarction is independent of glycogen synthase kinase-3 inactivation. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**49**:897–900.
- Clark JE, Flavell RA, Faircloth ME, Davis RJ, Heads RJ, Marber MS. Post-infarction remodeling is independent of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3). *Cardiovasc Res* 2007;**74**:466–470.
- Budhram-Mahadeo V, Fujita R, Bitsi S, Sicard P, Heads R. Co-expression of POU4F2/Brn-3b with p53 may be important for controlling expression of pro-apoptotic genes in cardiomyocytes following ischaemic/hypoxic insults. *Cell Death Dis* 2014;**5**:e1503.
- Prasad KM, Xu Y, Yang Z, Acton ST, French BA. Robust cardiomyocyte-specific gene expression following systemic injection of AAV: *in vivo* gene delivery follows a Poisson distribution. *Gene Ther* 2011;**18**:43–52.
- Clark JE, Kottam A, Motterlini R, Marber MS. Measuring left ventricular function in the normal, infarcted and CORM-3-preconditioned mouse heart using complex admittance-derived pressure volume loops. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2009;**59**:94–99.
- Levkau B, Schafers M, Wohlschlaeger J, von Wnuck LK, Keul P, Hermann S, Kawaguchi N, Kirchhof P, Fabritz L, Stypmann J, Stegger L, Flögel U, Schrader J, Fischer JW, Hsieh P, Ou YL, Mehrhof F, Tiemann K, Ghanem A, Matus M, Neumann J, Heusch G, Schmid KW, Conway EM, Baba HA. Survivin determines cardiac function by controlling total cardiomyocyte number. *Circulation* 2008;**117**:1583–1593.
- Jacquet S, Nishino Y, Kumphune S, Sicard P, Clark JE, Kobayashi KS, Flavell RA, Eickhoff J, Cotten M, Marber MS. The role of RIP2 in p38 MAPK activation in the stressed heart. *J Biol Chem* 2008;**283**:11964–11971.

22. Villeneuve C, Guilbeau-Frugier C, Sicard P, Lairez O, Ordener C, Duparc T, De PD, Couderc B, Spreux-Varoquaux O, Tortosa F, Garnier A, Knauf C, Valet P, Borchi E, Nediani C, Gharib A, Ovize M, Delisle MB, Parini A, Mialet-Perez J. p53-PGC-1α pathway mediates oxidative mitochondrial damage and cardiomyocyte necrosis induced by monoamine oxidase-A upregulation: role in chronic left ventricular dysfunction in mice. *Antioxid Redox Signal* 2013;**18**:5–18.
23. Sicard P, Clark JE, Jacquet S, Mohammadi S, Arthur JS, O'Keefe SJ, Marber MS. The activation of p38 alpha, and not p38 beta, mitogen-activated protein kinase is required for ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:1324–1328.
24. Romero-Calvo I, Ocon B, Martinez-Moya P, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O, de Medina FS. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem* 2010;**401**:318–320.
25. Lal A, Gorospe M. Ecad, more forms of gene regulation: the gadd45a story. *Cell Cycle* 2006;**5**:1422–1425.
26. Yoo J, Ghiassi M, Jirmanova L, Balliet AG, Hoffman B, Fornace AJ Jr, Liebermann DA, Bottinger EP, Roberts AB. Transforming growth factor-beta-induced apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation. *J Biol Chem* 2003;**278**:43001–43007.
27. Hollander MC, Sheikh MS, Bulavin DV, Lundgren K, Ugeri-Henmueller L, Shehee R, Molinaro TA, Kim KE, Tolosa E, Ashwell JD, Rosenberg MP, Zhan Q, Fernandez-Salguero PM, Morgan WF, Deng CX, Fornace AJ Jr. Genomic instability in Gadd45a-deficient mice. *Nat Genet* 1999;**23**:176–184.
28. Ju S, Zhu Y, Liu L, Dai S, Li C, Chen E, He Y, Zhang X, Lu B. Gadd45b and Gadd45g are important for anti-tumor immune responses. *Eur J Immunol* 2009;**39**:3010–3018.
29. Azijli K, Yuvaraj S, van RI, Flach K, Giovannetti E, Peters GJ, de JS, Kruyt FA. MAPK p38 and JNK have opposing activities on TRAIL-induced apoptosis activation in NSCLC H460 cells that involves RIP1 and caspase-8 and is mediated by Mcl-1. *Apoptosis* 2013;**18**:851–860.
30. Smith CC, Davidson SM, Lim SY, Simpkin JC, Hothersall JS, Yellon DM. Necrostatin: a potentially novel cardioprotective agent? *Cardiovasc Drugs Ther* 2007;**21**:227–233.
31. Koudstaal S, Oerlemans MI, Van der Spoel TI, Janssen AW, Hoefer IE, Doevendans PA, Sluijter JP, Chamuleau SA. Necrostatin-1 alleviates reperfusion injury following acute myocardial infarction in pigs. *Eur J Clin Invest* 2015;**45**:150–159.
32. Ofengeim D, Yuan J. Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;**14**:727–736.
33. Tsuchimochi K, Otero M, Dragomir CL, Plumb DA, Zerbini LF, Liebermann TA, Marcu KB, Komiya S, Ijiri K, Goldring MB. GADD45beta enhances Col10a1 transcription via the MTK1/MKK3/6/p38 axis and activation of C/EBPbeta-TAD4 in terminally differentiating chondrocytes. *J Biol Chem* 2010;**285**:8395–8407.
34. Takekawa M, Saito H. A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell* 1998;**95**:521–530.
35. Cheung PC, Campbell DG, Nebreda AR, Cohen P. Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38alpha. *EMBO J* 2003;**22**:5793–5805.
36. Sicard P, Jacquet S, Kobayashi KS, Flavell RA, Marber MS. Pharmacological postconditioning effect of muramyl dipeptide is mediated through RIP2 and TAK1. *Cardiovasc Res* 2009;**83**:277–284.
37. Li L, Chen Y, Doan J, Murray J, Molkentin JD, Liu Q. Transforming growth factor beta-activated kinase 1 signaling pathway critically regulates myocardial survival and remodeling. *Circulation* 2014;**130**:2162–2172.
38. Luedde M, Lutz M, Carter N, Sosna J, Jacoby C, Vucur M, Gautheron J, Roderburg C, Borg N, Reisinger F, Hippe HJ, Linkermann A, Wolf MJ, Rose-John S, Lullmann-Rauch R, Adam D, Fogel U, Heikenwalder M, Luedde T, Frey N. RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2014;**103**:206–216.

SUPPLEMENTAL DATA

Supplementary Figure 1: Relative expression of Gadd45 γ in normal mouse heart.

Panel A: Immunoblots showing the affinity of each Gadd45 isoform antibodies using an increasing amount of recombinant proteins (RP). **Panel B:** The three antibodies for Gadd45 α , β and γ we tested have similar sensitivity and were able to detect up to 3 ng of recombinant proteins (RP). **Panel C:** Immunoblots showing the expression of Gadd45 α and β isoforms in isolated cardiomyocytes subject to simulated ischemia for 5, 15 and 30 min (n=4/group). **Panel D:** Time course analysis of Gadd45 α and β isoforms expression after 7 and 28 days of permanent LAD occlusion in Ninf and Inf area (n=3/group).

Supplementary Figure 2: Gadd45 γ protein expression is regulated by the ubiquitin proteasome system in stressed cardiomyocytes

Panel A: Effect of an UPS inhibitor (MG132; 10 μ M) on the expression status of Gadd45 γ in Adult cardiomyocytes (n=3/group). **Panel B:** Ubiquitinylation status of Immunoprecipitated Gadd45 γ -Myc-DDK-tagged from neonatal cardiomyocytes subjected to MG132 (n=3/group). **Panel C:** Ubiquitinylation status of Immunoprecipitated Gadd45 γ -Myc-DDK-tagged from neonatal cardiomyocytes subjected to simulated ischemia (n=3/group).

Supplementary Figure 3: Panel A: Representative images showing cardiac infarct size measured after 48h post LAD ligation in WT and Gadd45 γ KO hearts. **Panel B:** Cardiac infarct size were similar between WT and Gadd45 γ KO hearts (n=8/group).

Supplementary Figure 4: Gadd45 γ does not modulate Tp38 expression in the heart.

Panel A: Representative immunoblots and quantification showing the expression pattern of T-p38 with Ponceau S staining in WT AAV9 cTNT-GFP or -Gadd45 γ injected animals. Results are expressed in means \pm S.E.M (n=6/groups). **Panel B:** Representative immunoblots and quantification showing the expression pattern of T-p38 with Ponceau S staining in WT and Gadd45 γ KO animals after sham operation, or after 1 day and 28 days of MI in non-infarcted (NI) and infarcted area (I). Results are expressed in means \pm S.E.M (n=5/groups).

Supplementary Figure 5: LDH release representing necrosis pattern in **Panel A:** isolated adult cardiomyocytes from WT or Gadd45y KO mice exposed to 30 min of simulated ischemia (n= 6/group). **Panel B:** in neonatal cardiomyocytes with or without Gadd45y overexpression (n=6/group).

Supplementary Figure 6: TAK1 phosphorylation status in WT and Gadd45y KO animals and in AAV9-cTNT-Gadd45y or AAV9-cTNT-GFP injection heart.

Panel A: Representative immunoblots of TAK1 phosphorylation in sham WT and KO hearts and after 24h or 28 days LAD ligation (n=3/group). **Panel B:** Representative immunoblots showing the TAK1 phosphorylation in WT AAV9 cTNT-GFP or Gadd45y injected animals (n=4-5/group).

Supplementary Table 1: Echocardiography and hemodynamic analyses of cardiac function 28 days after AAV9-cTNT GFP or Gadd45y injection.

HR: Heart Rate; %FS: Fractional Shortening; LVIDd: left ventricular internal diameter at diastolic phase; LVIDs: left ventricular internal diameter at systolic phase; IVSd: interventricular septal thickness at diastolic phase; IVSs: interventricular septal thickness at systolic phase; LVPWd: left ventricular posterior wall thickness at diastolic phase; LVPWs: left ventricular posterior wall thickness at systolic phase; EF: Ejection fraction; ESP: end systolic pressure; EDS: end diastolic pressure; ESV: end systolic volume; EDV: end diastolic volume; CO: cardiac output; SV: stroke volume; SW: stroke work; E_a : arterial elastance; dp/dt_{max} , indicates maximum first derivative of pressure; dp/dt_{min} , minimum first derivative of pressure; τ , time constant of isovolumic relaxation. Values represent means \pm SEM of n = experiments.

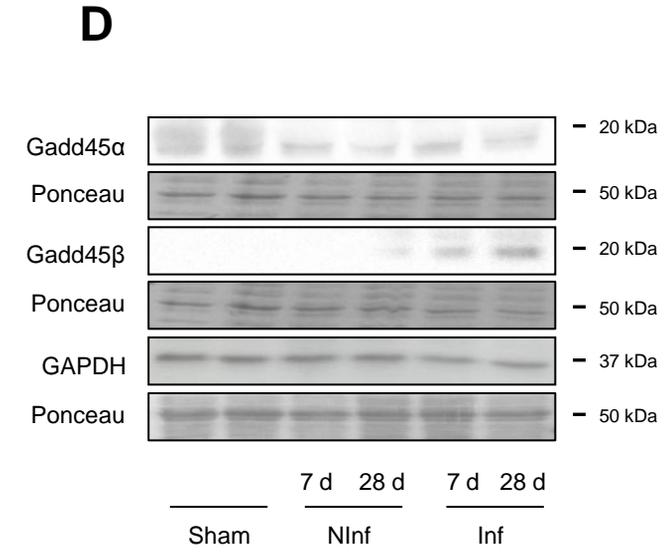
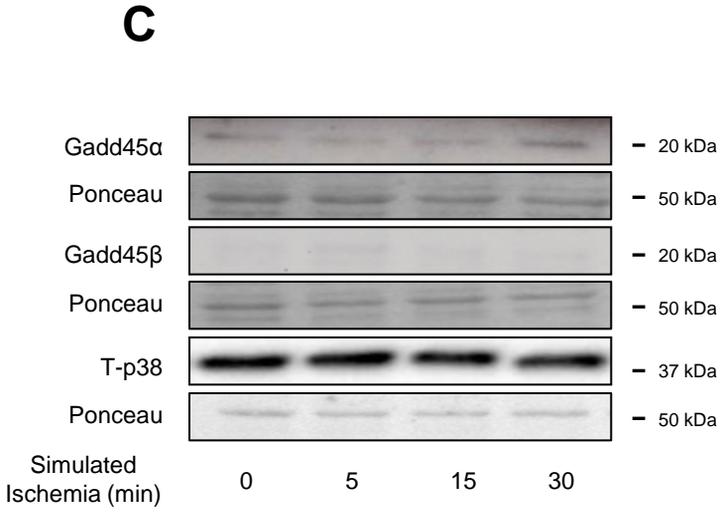
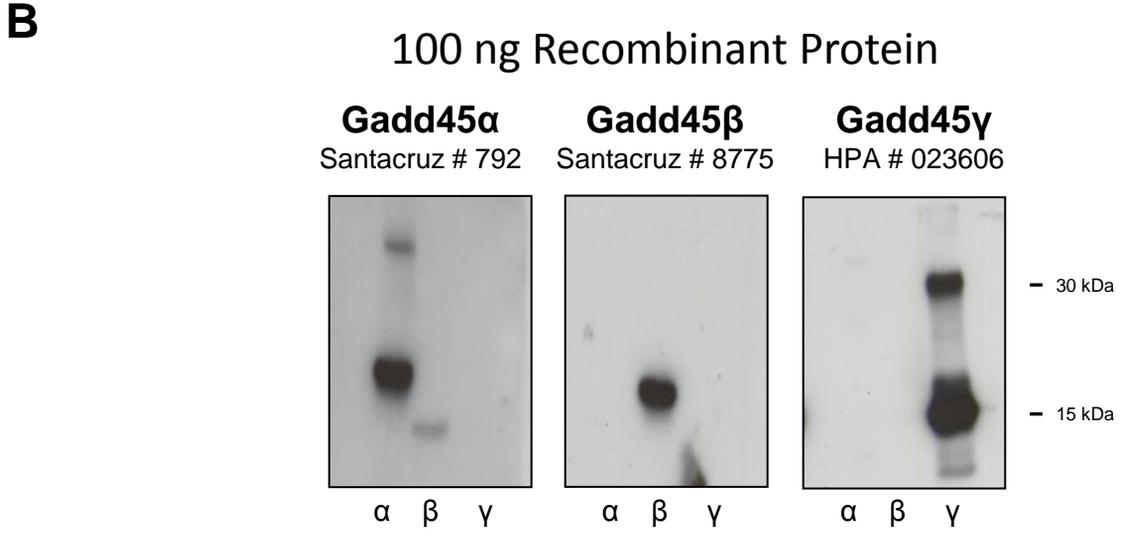
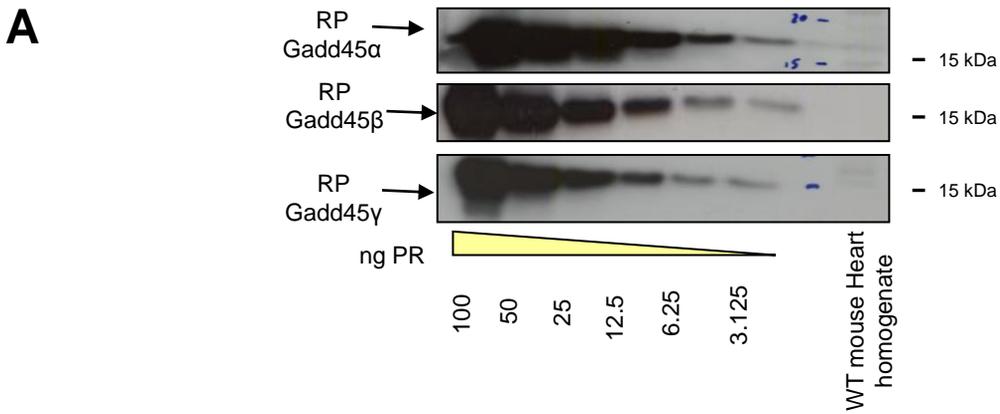
*, p<0.05 vs. AAV9-cTNT GFP **, p<0.001 vs. AAV9-cTNT GFP.

Supplementary Table 2: Echocardiography and hemodynamic analyses of cardiac function 1 and 4 weeks after LAD ligation on WT or Gadd45y KO animals.

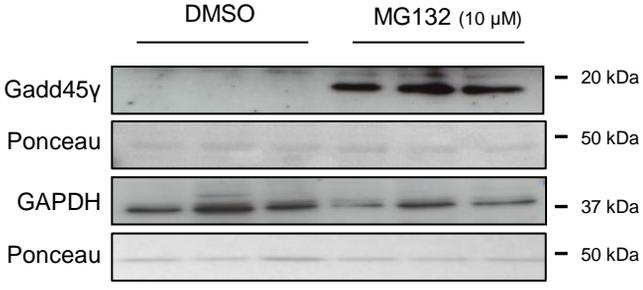
HR: Heart Rate; %FS: Fractional Shortening; LVIDd: left ventricular internal diameter at diastolic phase; LVIDs: left ventricular internal diameter at systolic phase; IVSd: interventricular septal thickness at diastolic phase; IVSs: interventricular septal thickness at systolic phase; LVPWd: left ventricular posterior wall thickness at diastolic phase; LVPWs: left ventricular posterior wall thickness at systolic

phase; EF: Ejection fraction; ESP: end systolic pressure; EDS: end diastolic pressure; ESV: end systolic volume; EDV: end diastolic volume; CO: cardiac output; SV: stroke volume; SW: stroke work; E_a : arterial elastance; dP/dt_{max} , indicates maximum first derivative of pressure; dP/dt_{min} , minimum first derivative of pressure; τ , time constant of isovolumic relaxation; ND: not determined. Values represent means \pm SEM of n = experiments.

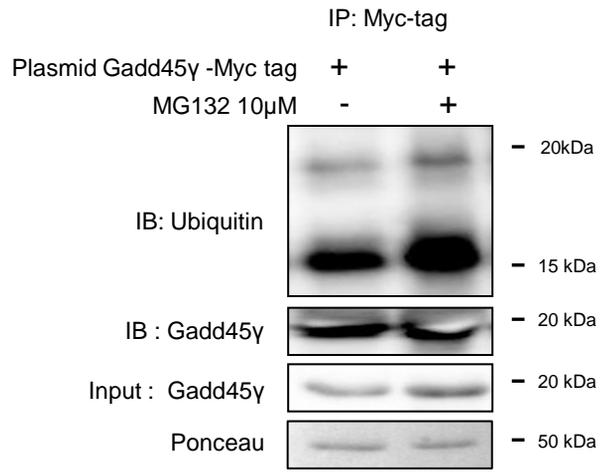
*, $p < 0.05$ vs. respective genotypes after sham operation; **, $p < 0.001$ vs. respective genotypes after sham operation; \$, $p < 0.05$ KO MI vs. WT MI



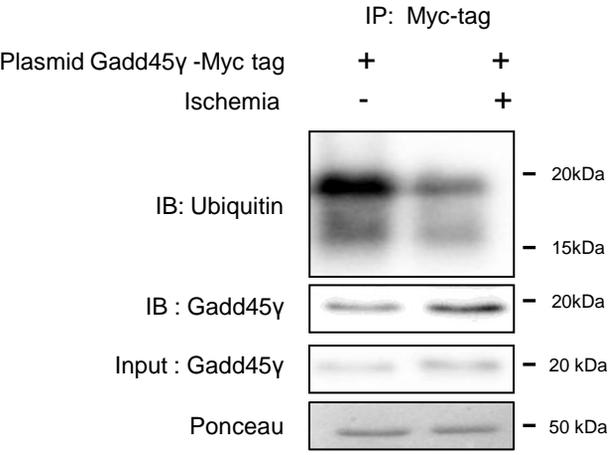
A



B



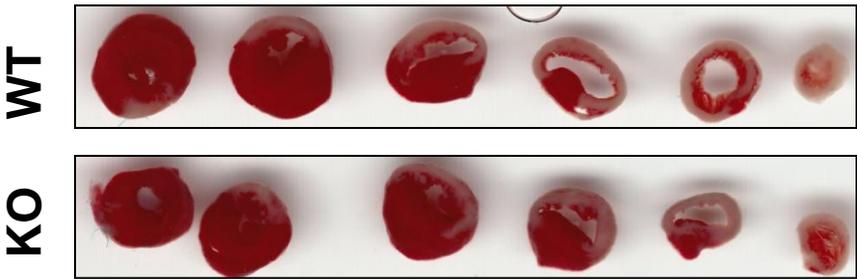
C



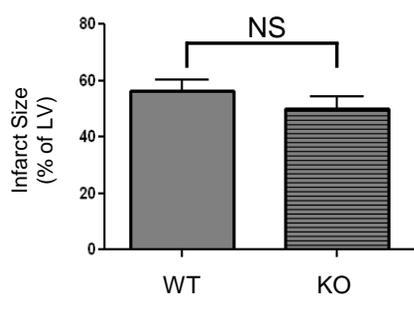
Supplementary Figure 3

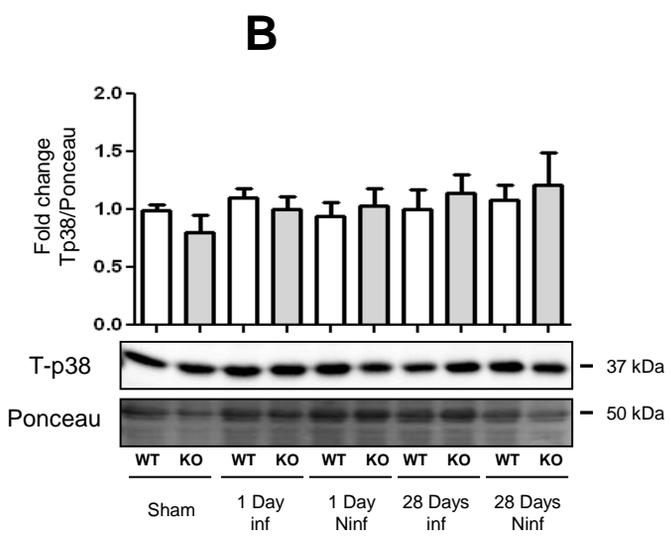
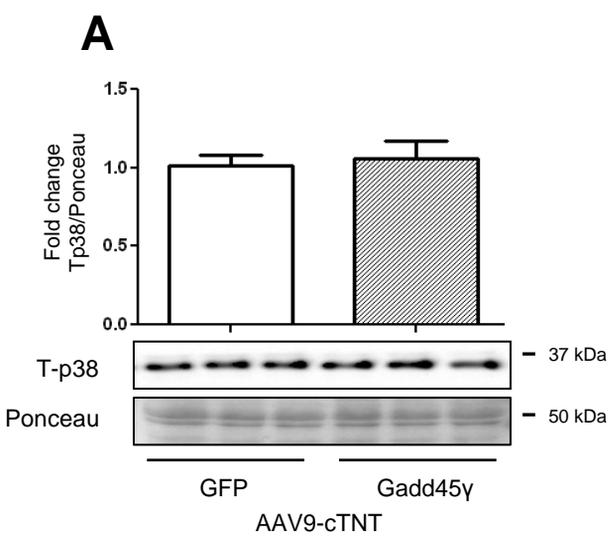
CVR-2015-386R2

A

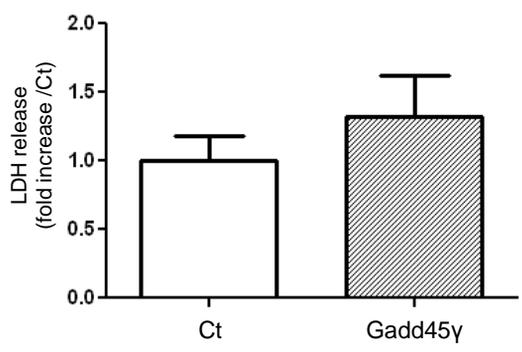


B

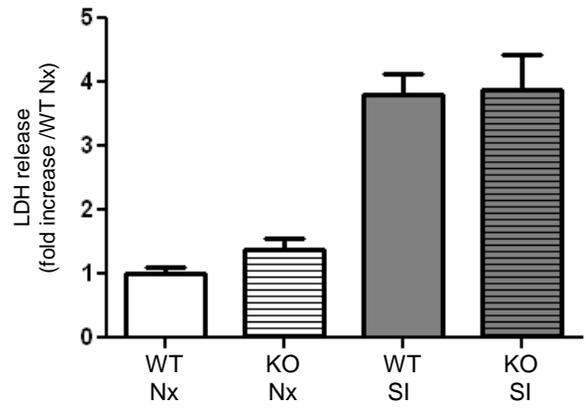




A



B



Supplementary Table 1:

	AAV9-cTNT	
	GFP	Gadd45γ
	n=11	n=11
<i>Echocardiographic data</i>		
HR(bpm)	608±15	608±5
FS (%)	47.3±1.7	35.3±2.6**
LVIDd (mm)	2.86±0.3	3.52±0.2*
LVIDs (mm)	1.64±0.1	2.3±0.2**
IVSd (mm)	0.92±0.02	0.99±0.05
IVSs (mm)	1.56±0.05	1.47±0.08
LVPWd (mm)	1.41±0.07	1.052±0.1**
LVPWs (mm)	1.80±0.06	1.38±0.1**
<i>Hemodynamic data</i>		
HR (bpm)	386±32	394±16
EF (%)	70.2±6.1	40.4±5.2**
ESP (mmHg)	67.91±5.21	62.54±3.08
EDP (mmHg)	8.29±2.31	6.8±2.19
ESV (μl)	15.71±3.88	38.90±5.85*
EDV (μl)	34.34±4.81	54.66±6.03*
CO (ml/min)	8.81±0.93	6.81±1.01
SV (μl)	20.54±2.33	15.74±2.75
SW (mmHg μl)	1113±260	994±276
Ea (mmHg/μl)	3.33±0.33	3.28±0.56
+dP/dtmax (mmHg/s)	5475±270	3162±241**
-dP/dtmin (mmHg/s)	-5813±603	-3652±451*
τ (ms)	12.79±1.92	14.86±1.79

Supplementary Table 2

	Sham		1 week post-MI		4 week post-MI	
	WT	KO	WT	KO	WT	KO
	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
<i>Echocardiographic data</i>						
HR(bpm)	556±17	567±12	572±8	570±10	592±10	579±10
FS (%)	46.4±2.3	47.4±1.9	24.7±1.3**	35.4±3.9**,\$	22.9±1.7**	32.2±2.4**,\$
LVIDd (mm)	3.03±0.08	2.93±0.09	3.87±0.20**	3.60±0.19**	4.25±0.12*	3.86±0.19**
LVIDs (mm)	1.64±0.11	1.55±0.09	2.94±0.19**	2.34±0.16**,\$	3.25±0.15**	2.65±0.22**,\$
IVSd (mm)	1.26±0.03	1.19±0.05	1.00±0.12	1.06±0.06	0.84±0.06**	0.99±0.07**
IVSs (mm)	1.88±0.07	1.76±0.07	1.29±0.15**	1.59±0.06	1.09±0.09**	1.46±0.09**,\$
LVPWd (mm)	1.47±0.05	1.35±0.05	1.52±0.12	1.43±0.07	1.54±0.09	1.57±0.10
LVPWs (mm)	1.87±0.06	1.72±0.09	1.92±0.12	1.81±0.08	1.92±0.07	1.97±0.14
<i>Hemodynamic data</i>						
HR (bpm)	440±56	438±49	ND	ND	436±47	463±67
EF (%)	70.0±5.6	69.8±4.6	ND	ND	34.1±4.1*	55.9±3.8\$
ESP (mmHg)	77.4±4.2	74.1±3.2	ND	ND	64.2±2.8*	72.7±7.7
EDP (mmHg)	8.05±0.59	6.89±0.91	ND	ND	9.41±0.49	8.76±0.87
ESV (μl)	15.78±3.39	16.90±3.84	ND	ND	36.78±2.68*	22.06±3.19\$
EDV (μl)	24.68±1.77	23.46±1.88	ND	ND	49.71±1.88*	38.26±3.47\$
CO (ml/min)	10.13±1.41	9.07±1.28	ND	ND	4.68±0.40*	6.41±0.99
SV (μl)	20.15±2.75	21.43±4.86	ND	ND	12.93±2.02	16.20±2.16
SW (mmHg μl)	1404±198	1296±201	ND	ND	368±50*	807.2±202
Ea (mmHg/μl)	3.67±0.39	4.07±1.12	ND	ND	6.30±0.70	6.31±0.93
+dP/dtmax (mmHg/s)	6975±690	6859±333	ND	ND	3063±142*	4345±415
-dP/dtmin (mmHg/s)	-6740±767	-6033±532	ND	ND	-3256±253*	-4620±857
τ (ms)	10.76±0.89	11.88±0.85	ND	ND	14.12±0.96	13.09±1.29

DISCUSSION

1/ Quelle isoforme de GADD45 est dérégulé lors du remodelage post-IDM ?

1.1 Expression des différentes isoformes suite à une ischémie et après un IDM

Les trois isoformes de GADD45 sont exprimées dans différents tissus comme le cœur, le cerveau, la rate, les poumons, le foie ou encore les reins à des niveaux assez faibles (141).

Avant de vérifier leur expression nous avons tout d'abord validé l'efficacité des trois anticorps GADD45 α , GADD45 β et GADD45 γ en déposant une quantité croissante de protéines recombinantes et en vérifiant la réaction croisée entre les trois isoformes et anticorps (figure supplémentaire 1).

Une fois nos anticorps validés avec une sensibilité équivalente et aucun problème de réaction croisée, nous avons obtenu les premières confirmations concernant l'expression de GADD45.

Les 3 isoformes de GADD45 sont exprimées faiblement dans un cœur de souris sain. De plus comme rapporté par *Schrag et al.* GADD45 γ possède une capacité à s'homodimériser (143). GADD45 α forme un homodimère aussi tandis que GADD45 β n'en forme pas, sous cette forme recombinante, contrairement à ce qui a été précédemment décrit (180).

Dans un cœur de rat adulte, lors d'une ischémie *in vivo* de 45 minutes, suivie ou non d'une reperfusion de 90 minutes, il y a une augmentation de l'ARNm de l'isoforme GADD45 β (174). Nous avons donc étudié l'expression des trois isoformes de GADD45 *in vitro* après une ischémie simulée sur des cardiomyocytes adultes de souris et *in vivo* sept et vingt-huit jours après un IDM.

Dès les premières expériences d'ischémie simulées GADD45 γ est apparu fortement augmenté en fonction du temps d'ischémie (voir figure 1A papier). En revanche les isoformes GADD45 α et GADD45 β ne présente pas de variation d'expression significative. Cette augmentation de GADD45 γ est retrouvée après un IDM au bout de sept jours de façon équivalente dans les zones infarctées et non infarctées. 28 jours après l'IDM, avec un remodelage plus avancé, on trouve une augmentation de l'expression par rapport à 7 jours dans la zone non infarctée uniquement. De la même façon que pour l'ischémie simulée il n'existe pas de modulation de l'expression des isoformes GADD45 α et GADD45 β après un IDM (Figure supplémentaire).

Contrairement à ce que nous attendions, puisque c'est l'isoforme β qui apparaît le plus souvent dérégulée lors de pathologies cardiaques dans la littérature, GADD45 γ apparaît comme l'isoforme la plus importante lors du remodelage post-IDM et lors d'une ischémie simulée dans nos cœurs et cellules de souris adultes. *Kim et al.* ne trouvent pas de différences au niveau de l'expression des ARNm GADD45 γ mais plutôt au niveau de l'isoforme β (174). Cependant les deux modèles sont assez différents de par leurs approches, puisque celui de *Kim et al.* repose sur une ischémie courte de 45 minutes, associée ou non à une reperfusion dans des cœurs de rats tandis que nous sommes sur un

modèle de souris avec un IDM par ligature permanente afin de voir les effets du remodelage post-IDM. Cependant le point faible de leurs approches in vivo, pour regarder la modulation de l'expression, est l'utilisation du cœur entier avec les différentes populations qu'il contient (fibroblastes, cardiomyocyte, cellules endothéliales, lymphocytes...). Il reste donc de nombreuses questions sur la dérégulation des différentes isoformes de GADD45 en fonction de la pathologie cardiaque mais aussi de la population cellulaire. Récemment, dans des fibroblastes humains, une radiation infrarouge provoque l'augmentation de l'expression de MMP1 associée à une diminution de GADD45 α (181). Ainsi, en fonction de la population et du type de stress, les isoformes de GADD45 ont un rôle prépondérant dans de nombreuses pathologies. Une étude des différentes populations par méthode de tri cellulaire est un challenge scientifique et technologique prometteur. De plus, l'utilisation de souris KO cardiaque spécifique, ce qui est une des faiblesses de notre étude, d'une ou plusieurs isoformes semble importante pour une meilleure compréhension.

1.2 Régulation de GADD45 γ par le système ubiquitine

L'augmentation rapide de l'expression de GADD45 γ durant les ischémies simulées et sa translocation dans le noyau après 30min d'hypoxie (Figure 1B papier) nous ont poussés à regarder le mode de régulation de GADD45 γ . Les études précédentes sur les mécanismes de régulation présentés plus haut dans ce manuscrit montrent une modulation au niveau transcriptionnelle (182). Or l'augmentation observée ici se produit en à peine quelques minutes, nous avons donc émis l'hypothèse d'un rôle du système UPS (ubiquitin proteasome system) sur la régulation de GADD45 γ chez les cardiomyocytes stressés. Ce système, via une série d'ajout covalent de plusieurs molécules d'ubiquitine sur la protéine d'intérêt, permet la dégradation par le protéasome des protéines intracellulaire et permet donc une régulation de nombreuses voies de signalisation (183). Nous avons donc étudié l'ubiquitinylation de GADD45 γ sur des cardiomyocytes isolés de souris adultes. L'ajout du MG132, un inhibiteur de l'UPS, induit une augmentation de l'expression de GADD45 γ ce qui prouve l'implication de du système UPS dans la régulation de GADD45 γ (Figure 18). Nous avons ensuite immunoprécipité une forme surexprimée de GADD45 γ après une ischémie simulée, ce qui nous a permis de constater qu'il y a moins de GADD45 γ ubiquitinylé lors de l'ischémie simulée correspondant avec l'augmentation de GADD45 γ (Figure 18). Il est connu que GADD45 est régulé au niveau transcriptionnel par p53 ou encore BRCA1 (150). Différents études rapportent que GADD45 notamment via l'influence de p53 peut voir sa transcription augmentée par le système UPS lors de stress comme l'hypoxie (184, 185). Concernant la régulation post transcriptionnelle de GADD45 par le système UPS, il n'existe aucune étude. Cependant plusieurs études ont montré une régulation post transcriptionnelle de GADD45 en augmentant la stabilité de l'ARNm de GADD45 α et β de 9 fois, via

BRCA1 ou en ajoutant un composé pharmacologique réduisant la croissance cellulaire l'AHPN (retinoid 6-[3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphthalene carboxylic acid) (186, 187). Cette partie régulation de GADD45 demande donc à être approfondie avec une partie *in vivo* mais aussi d'un point de vue mécanistique.

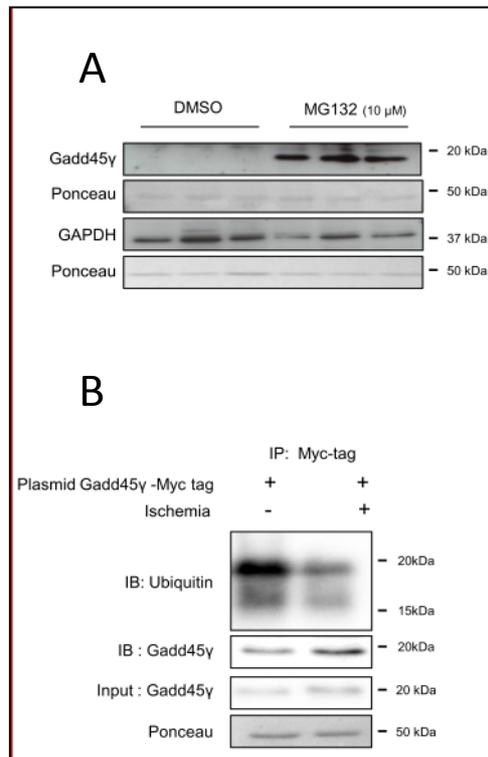


Figure 18 : Régulation de GADD45y par le système UPS

A : Effet du MG132 (inhibiteur UPS) sur l'expression de GADD45y dans des cardiomyocytes de souris adultes (n=3). B : Ubiquitylation de GADD45y-myc-DDK sur des cardiomyocytes de rats nouveaux nés soumis à une ischémie simulée (n=3).

1.2 La phosphorylation, une autre régulation de GADD45y ?

L'identification des mécanismes moléculaires d'activation de GADD45 au cours du développement de l'IC est indispensable afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. En dépit de nombreuses études notamment en cancérologie, le contrôle et la régulation de l'activité de GADD45 ne sont pas bien connus. Un certain nombre de facteurs peuvent moduler l'expression de GADD45 en adaptant son niveau transcriptionnel et post-traductionnel.

Les effets de GADD45 sont liés à ses niveaux cellulaires mais aussi à une conformation favorisant les interactions protéine/protéine. L'un des défis les plus difficiles et les plus importants de la biologie cellulaire et de la médecine est de comprendre comment les réseaux de signalisation intègrent et relaient les informations. Une étape importante dans l'analyse des réseaux de signalisation est l'identification et la caractérisation des sites de phosphorylation, à la fois sur les protéines individuelles et plus globalement sur le protéome.

Dans notre problématique, lors d'un stress ischémique, la mort cellulaire dépendante de GADD45 γ est probablement régulée par des interactions avec des protéines kinases en particulier p38 MAPK. GADD45 γ ne possède pas d'activité enzymatique mais va modifier les conformations de ses protéines partenaires et modifier leurs activités. Par contre nous ne connaissons pas l'effet des interactions des kinases sur l'activité de GADD45 γ . Il est probable que GADD45 γ soit un substrat d'une ou plusieurs kinases.

L'étude du niveau de phosphorylation des isoformes de GADD45 permettra sans doute de mieux comprendre la régulation de ses effets pléiotropiques. Des logiciels de prédiction (<http://kinasephos2.mbc.nctu.edu.tw> et scansite.mit.edu), nous ont permis d'identifier sept sites de phosphorylation possibles (3 sites sérine, 3 sites thréonine et 1 site tyrosine) parmi les seize motifs présents dans GADD45 γ (095257). Afin de détecter un possible état de phosphorylation de GADD45 γ , la technologie Phos-tag associée à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide a été utilisée (178, 188-190). Cette technologie permet de discriminer la protéine d'intérêt sous sa forme phosphorylée de sa forme non phosphorylée.

Ce travail préliminaire a permis de détecter un état phosphorylé de GADD45 γ . Plusieurs bandes ont été détectées après une semaine d'IDM (Figure 19A) ou après un stress oxydatif (Figure 19B) par rapport aux contrôles.

Ces résultats permettent d'envisager une nouvelle voie de régulation de GADD45 en réponse à un stress ischémique ou oxydatif. On sait que GADD45 est impliqué dans l'apoptose dans de nombreux en réponses à différents stress et dans notre modèle (161, 166, 184, 191). Ainsi, découvrir la et les kinases responsables de cette phosphorylation et les cibler pharmacologiquement pourrait inhiber cette voie de l'apoptose médiée par GADD45.

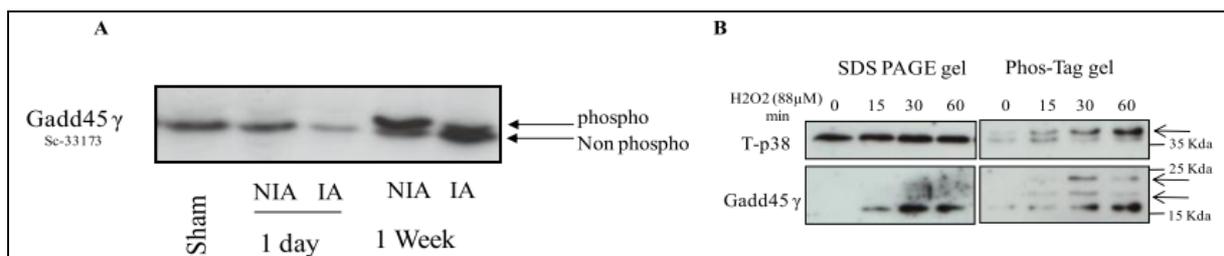


Figure 19 : Détection de l'état de phosphorylation de GADD45 γ

A : La technologie Phostag, associée à un immunoblot de GADD45 γ , nous a permis de détecter après une semaine d'IDM, 2 bandes dans le cœur de souris ce qui indique deux états de phosphorylation de GADD45 γ (n=2) (NIA : Zone non infarctée, IA : zone infarctée); B : Le stress oxydatif augmente le niveau de phosphorylation de GADD45 γ et de p38 (flèches).

2/ Implication de GADD45 γ dans le remodelage IC post-IDM

2.1 GADD45 γ dans l'hypertrophie cardiaque

Le rôle de GADD45 γ dans la dysfonction systolique liée au rétrécissement aortique ou lors de cardiomyopathies n'est pas encore connu. Seules quelques études ont décrit qu'un stress engendré par l'angiotensine II pouvait augmenter les niveaux d'ARNm des isoformes de GADD45 dans le cœur (174). En outre, il a été montré une corrélation entre l'abondance de l'ARNm de GADD45 β et le niveau de l'hypertrophie des cardiomyocytes chez des patients atteints de cardiomyopathie hypertrophique idiopathique ou chronique (172), (173).

L'un des enjeux majeurs en cardiologie est de comprendre les mécanismes cellulaires qui interviennent dans la transition entre l'hypertrophie myocardique compensée et l'IC décompensée.

L'expression et le rôle de GADD45 γ dans l'hypertrophie cardiaque n'a pas été étudié. Nous avons observés qu'une surexpression de GADD45 γ dans les cardiomyocytes de rats nouveaux-nés entraîne une hypertrophie cellulaire.

Mon expérience précédente au sein de l'équipe du Dr. *Frank Lezoualc'h* me permet d'envisager un rôle possible de GADD45 dans cette signalisation hypertrophique activée par les récepteurs β -ARs (80, 81, 192-195). La protéine EPAC est associée à l'hypertrophie cardiaque induite par les récepteurs β -ARs, qui peut être considérée comme un phénomène adaptatif soit pour compenser la perte massive de cardiomyocytes après un IDM soit en réponse à une surcharge de pression. Cependant, lorsque l'hypertrophie des cardiomyocytes atteint ses limites, un nombre important de ces cardiomyocytes rentre en apoptose. Le phénomène de mort des cardiomyocytes est un événement majeur dans cette transition.

L'étude du stimulus et de la voie de signalisation, avec GADD45 γ , permettant cette transition de l'hypertrophie vers l'IC est envisageable grâce aux différents modèles de souris KO Epac, GADD45 γ mais aussi in vitro par l'utilisation d'agoniste aux récepteurs β -ARs ou encore d'inhibiteurs spécifiques d'EPAC.

2.2 GADD45 γ et remodelage après surexpression ou un KO

Lors de notre étude, nous avons pu mettre en évidence que seul l'isoforme γ de GADD45 est surexprimée après une ischémie simulée ou un IDM. L'augmentation graduelle en fonction du temps après un IDM de l'expression de GADD45 γ permet d'envisager un rôle important dans le remodelage post-IDM.

La surexpression, spécifique dans les cardiomyocytes de souris, de GADD45 γ , par adénovirus de type 9 sous un promoteur cTnT, a permis de démontrer que cette augmentation de GADD45 γ avait des effets délétères menant à une IC.

En effet, 28 jours après l'injection de cet adénovirus la souris présente une dilatation cardiaque associée à une réduction de la fraction de raccourcissement (Figure 2 papier). Cette dysfonction cardiaque s'accompagne d'une fibrose associée à une augmentation de l'apoptose et d'une réexpression des gènes fœtaux (figure 3 papier).

Ces trois facteurs montrent une progression de nos souris vers l'IC. La réexpression des gènes fœtaux est associée à une hypertrophie pathologique (8). Associée à une mort cellulaire par apoptose, cette réexpression est un signe de remodelage du myocarde induit par la surexpression de GADD45 γ (67). Une augmentation de la fibrose nous confirme qu'il y a bien un remodelage vers l'IC puisque la fibrose est un marqueur clé de l'IC (73). Une vérification des troubles du rythme ou encore de la phosphorylation de la connexine 43 nous permettraient de renforcer notre thèse (77).

Dans le but d'approfondir notre étude de ce remodelage nous avons utilisé une lignée de souris KO GADD45 γ , qui, entre nos mains, ne présente aucun phénotype cardiaque particulier en condition normale. Nous avons donc réalisé une LAD pour induire un IDM et nous avons observé une diminution du remodelage post IDM. Les souris KO présentent une dysfonction cardiaque, une réexpression des gènes fœtaux, un nombre de cellules apoptotiques et une expression de collagène 1 et 3 moins marquées que les souris contrôles.

La réduction de la fibrose et de la réexpression des gènes fœtaux en absence de GADD45 γ nous confirme que cette protéine joue un rôle important dans le remodelage post IDM (Figure 20).

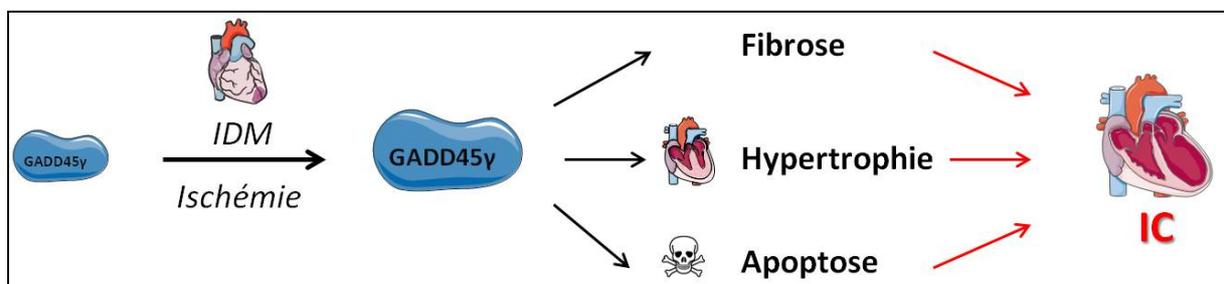


Figure 20 : GADD45 γ et remodelage post-IDM

Le rôle de GADD45 γ dans la fibrose et l'HC pathologique est encore à développer notamment au niveau des mécanismes moléculaires.

Concernant l'apoptose, GADD45 γ est fortement impliqué dans ce processus lors de cancers (196). De plus, *Ju et al.* ont démontré qu'un faible niveau d'expression de GADD45 γ permettait aux cellules cancéreuses d'éviter l'apoptose (197). L'étude de la signalisation par laquelle GADD45 γ induit la mort cellulaire des cardiomyocytes par apoptose, nous est alors apparu essentielle sachant de plus que les effets de la délétion de GADD45 γ étaient similaires à ceux retrouvés par plusieurs études sur l'inhibition de p38 (95, 110, 129).

3/ La signalisation de GADD45γ

3.1 GADD45 et la signalisation p38MAPK/RIP1/Caspase8

La surexpression de GADD45γ induit une augmentation de la phosphorylation de p38 tandis que dans les stades précoces après un IDM, p38 est moins phosphorylé dans les souris KO GADD45γ. Enfin l'inhibition de p38, par le SB203580, lors d'une surexpression de GADD45γ diminue le nombre de cellules apoptotiques (Figure 6-7 papier).

Ce lien entre p38 et GADD45γ est un point crucial de l'action de GADD45γ sur la mort cellulaire induite après un IDM.

La voie de signalisation par laquelle le duo p38/GADD45γ induit la mort cellulaire dans les cellules cardiaques est assez complexe et encore peu caractérisée.

Lors d'une surexpression de GADD45γ, les clivages de la caspase 8 et de RIP1 sont augmentés ce qui laisse penser à une voie de signalisation impliquant GADD45γ avec ces 2 protéines.

Comme décrit précédemment la caspase 8 est impliquée dans les processus de survie cellulaire et d'apoptose. Récemment RIP1 est apparu comme une protéine clé contrôlant l'activation de plusieurs voies de mort cellulaires, incluant l'apoptose et la nécroptose. RIP1 est connue pour induire la mort cellulaire, son inhibition par la nécrostatine, un inhibiteur pharmacologique, réduisant la taille de l'infarctus et la mort des cardiomyocytes (69). Dans un processus d'apoptose impliquant RIP1, la caspase 8 vient inhiber RIP1 en le clivant afin d'éviter l'induction de la nécroptose via RIP1 et RIP3 (198). p38 a été décrit en 2013 comme un régulateur de l'apoptose en interagissant avec RIP1 dans des cellules cancéreuses pulmonaires (199), (200).

Dans notre cas, nous avons démontré qu'une inhibition de p38, avec le SB203580, réduit la mort des cardiomyocytes induite par une surexpression de GADD45γ dans nos cardiomyocytes de rats nouveaux nés. De plus, une diminution de l'expression de la caspase 8 ou de RIP-1, par leurs siRNA respectifs, diminue aussi le clivage de la caspase 3 lors de cette même surexpression de GADD45γ. Ces résultats mettent en évidence pour la première fois l'implication de GADD45γ dans la mort cellulaire induite par la caspase 8 et RIP1 dépendante de p38 lors de l'IDM.

L'enjeu majeur de la suite de cette étude est de déterminer de quelle façon GADD45γ et p38 induisent cette mort cellulaire et si elle induit l'apoptose ou la nécroptose.

En 2003, Cohen et al. ont montré que p38 était capable d'inhiber l'activation de TAK1 par phosphorylation des serine 423 et thréonine 431, dans des macrophages de souris, en phosphorylant TAB1 (201). L'activité de TAK1 joue un rôle important lors de l'IDM, puisque son activation augmente la survie cellulaire après une ischémie et lors de la reperfusion (202). En revanche, l'inhibition de TAK1, induit la mort des cardiomyocytes par l'intermédiaire du complexe RIP1/RIP3/caspase8 aussi appelé complexe II (203).

Nous avons donc entamé l'étude de la phosphorylation de TAK1 lors d'une surexpression de GADD45 γ dans des cardiomyocytes de rats nouveaux-nés ou sur le KO de GADD45 γ après un IDM. La surexpression de GADD45 γ entraîne une diminution de la phosphorylation de TAK1, potentiellement par p38, et donc l'apoptose par le complexe RIP1/RIP3/Caspase8 (Figure 21A). La délétion de GADD45 γ dans nos souris, induit une augmentation de la phosphorylation de TAK1, donc de son activité et de sa fonction de survie cellulaire, avant et après un IDM (Figure 21B).

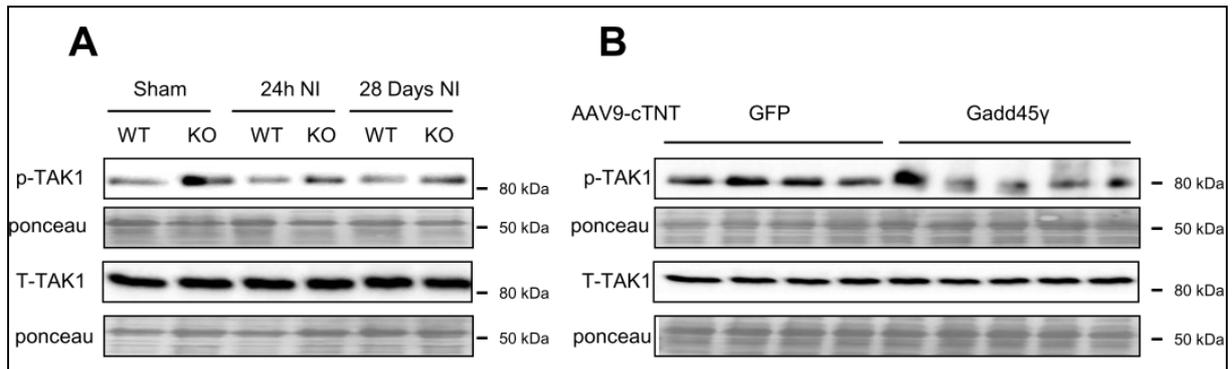


Figure 21 : Phosphorylation de TAK1

A : Immunoblot de la forme phosphorylée de TAK1 dans des souris contrôle et KO GADD45 γ sans et après un IDM dans les zones non infarctées (NI : Non infarctée) ; B : Immunoblot de la forme phosphorylée de TAK1 dans des cellules cardiaques de rats nouveaux nés après une surexpression ou non de GADD45 γ

Ces résultats préliminaires nous suggèrent une voie de signalisation de mort cellulaire dans le cœur médiée par GADD45 γ et p38 impliquant RIP1 et la caspase 8, l'implication de TAB1 et TAK1 restant à confirmer. De plus, une étude plus approfondie du complexe II de mort permettrait de savoir si la cellule cardiaque après un IDM engage un processus apoptotique ou nécroptotique. Les rôles de FADD et de RIP3 restent donc à élucider dans notre modèle (Figure 22).

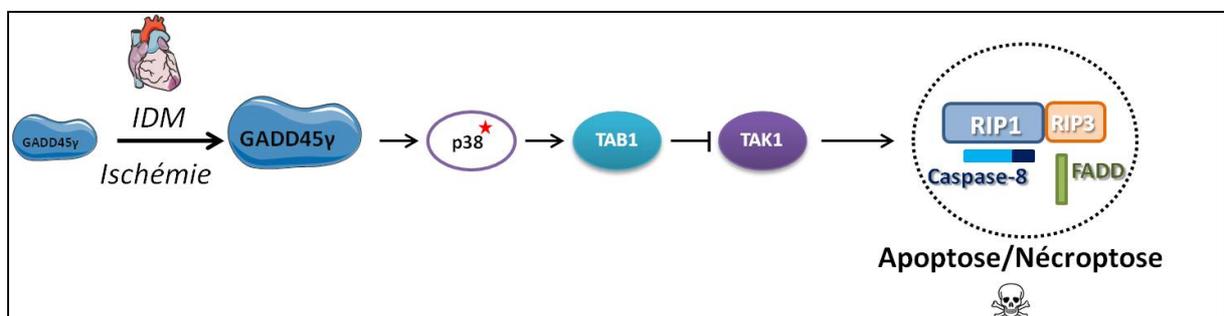


Figure 22 : Proposition de signalisation de mort des cardiomyocytes par GADD45 γ

Le schéma d'activation classique canonique de p38 MAPK implique MEKK1-4, MKK2/3 et TAK1 au niveau des MAPKKKs qui vont activer MKK3/6 et MKK4, responsables de l'activation de p38 sur le motif conservé Thréonine-Glycine-Tyrosine. Il est important de noter que p38 peut être activée par une autre voie non-canonique, la voie d'autophosphorylation médiée par l'activation des TCR (T-cell receptor) via ZAP-70 (98).

3.2 GADD45 γ et la régulation de p38 par une voie alternative

Salvador et al. ont montré un lien entre p38, GADD45 et ZAP-70 dans des lymphocytes T. En effet comme décrit dans le chapitre sur la régulation de p38, ce dernier peut être phosphorylé par ZAP-70 (Zeta-chain-associated protein kinase 70) sur la tyrosine 323. Cette modification va entraîner son autophosphorylation, ce qui le rend actif, sur les résidus thréonine 180 et tyrosine 182. Dans les lymphocytes T n'exprimant pas GADD45 α , il y a une augmentation du niveau de phosphorylation sur la tyrosine 323 de p38, suggérant ainsi un rôle de GADD45 α sur cette voie alternative d'activation de p38 (204).

GADD45 γ est-il donc capable de réguler ZAP-70 dans notre modèle et plus particulièrement dans les cardiomyocytes ?

Pour cela, nous avons isolés des cellules cardiaques de souris WT et KO GADD45 γ afin de vérifier la phosphorylation tyrosine 323 de p38 MAPK. Cette phosphorylation 323 n'apparaît ni dans les cardiomyocytes WT, ni dans les KO en raison de l'absence d'expression de ZAP-70 dans nos cellules (Figure 23A). Nous sommes passés *in vivo* avec et sans IDM et nous avons observé la concomitance de la Y323 avec ZAP-70 uniquement dans la zone infarctée (Figure 23B). Nous avons alors voulu vérifier quelles cellules exprimaient ZAP-70 par immunofluorescence, ce qui nous a permis de voir que dans la zone infarctée, ZAP-70 était exprimé dans les cellules CD4+, marqueur retrouvé chez les lymphocytes T.

En conclusion GADD45 n'est pas capable de réguler ZAP-70 et p38 Y323 dans les cardiomyocytes, car il n'y a pas de ZAP-70 dans les cardiomyocytes.

En revanche, le rôle de GADD45 sur la phosphorylation de p38 par ZAP-70 lors d'un IDM au niveau des lymphocytes reste un point important à étudier compte tenu du rôle des cellules immunitaires durant la phase inflammatoire du remodelage (37). En effet, lors d'un IDM il y a une activation des TLR, par une reconnaissance des molécules de dangers (DAMPs) relarguées par les cardiomyocytes mourants, qui va entraîner la synthèse de chemokines et de cytokines par les cellules cardiaques ou les cellules endothéliales (205, 206). Ces chemokines comme CCL2 jouent un rôle important dans le recrutement et l'infiltration de cellules immunitaires, comme les lymphocytes T ou les monocytes, lors d'une ischémie (37). Il existe une accumulation des lymphocytes T CD4+ lors d'une I/R et des

souris KO de lymphocyte T CD4+ ont une dilatation du VG plus importante après une ischémie, suggérant un effet bénéfique de ces lymphocytes T lors du remodelage post-IDM (207, 208). On sait que ZAP-70 est impliqué dans la maturation de ces cellules T CD4+ en réponse à une présentation d'antigène sur les TCR (T cell antigen receptor) (209, 210).

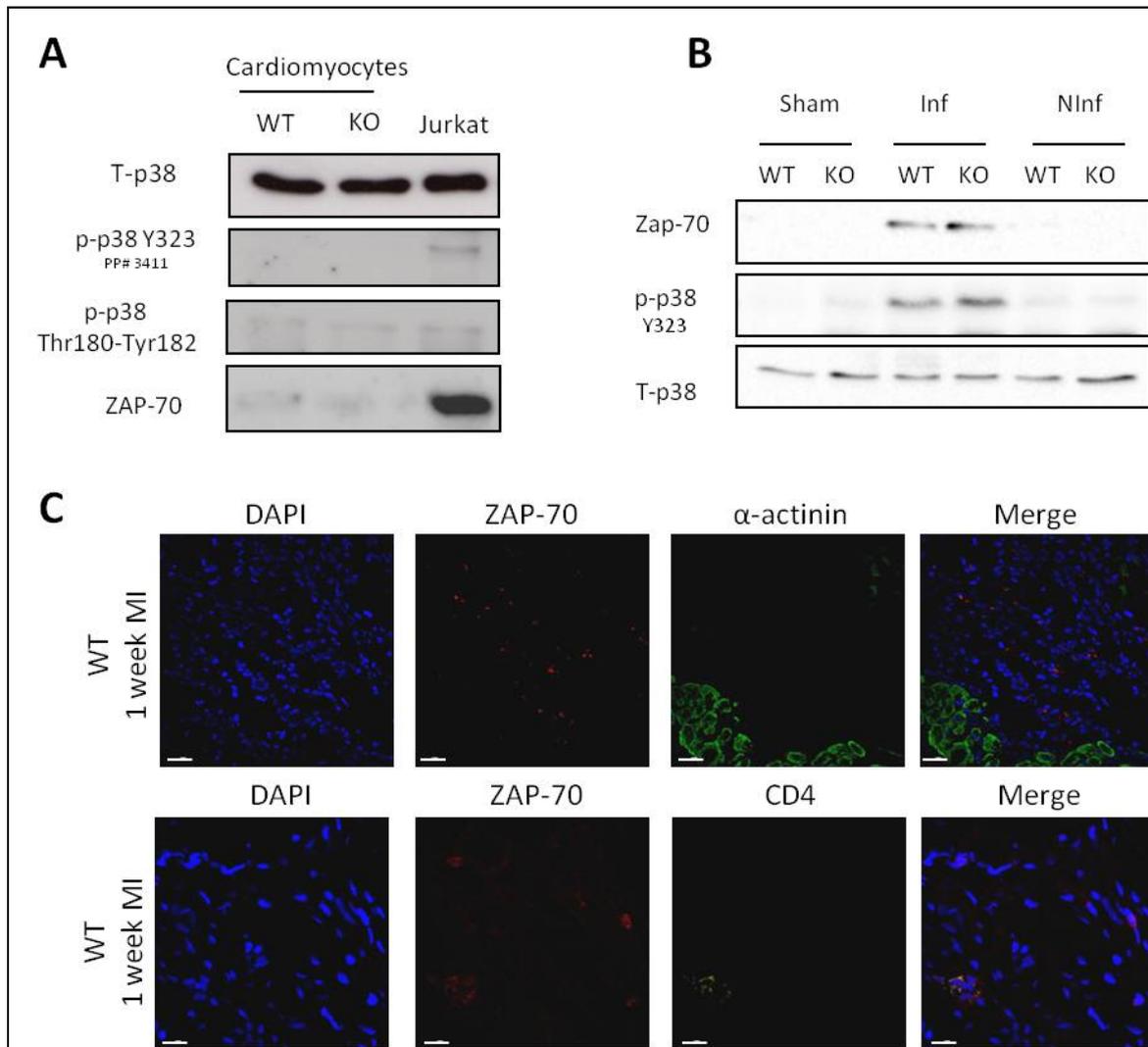


Figure 23 : ZAP-70 et GADD45 après un IDM

A : p38 Y323 n'est pas phosphorylé dans les cardiomyocytes de souris adultes KO GADD45 car ZAP-70 n'est pas présent dans les cardiomyocytes ; B : Immunoblot de cœur de souris après IDM (Inf : zone infarctée, NInf : zone non infarctée) ; C : Immunofluorescence de la zone infarctée d'un cœur de souris après IDM avec ZAP-70, l' α actinine permettant de voir les cellules cardiaques, CD4 marqueur des lymphocytes T et le DAPI pour les noyaux

Ainsi l'étude de cette voie GADD45/ZAP-70 dans les lymphocytes présente un intérêt majeur puisque l'infiltration de cellules immunitaires apparaît être un excellent biomarqueur d'un IDM (205).

3.3 GADD45 un biomarqueur ?

Dans ce cadre, nous avons initié une collaboration avec le CHU de Dijon (Pr Yves Cottin, Dr Marianne Zeller) pour obtenir des prélèvements humains de sérum de 293 patients admis pour un infarctus du myocarde avec un fort taux de cTn.

Nous avons ainsi examiné par PCR quantitative les trois isoformes différentes de GADD45. Parmi les corrélations possibles, nous avons trouvé un lien entre le taux de cTn et la concentration de GADD45 γ (Figure 24).

Cette corrélation existe aussi entre la classification Killip Kimball et GADD45 γ . Cette classification est utilisée pour stratifier la gravité des IDM. La classe I correspond à une absence d'IC, tandis que le patient en classe 2 présente des crépitements, qu'en classe 3 il y a un œdème pulmonaire franc et que pour la classe 4 il y a un choc avec signes de vasoconstrictions périphérique (cyanose) (211).

Le taux d'expression de GADD45 γ est très élevé lors d'une forte concentration en cTn et lors d'une classe Killip supérieure à 2. Ces résultats préliminaires laissent envisager un rôle de biomarqueur prédictif pour GADD45 γ .

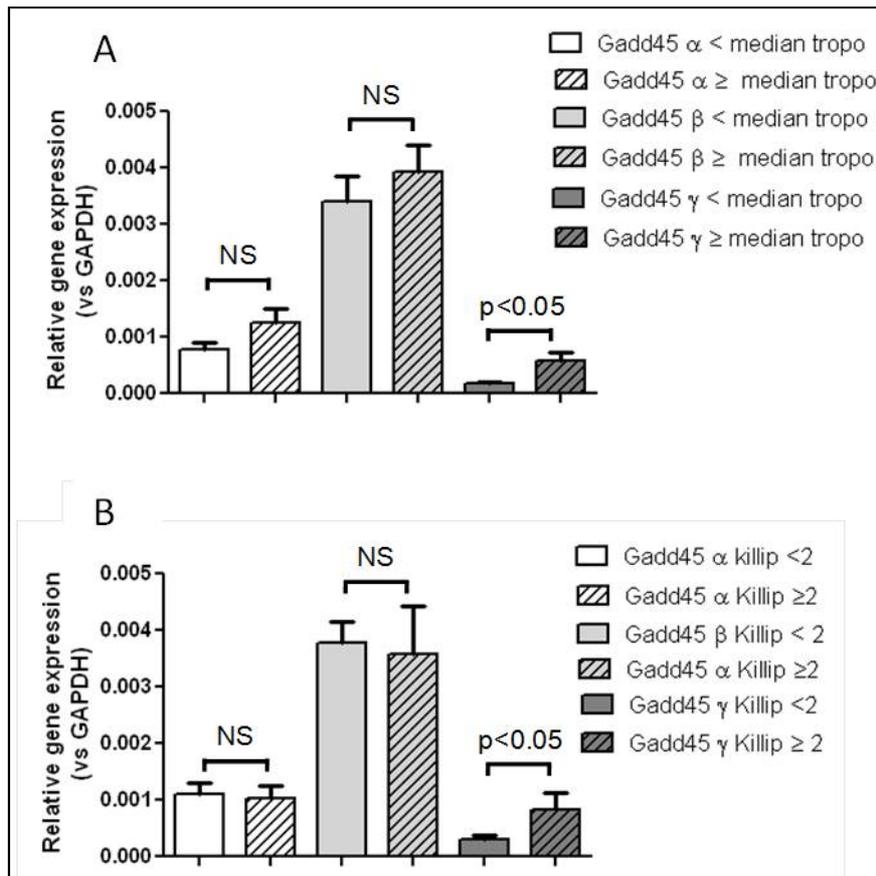


Figure 24 : PCR quantitative de GADD45 γ corrélée à la concentration sanguine en cTn et à la classification Killip Kimball

A : PCRq de GADD45 γ , normalisée par GAPDH, en fonction du taux de cTn moyen des patients admis pour un IDM sévère.
B : PCRq de GADD45 γ , normalisée par GAPDH, en fonction de la classe Killip moyenne des patients admis pour un IDM sévère.

PERSPECTIVES

Le travail de cette thèse a permis d'identifier GADD45 γ comme un acteur clé dans le développement de l'IC post-IDM. Nous avons particulièrement étudié les mécanismes moléculaires par lesquels GADD45 γ induit l'apoptose lors du remodelage post-IDM. Cette étude pose de nombreuses questions sur l'implication de GADD45 γ dans les phénomènes de fibrose et d'HC dans les cardiomyocytes mais aussi lors de l'inflammation dans les cellules immunitaires (Figure 25). Il reste aussi à définir la régulation de GADD45 γ dans notre modèle.

L'ensemble de nos observations laissent entrevoir deux volets prometteurs : une approche thérapeutique et la possible découverte d'un biomarqueur prédictif.

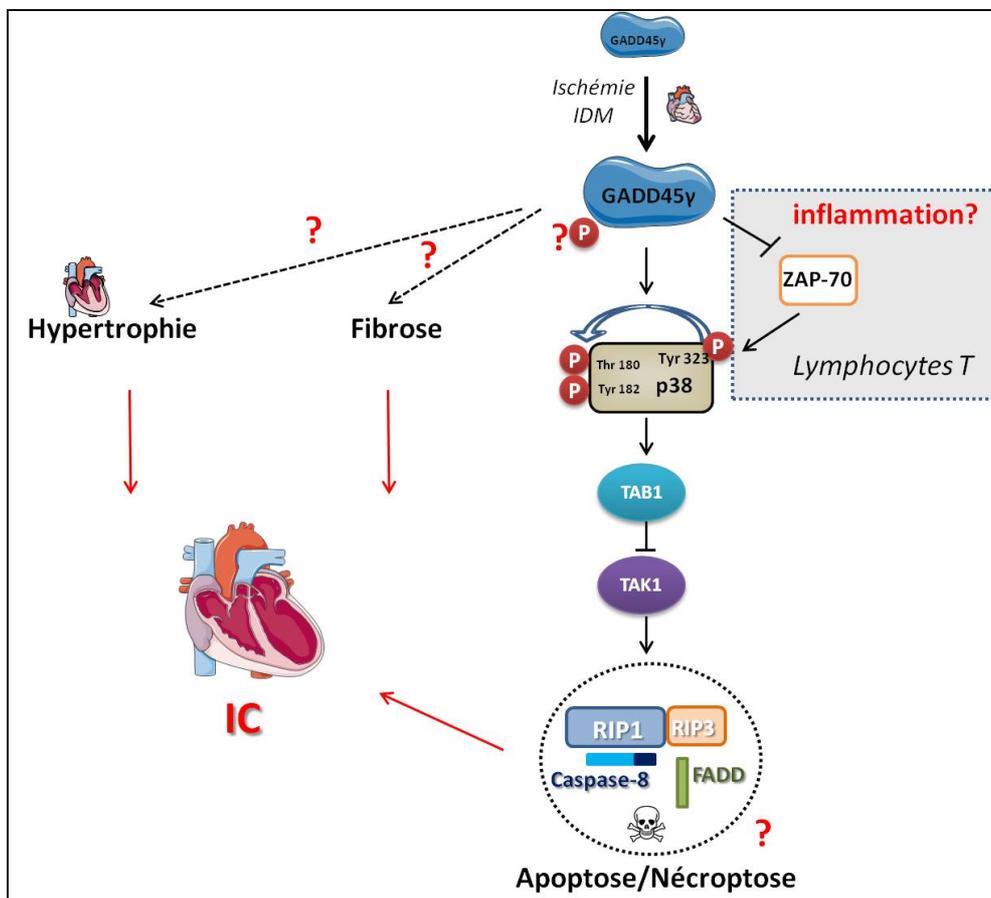


Figure 25 : Signalisation de GADD45 après un IDM

Après un IDM ou une ischémie le niveau d'expression de GADD45 γ est augmenté. Cette protéine module de façon p38 dépendante, par l'intermédiaire de TAB1 et TAK1, la mort des cardiomyocytes par un complexe RIP1/RIP3/Caspase 8/FADD. Les mécanismes par lesquels GADD45 influence sur l'hypertrophie et la fibrose restent à étudier. Tout ces processus sont impliqués dans le développement de l'IC post IDM. Une piste intéressante à approfondir concerne l'implication de GADD45 avec ZAP-70 dans les lymphocytes T après un IDM.

1/ Nouvelles voies thérapeutiques

Concernant GADD45 γ , l'identification et la confirmation de l'importance physiologique des sites de phosphorylation de GADD45 seront une avancée majeure dans notre domaine.

Afin de limiter pharmacologiquement « l'activité » de GADD45 γ , l'identification d'inhibiteur sélectif, par criblage moléculaire, des kinases responsables de la phosphorylation de GADD45 γ est nécessaire. De plus, le développement de peptides permettant d'empêcher les interactions GADD45 γ /kinase est une stratégie thérapeutique prometteuse.

Enfin moduler l'activation de ZAP-70 permettrait de réduire l'infiltration des cellules immunitaires ou d'augmenter l'infiltration des lymphocytes T CD4+ connus pour avoir un effet bénéfique sur le remodelage post-IDM. L'utilisation de souris transgénique surexprimant ZAP-70 ou KO pour ZAP-70 est une étape essentielle pour connaître le rôle de ZAP-70 lors du remodelage post-IDM. On peut aussi envisager un double KO avec GADD45 γ afin de voir ces effets sur l'IDM et l'IC.

2/ Biomarqueur

La mise en évidence de nouveaux biomarqueurs dans le développement précoce de la dysfonction ventriculaire gauche après IDM est essentielle dans la prise en charge d'un patient.

L'analyse de l'expression des isoformes GADD45 α , GADD45 β , GADD45 γ mais aussi de ZAP-70 en fonction des marqueurs de l'IC, comme la cTn ou la créatinine, du sexe, de l'âge, l'IMC ou encore la survie à un an est cruciale.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annual review of physiology*. 2008;70(23-49).
2. Pierce KL, Premont RT, and Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002;3(9):639-50.
3. Rockman HA, Koch WJ, and Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*. 2002;415(6868):206-12.
4. Rohrer DK, Chruscinski A, Schauble EH, Bernstein D, and Kobilka BK. Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta1- and beta2-adrenergic receptors. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(24):16701-8.
5. Ely SW, and Berne RM. Protective effects of adenosine in myocardial ischemia. *Circulation*. 1992;85(3):893-904.
6. Shah AM, and Mann DL. In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science. *Lancet*. 2011;378(9792):704-12.
7. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014;129(3):e28-e292.
8. Hill JA. Electrical remodeling in cardiac hypertrophy. *Trends in cardiovascular medicine*. 2003;13(8):316-22.
9. Bui AL, Horwich TB, and Fonarow GC. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nature reviews Cardiology*. 2011;8(1):30-41.
10. Jivraj N, Liew F, and Marber M. Ischaemic postconditioning: cardiac protection after the event. *Anaesthesia*. 2015;70(5):598-612.
11. Pazos-Lopez P, Peteiro-Vazquez J, Carcia-Campos A, Garcia-Bueno L, de Torres JP, and Castro-Beiras A. The causes, consequences, and treatment of left or right heart failure. *Vascular health and risk management*. 2011;7(237-54).
12. Mosterd A, and Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*. 2007;93(9):1137-46.
13. Mancia G. Ambulatory central blood pressure: a new opportunity for mechanistic and clinical cardiovascular research. *Hypertension*. 2013;61(6):1148-9.
14. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, Murabito JM, Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D, et al. Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2002;106(24):3068-72.
15. Mosterd A, Hoes AW, de Bruyne MC, Deckers JW, Linker DT, Hofman A, and Grobbee DE. Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population; The Rotterdam Study. *European heart journal*. 1999;20(6):447-55.
16. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;37(12):1595-607.
17. Roger VL, and O'Donnell CJ. Population health, outcomes research, and prevention: example of the American Heart Association 2020 goals. *Circulation Cardiovascular quality and outcomes*. 2012;5(1):6-8.
18. Battiprolu PK, Lopez-Crisosto C, Wang ZV, Nemchenko A, Lavandero S, and Hill JA. Diabetic cardiomyopathy and metabolic remodeling of the heart. *Life sciences*. 2013;92(11):609-15.
19. Cleland JG, Swedberg K, Follath F, Komajda M, Cohen-Solal A, Aguilar JC, Dietz R, Gavazzi A, Hobbs R, Korewicki J, et al. The EuroHeart Failure survey programme-- a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe. Part 1: patient characteristics and diagnosis. *European heart journal*. 2003;24(5):442-63.
20. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, Joint ESCAAHAWHFTfUDoMI, Authors/Task Force Members C, Thygesen K, Alpert JS, et al. Third

- universal definition of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;60(16):1581-98.
21. Tehrani DM, and Seto AH. Third universal definition of myocardial infarction: update, caveats, differential diagnoses. *Cleveland Clinic journal of medicine*. 2013;80(12):777-86.
 22. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, and Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circulation research*. 2014;114(12):1852-66.
 23. Davies MJ. Glagovian remodelling, plaque composition, and stenosis generation. *Heart*. 2000;84(5):461-2.
 24. Gorman RC, Jackson BM, Burdick JA, and Gorman JH. Infarct restraint to limit adverse ventricular remodeling. *Journal of cardiovascular translational research*. 2011;4(1):73-81.
 25. Bouleti C, Mewton N, and Germain S. The no-reflow phenomenon: State of the art. *Archives of cardiovascular diseases*. 2015;108(12):661-74.
 26. Yellon DM, and Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *The New England journal of medicine*. 2007;357(11):1121-35.
 27. Frohlich GM, Meier P, White SK, Yellon DM, and Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI. *European heart journal*. 2013;34(23):1714-22.
 28. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, and Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2003;285(2):H579-88.
 29. Roubille F, Franck-Miclo A, Covinhas A, Lafont C, Cransac F, Combes S, Vincent A, Fontanaud P, Sportouch-Dukhan C, Redt-Clouet C, et al. Delayed postconditioning in the mouse heart in vivo. *Circulation*. 2011;124(12):1330-6.
 30. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, and Grover GJ. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circulation research*. 1997;81(6):1072-82.
 31. Punj A, Mockridge JW, Farooqui S, Marber MS, and Heads RJ. Sustained activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase during recovery from simulated ischaemia mediates adaptive cytoprotection in cardiomyocytes. *The Biochemical journal*. 2000;350 Pt 3(891-9).
 32. Houser SR, Margulies KB, Murphy AM, Spinale FG, Francis GS, Prabhu SD, Rockman HA, Kass DA, Molkentin JD, Sussman MA, et al. Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation research*. 2012;111(1):131-50.
 33. Patten RD, and Hall-Porter MR. Small animal models of heart failure: development of novel therapies, past and present. *Circulation Heart failure*. 2009;2(2):138-44.
 34. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, and Ballantyne CM. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *The American journal of physiology*. 1995;269(6 Pt 2):H2147-54.
 35. Burchfield JS, Xie M, and Hill JA. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation*. 2013;128(4):388-400.
 36. Fraccarollo D, Galuppo P, and Bauersachs J. Novel therapeutic approaches to post-infarction remodelling. *Cardiovascular research*. 2012;94(2):293-303.
 37. Prabhu SD, and Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circulation research*. 2016;119(1):91-112.
 38. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, et al. Apoptosis in the failing human heart. *The New England journal of medicine*. 1997;336(16):1131-41.
 39. Nakayama H, Chen X, Baines CP, Klevitsky R, Zhang X, Zhang H, Jaleel N, Chua BH, Hewett TE, Robbins J, et al. Ca²⁺- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(9):2431-44.

40. Kostin S, Pool L, Elsasser A, Hein S, Drexler HC, Arnon E, Hayakawa Y, Zimmermann R, Bauer E, Klovekorn WP, et al. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circulation research*. 2003;92(7):715-24.
41. Ellis HM, and Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*. 1986;44(6):817-29.
42. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*. 2009;16(1):3-11.
43. Whelan RS, Kaplinskiy V, and Kitsis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annual review of physiology*. 2010;72(19-44).
44. Pop C, and Salvesen GS. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(33):21777-81.
45. Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM, Wu Q, Datta P, Alnemri ES, and Shi Y. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell*. 2001;104(5):769-80.
46. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation*. 2012;19(1):107-20.
47. Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, and Lenardo MJ. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*. 2000;288(5475):2354-7.
48. Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schroter M, et al. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature*. 1997;386(6624):517-21.
49. Hsu H, Xiong J, and Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*. 1995;81(4):495-504.
50. Ea CK, Deng L, Xia ZP, Pineda G, and Chen ZJ. Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Molecular cell*. 2006;22(2):245-57.
51. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, and Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular cell*. 2002;9(2):423-32.
52. Golstein P, and Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in biochemical sciences*. 2007;32(1):37-43.
53. Zong WX, Ditsworth D, Bauer DE, Wang ZQ, and Thompson CB. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes & development*. 2004;18(11):1272-82.
54. Karch J, and Molkenkin JD. Regulated necrotic cell death: the passive aggressive side of Bax and Bak. *Circulation research*. 2015;116(11):1800-9.
55. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *The Biochemical journal*. 1999;341 (Pt 2)(233-49).
56. Skulachev VP. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2006;11(4):473-85.
57. Vercaemmen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, Van Loo G, Declercq W, Grooten J, Fiers W, and Vandenabeele P. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *The Journal of experimental medicine*. 1998;187(9):1477-85.
58. Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, Dong MQ, and Han J. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science*. 2009;325(5938):332-6.

59. Galluzzi L, Kepp O, Krautwald S, Kroemer G, and Linkermann A. Molecular mechanisms of regulated necrosis. *Seminars in cell & developmental biology*. 2014;35(24-32).
60. He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, and Wang X. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- α . *Cell*. 2009;137(6):1100-11.
61. Nishida K, and Otsu K. Autophagy during cardiac remodeling. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2015.
62. Klionsky DJ, and Ohsumi Y. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annual review of cell and developmental biology*. 1999;15(1-32).
63. Lee P, Sata M, Lefer DJ, Factor SM, Walsh K, and Kitsis RN. Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2003;284(2):H456-63.
64. Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G, Taffet GE, Peschon JJ, Sivasubramanian N, Entman ML, and Mann DL. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(10):5456-61.
65. Chen QM, and Tu VC. Apoptosis and heart failure: mechanisms and therapeutic implications. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions*. 2002;2(1):43-57.
66. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, and Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 2001;292(5517):727-30.
67. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC, and Kitsis RN. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(10):1497-504.
68. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, and Tsujimoto Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*. 2005;434(7033):652-8.
69. Smith CC, Davidson SM, Lim SY, Simpkin JC, Hothersall JS, and Yellon DM. Necrostatin: a potentially novel cardioprotective agent? *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*. 2007;21(4):227-33.
70. Eltzschig HK, Bratton DL, and Colgan SP. Targeting hypoxia signalling for the treatment of ischaemic and inflammatory diseases. *Nature reviews Drug discovery*. 2014;13(11):852-69.
71. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, and Entman ML. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *Journal of immunology*. 2000;165(5):2798-808.
72. Pinto VI, Mohammadi H, Lee WS, Cheung AH, and McCulloch CA. PAK1 is involved in sensing the orientation of collagen stiffness gradients in mouse fibroblasts. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1853(10 Pt A):2526-38.
73. Vasquez C, Benamer N, and Morley GE. The cardiac fibroblast: functional and electrophysiological considerations in healthy and diseased hearts. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2011;57(4):380-8.
74. Creemers EE, and Pinto YM. Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart. *Cardiovascular research*. 2011;89(2):265-72.
75. Lorell BH, and Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*. 2000;102(4):470-9.
76. Talman V, and Ruskoaho H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration. *Cell and tissue research*. 2016.
77. Flack EC, Lindsey ML, Squires CE, Kaplan BS, Stroud RE, Clark LL, Escobar PG, Yarbrough WM, and Spinale FG. Alterations in cultured myocardial fibroblast function following the development of left ventricular failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2006;40(4):474-83.

78. Wang Y, and Hill JA. Electrophysiological remodeling in heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2010;48(4):619-32.
79. Pfeffer MA, and Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81(4):1161-72.
80. Morel E, Marcantoni A, Gastineau M, Birkedal R, Rochais F, Garnier A, Lompre AM, Vandecasteele G, and Lezoualc'h F. cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation research*. 2005;97(12):1296-304.
81. Metrich M, Lucas A, Gastineau M, Samuel JL, Heymes C, Morel E, and Lezoualc'h F. Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation research*. 2008;102(8):959-65.
82. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, and Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet*. 2006;367(9507):356-67.
83. Rose BA, Force T, and Wang Y. Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale. *Physiological reviews*. 2010;90(4):1507-46.
84. Lammerding J, Kamm RD, and Lee RT. Mechanotransduction in cardiac myocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1015(53-70).
85. Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, et al. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *The EMBO journal*. 2000;19(23):6341-50.
86. Purcell NH, Wilkins BJ, York A, Saba-El-Leil MK, Meloche S, Robbins J, and Molkentin JD. Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(35):14074-9.
87. Kehat I. Novel strategies for the treatment of heart failure. *Rambam Maimonides medical journal*. 2012;3(2):e0011.
88. Barr RK, and Bogoyevitch MA. The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2001;33(11):1047-63.
89. Hreniuk D, Garay M, Gaarde W, Monia BP, McKay RA, and Cioffi CL. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase 1, but not c-Jun N-terminal kinase 2, suppresses apoptosis induced by ischemia/reoxygenation in rat cardiac myocytes. *Molecular pharmacology*. 2001;59(4):867-74.
90. Shao Z, Bhattacharya K, Hsich E, Park L, Walters B, Germann U, Wang YM, Kyriakis J, Mohanlal R, Kuida K, et al. c-Jun N-terminal kinases mediate reactivation of Akt and cardiomyocyte survival after hypoxic injury in vitro and in vivo. *Circulation research*. 2006;98(1):111-8.
91. Regan CP, Li W, Boucher DM, Spatz S, Su MS, and Kuida K. Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(14):9248-53.
92. Hayashi M, Kim SW, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Abel ED, Eliceiri B, Yang Y, Ulevitch RJ, and Lee JD. Targeted deletion of BMK1/ERK5 in adult mice perturbs vascular integrity and leads to endothelial failure. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(8):1138-48.
93. Evers PA, van den IP, Quinlan RA, Goedert M, and Cohen P. Use of a drug-resistant mutant of stress-activated protein kinase 2a/p38 to validate the in vivo specificity of SB 203580. *FEBS letters*. 1999;451(2):191-6.
94. Davies SP, Reddy H, Caivano M, and Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *The Biochemical journal*. 2000;351(Pt 1):95-105.
95. Otsu K, Yamashita N, Nishida K, Hirotsu S, Yamaguchi O, Watanabe T, Hikoso S, Higuchi Y, Matsumura Y, Maruyama M, et al. Disruption of a single copy of the p38alpha MAP kinase gene leads to cardioprotection against ischemia-reperfusion. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;302(1):56-60.

96. Tanno M, Bassi R, Gorog DA, Saurin AT, Jiang J, Heads RJ, Martin JL, Davis RJ, Flavell RA, and Marber MS. Diverse mechanisms of myocardial p38 mitogen-activated protein kinase activation: evidence for MKK-independent activation by a TAB1-associated mechanism contributing to injury during myocardial ischemia. *Circulation research*. 2003;93(3):254-61.
97. De Nicola GF, Martin ED, Chaikuad A, Bassi R, Clark J, Martino L, Verma S, Sicard P, Tata R, Atkinson RA, et al. Mechanism and consequence of the autoactivation of p38alpha mitogen-activated protein kinase promoted by TAB1. *Nature structural & molecular biology*. 2013;20(10):1182-90.
98. Salvador JM, Mittelstadt PR, Guszczynski T, Copeland TD, Yamaguchi H, Appella E, Fornace AJ, Jr., and Ashwell JD. Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nature immunology*. 2005;6(4):390-5.
99. Li J, Miller EJ, Ninomiya-Tsuji J, Russell RR, 3rd, and Young LH. AMP-activated protein kinase activates p38 mitogen-activated protein kinase by increasing recruitment of p38 MAPK to TAB1 in the ischemic heart. *Circulation research*. 2005;97(9):872-9.
100. Shi J, Guan J, Jiang B, Brenner DA, Del Monte F, Ward JE, Connors LH, Sawyer DB, Semigran MJ, Macgillivray TE, et al. Amyloidogenic light chains induce cardiomyocyte contractile dysfunction and apoptosis via a non-canonical p38alpha MAPK pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(9):4188-93.
101. Denise Martin E, De Nicola GF, and Marber MS. New therapeutic targets in cardiology: p38 alpha mitogen-activated protein kinase for ischemic heart disease. *Circulation*. 2012;126(3):357-68.
102. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, and Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation*. 1996;93(4):704-11.
103. Marber MS, Rose B, and Wang YB. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway-A potential target for intervention in infarction, hypertrophy, and heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2011;51(4):485-90.
104. Li M, Georgakopoulos D, Lu G, Hester L, Kass DA, Hasday J, and Wang Y. p38 MAP kinase mediates inflammatory cytokine induction in cardiomyocytes and extracellular matrix remodeling in heart. *Circulation*. 2005;111(19):2494-502.
105. Arabacilar P, and Marber M. The case for inhibiting p38 mitogen-activated protein kinase in heart failure. *Front Pharmacol*. 2015;6(
106. Liao P, Georgakopoulos D, Kovacs A, Zheng M, Lerner D, Pu H, Saffitz J, Chien K, Xiao RP, Kass DA, et al. The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(21):12283-8.
107. Nishida K, Yamaguchi O, Hirotsu S, Hikoso S, Higuchi Y, Watanabe T, Takeda T, Osuka S, Morita T, Kondoh G, et al. p38alpha mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(24):10611-20.
108. Zhang S, Weinheimer C, Courtois M, Kovacs A, Zhang CE, Cheng AM, Wang Y, and Muslin AJ. The role of the Grb2-p38 MAPK signaling pathway in cardiac hypertrophy and fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(6):833-41.
109. Streicher JM, Ren S, Herschman H, and Wang Y. MAPK-activated protein kinase-2 in cardiac hypertrophy and cyclooxygenase-2 regulation in heart. *Circulation research*. 2010;106(8):1434-43.
110. Ren J, Zhang S, Kovacs A, Wang Y, and Muslin AJ. Role of p38alpha MAPK in cardiac apoptosis and remodeling after myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2005;38(4):617-23.
111. Communal C, Colucci WS, and Singh K. p38 mitogen-activated protein kinase pathway protects adult rat ventricular myocytes against beta -adrenergic receptor-stimulated

- apoptosis. Evidence for Gi-dependent activation. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(25):19395-400.
112. Thandavarayan RA, Watanabe K, Ma M, Gurusamy N, Veeraveedu PT, Konishi T, Zhang S, Muslin AJ, Kodama M, and Aizawa Y. Dominant-negative p38alpha mitogen-activated protein kinase prevents cardiac apoptosis and remodeling after streptozotocin-induced diabetes mellitus. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2009;297(3):H911-9.
 113. Wang Y, Huang S, Sah VP, Ross J, Jr., Brown JH, Han J, and Chien KR. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(4):2161-8.
 114. Kaiser RA, Bueno OF, Lips DJ, Doevendans PA, Jones F, Kimball TF, and Molkentin JD. Targeted inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase antagonizes cardiac injury and cell death following ischemia-reperfusion in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(15):15524-30.
 115. Ma XL, Kumar S, Gao F, Louden CS, Lopez BL, Christopher TA, Wang C, Lee JC, Feuerstein GZ, and Yue TL. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*. 1999;99(13):1685-91.
 116. Kompa AR, See F, Lewis DA, Adrahtas A, Cantwell DM, Wang BH, and Krum H. Long-term but not short-term p38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves cardiac function and reduces cardiac remodeling post-myocardial infarction. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2008;325(3):741-50.
 117. See F, Thomas W, Way K, Tzanidis A, Kompa A, Lewis D, Itescu S, and Krum H. p38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves cardiac function and attenuates left ventricular remodeling following myocardial infarction in the rat. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;44(8):1679-89.
 118. Taniike M, Yamaguchi O, Tsujimoto I, Hikoso S, Takeda T, Nakai A, Omiya S, Mizote I, Nakano Y, Higuchi Y, et al. Apoptosis signal-regulating kinase 1/p38 signaling pathway negatively regulates physiological hypertrophy. *Circulation*. 2008;117(4):545-52.
 119. Braz JC, Bueno OF, Liang Q, Wilkins BJ, Dai YS, Parsons S, Braunwart J, Glascock BJ, Klevitsky R, Kimball TF, et al. Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(10):1475-86.
 120. Tenhunen O, Soini Y, Ilves M, Rysa J, Tuukkanen J, Serpi R, Pennanen H, Ruskoaho H, and Leskinen H. p38 Kinase rescues failing myocardium after myocardial infarction: evidence for angiogenic and anti-apoptotic mechanisms. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20(11):1907-9.
 121. Saurin AT, Martin JL, Heads RJ, Foley C, Mockridge JW, Wright MJ, Wang Y, and Marber MS. The role of differential activation of p38-mitogen-activated protein kinase in preconditioned ventricular myocytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2000;14(14):2237-46.
 122. Kim JK, Pedram A, Razandi M, and Levin ER. Estrogen prevents cardiomyocyte apoptosis through inhibition of reactive oxygen species and differential regulation of p38 kinase isoforms. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(10):6760-7.
 123. Kumphune S, Bassi R, Jacquet S, Sicard P, Clark JE, Verma S, Avkiran M, O'Keefe SJ, and Marber MS. A chemical genetic approach reveals that p38alpha MAPK activation by diphosphorylation aggravates myocardial infarction and is prevented by the direct binding of SB203580. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(5):2968-75.
 124. Sicard P, Clark JE, Jacquet S, Mohammadi S, Arthur JS, O'Keefe SJ, and Marber MS. The activation of p38 alpha, and not p38 beta, mitogen-activated protein kinase is required for ischemic preconditioning. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2010;48(6):1324-8.

125. Clark JE, Sarafraz N, and Marber MS. Potential of p38-MAPK inhibitors in the treatment of ischaemic heart disease. *Pharmacology & therapeutics*. 2007;116(2):192-206.
126. Raman M, Chen W, and Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 2007;26(22):3100-12.
127. Tamura K, Sudo T, Senftleben U, Dadak AM, Johnson R, and Karin M. Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell*. 2000;102(2):221-31.
128. Zhang J, Shen B, and Lin A. Novel strategies for inhibition of the p38 MAPK pathway. *Trends in pharmacological sciences*. 2007;28(6):286-95.
129. Mackay K, and Mochly-Rosen D. An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(10):6272-9.
130. Tanno M, Gorog DA, Bellahcene M, Cao X, Quinlan RA, and Marber MS. Tumor necrosis factor-induced protection of the murine heart is independent of p38-MAPK activation. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2003;35(12):1523-7.
131. Marais E, Genade S, Huisamen B, Strijdom JG, Moolman JA, and Lochner A. Activation of p38 MAPK induced by a multi-cycle ischaemic preconditioning protocol is associated with attenuated p38 MAPK activity during sustained ischaemia and reperfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2001;33(4):769-78.
132. Ota A, Zhang J, Ping P, Han J, and Wang Y. Specific regulation of noncanonical p38alpha activation by Hsp90-Cdc37 chaperone complex in cardiomyocyte. *Circulation research*. 2010;106(8):1404-12.
133. Lu G, Kang YJ, Han J, Herschman HR, Stefani E, and Wang Y. TAB-1 modulates intracellular localization of p38 MAP kinase and downstream signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(9):6087-95.
134. Fiedler B, Feil R, Hofmann F, Willenbockel C, Drexler H, Smolenski A, Lohmann SM, and Wollert KC. cGMP-dependent protein kinase type I inhibits TAB1-p38 mitogen-activated protein kinase apoptosis signaling in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(43):32831-40.
135. Ashwell JD. The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(7):532-40.
136. Takekawa M, and Saito H. A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell*. 1998;95(4):521-30.
137. Mizote I, Yamaguchi O, Hikoso S, Takeda T, Taneike M, Oka T, Tamai T, Oyabu J, Matsumura Y, Nishida K, et al. Activation of MTK1/MEKK4 induces cardiomyocyte death and heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2010;48(2):302-9.
138. Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, Chen Y, Clapham P, Coates G, Fairley S, Fitzgerald S, et al. Ensembl 2011. *Nucleic acids research*. 2011;39(Database issue):D800-6.
139. Fornace AJ, Jr., Alamo I, Jr., and Hollander MC. DNA damage-inducible transcripts in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(23):8800-4.
140. Abdollahi A, Lord KA, Hoffman-Liebermann B, and Liebermann DA. Sequence and expression of a cDNA encoding MyD118: a novel myeloid differentiation primary response gene induced by multiple cytokines. *Oncogene*. 1991;6(1):165-7.
141. Zhang W, Bae I, Krishnaraju K, Azam N, Fan W, Smith K, Hoffman B, and Liebermann DA. CR6: A third member in the MyD118 and Gadd45 gene family which functions in negative growth control. *Oncogene*. 1999;18(35):4899-907.
142. Sanchez R, Pantoja-Uceda D, Torres D, Prieto J, Campos-Olivas R, and Blanco FJ. NMR assignment and secondary structure of human growth arrest and DNA damage alpha protein (Gadd45 alpha). *Biomolecular NMR assignments*. 2008;2(2):139-42.

143. Schrag JD, Jiralerspong S, Banville M, Jaramillo ML, and O'Connor-McCourt MD. The crystal structure and dimerization interface of GADD45gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(18):6566-71.
144. Kovalsky O, Lung FD, Roller PP, and Fornace AJ, Jr. Oligomerization of human Gadd45a protein. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(42):39330-9.
145. Papa S, Monti SM, Vitale RM, Bubici C, Jayawardena S, Alvarez K, De Smaele E, Dathan N, Pedone C, Ruvo M, et al. Insights into the structural basis of the GADD45beta-mediated inactivation of the JNK kinase, MKK7/JNK2. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(26):19029-41.
146. Bulavin DV, Higashimoto Y, Popoff IJ, Gaarde WA, Basrur V, Potapova O, Appella E, and Fornace AJ, Jr. Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature*. 2001;411(6833):102-7.
147. Moskalev AA, Shaposhnikov MV, Plyusnina EN, Zhavoronkov A, Budovsky A, Yanai H, and Fraifeld VE. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing research reviews*. 2013;12(2):661-84.
148. Zhan Q, Carrier F, and Fornace AJ, Jr. Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agents and growth arrest. *Molecular and cellular biology*. 1993;13(7):4242-50.
149. Zhan Q, Chen IT, Antinore MJ, and Fornace AJ, Jr. Tumor suppressor p53 can participate in transcriptional induction of the GADD45 promoter in the absence of direct DNA binding. *Molecular and cellular biology*. 1998;18(5):2768-78.
150. Zheng L, Pan H, Li S, Flesken-Nikitin A, Chen PL, Boyer TG, and Lee WH. Sequence-specific transcriptional corepressor function for BRCA1 through a novel zinc finger protein, ZBRK1. *Molecular cell*. 2000;6(4):757-68.
151. Tamura RE, de Vasconcellos JF, Sarkar D, Libermann TA, Fisher PB, and Zerbini LF. GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. *Current molecular medicine*. 2012;12(5):634-51.
152. Hollander MC, Sheikh MS, Bulavin DV, Lundgren K, Augeri-Henmueller L, Shehee R, Molinaro TA, Kim KE, Tolosa E, Ashwell JD, et al. Genomic instability in Gadd45a-deficient mice. *Nature genetics*. 1999;23(2):176-84.
153. Stoimenov I, and Helleday T. PCNA on the crossroad of cancer. *Biochemical Society transactions*. 2009;37(Pt 3):605-13.
154. Smith ML, Ford JM, Hollander MC, Bortnick RA, Amundson SA, Seo YR, Deng CX, Hanawalt PC, and Fornace AJ, Jr. p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(10):3705-14.
155. Carrier F, Georgel PT, Pourquier P, Blake M, Kontny HU, Antinore MJ, Gariboldi M, Myers TG, Weinstein JN, Pommier Y, et al. Gadd45, a p53-responsive stress protein, modifies DNA accessibility on damaged chromatin. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(3):1673-85.
156. Sytnikova YA, Kubarenko AV, Schafer A, Weber AN, and Niehrs C. Gadd45a is an RNA binding protein and is localized in nuclear speckles. *PLoS one*. 2011;6(1):e14500.
157. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, and Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*. 2003;36(3):131-49.
158. Zhang RP, Shao JZ, and Xiang LX. GADD45A protein plays an essential role in active DNA demethylation during terminal osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(47):41083-94.
159. Vairapandi M, Balliet AG, Hoffman B, and Liebermann DA. GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. *Journal of cellular physiology*. 2002;192(3):327-38.
160. Yang Q, Manicone A, Coursen JD, Linke SP, Nagashima M, Forgues M, and Wang XW. Identification of a functional domain in a GADD45-mediated G2/M checkpoint. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(47):36892-8.

161. Harkin DP, Bean JM, Miklos D, Song YH, Truong VB, Englert C, Christians FC, Ellisen LW, Maheswaran S, Oliner JD, et al. Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1. *Cell*. 1999;97(5):575-86.
162. Hildesheim J, Bulavin DV, Anver MR, Alvord WG, Hollander MC, Vardanian L, and Fornace AJ, Jr. Gadd45a protects against UV irradiation-induced skin tumors, and promotes apoptosis and stress signaling via MAPK and p53. *Cancer research*. 2002;62(24):7305-15.
163. Plataniias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood*. 2003;101(12):4667-79.
164. Oh-Hashi K, Maruyama W, and Isobe K. Peroxynitrite induces GADD34, 45, and 153 VIA p38 MAPK in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Free radical biology & medicine*. 2001;30(2):213-21.
165. Zerbini LF, Wang Y, Czibere A, Correa RG, Cho JY, Ijiri K, Wei W, Joseph M, Gu X, Grall F, et al. NF-kappa B-mediated repression of growth arrest- and DNA-damage-inducible proteins 45alpha and gamma is essential for cancer cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(37):13618-23.
166. Du F, Wang L, Zhang Y, Jiang W, Sheng H, Cao Q, Wu J, Shen B, Shen T, Zhang JZ, et al. Role of GADD45 beta in the regulation of synovial fluid T cell apoptosis in rheumatoid arthritis. *Clinical immunology*. 2008;128(2):238-47.
167. Engelmann A, Speidel D, Bornkamm GW, Deppert W, and Stocking C. Gadd45 beta is a pro-survival factor associated with stress-resistant tumors. *Oncogene*. 2008;27(10):1429-38.
168. Kaufmann LT, Gierl MS, and Niehrs C. Gadd45a, Gadd45b and Gadd45g expression during mouse embryonic development. *Gene expression patterns : GEP*. 2011;11(8):465-70.
169. Johnen H, Gonzalez-Silva L, Carramolino L, Flores JM, Torres M, and Salvador JM. Gadd45g is essential for primary sex determination, male fertility and testis development. *PLoS one*. 2013;8(3):e58751.
170. Gierl MS, Gruhn WH, von Seggern A, Maltry N, and Niehrs C. GADD45G functions in male sex determination by promoting p38 signaling and Sry expression. *Developmental cell*. 2012;23(5):1032-42.
171. Gantner ML, Hazen BC, Conkright J, and Kralli A. GADD45gamma regulates the thermogenic capacity of brown adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(32):11870-5.
172. Steenbergen C, Afshari CA, Petranka JG, Collins J, Martin K, Bennett L, Haugen A, Bushel P, and Murphy E. Alterations in apoptotic signaling in human idiopathic cardiomyopathic hearts in failure. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2003;284(1):H268-76.
173. Wang J, Wang H, Chen J, Wang X, Sun K, Wang Y, Wang J, Yang X, Song X, Xin Y, et al. GADD45B inhibits MKK7-induced cardiac hypertrophy and the polymorphisms of GADD45B is associated with inter-ventricular septum hypertrophy. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;372(4):623-8.
174. Kim MY, Seo EJ, Lee DH, Kim EJ, Kim HS, Cho HY, Chung EY, Lee SH, Baik EJ, Moon CH, et al. Gadd45beta is a novel mediator of cardiomyocyte apoptosis induced by ischaemia/hypoxia. *Cardiovascular research*. 2010;87(1):119-26.
175. Kim YA, Kim MY, Yu HY, Mishra SK, Lee JH, Choi KS, Kim JH, Xiang YK, and Jung YS. Gadd45beta is transcriptionally activated by p53 via p38alpha-mediated phosphorylation during myocardial ischemic injury. *Journal of molecular medicine*. 2013;91(11):1303-13.
176. Lu B, Yu H, Chow C, Li B, Zheng W, Davis RJ, and Flavell RA. GADD45gamma mediates the activation of the p38 and JNK MAP kinase pathways and cytokine production in effector TH1 cells. *Immunity*. 2001;14(5):583-90.
177. Kolk MV, Meyberg D, Deuse T, Tang-Quan KR, Robbins RC, Reichenspurner H, and Schrepfer S. LAD-ligation: a murine model of myocardial infarction. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2009(32).

178. Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, and Koike T. Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nature protocols*. 2009;4(10):1513-21.
179. Salvador JM, Brown-Clay JD, and Fornace AJ, Jr. Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis. *Advances in experimental medicine and biology*. 2013;793(1-19).
180. Tornatore L, Marasco D, Dathan N, Vitale RM, Benedetti E, Papa S, Franzoso G, Ruvo M, and Monti SM. Gadd45 beta forms a homodimeric complex that binds tightly to MKK7. *Journal of molecular biology*. 2008;378(1):97-111.
181. Costa A, Eberlin S, Clerici SP, and Abdalla BM. In vitro effects of infrared A radiation on the synthesis of MMP-1, catalase, superoxide dismutase and GADD45 alpha protein. *Inflammation & allergy drug targets*. 2015;14(1):53-9.
182. Lal A, and Gorospe M. Egad, more forms of gene regulation: the gadd45a story. *Cell cycle*. 2006;5(13):1422-5.
183. Schmidt M, and Finley D. Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1843(1):13-25.
184. Corn PG, and El-Deiry WS. Microarray analysis of p53-dependent gene expression in response to hypoxia and DNA damage. *Cancer biology & therapy*. 2007;6(12):1858-66.
185. Vlachostergios PJ, Patrikidou A, Daliani DD, and Papandreou CN. The ubiquitin-proteasome system in cancer, a major player in DNA repair. Part 2: transcriptional regulation. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(9B):3019-31.
186. Daino K, Ichimura S, and Neno M. Early induction of CDKN1A (p21) and GADD45 mRNA by a low dose of ionizing radiation is due to their dose-dependent post-transcriptional regulation. *Radiation research*. 2002;157(4):478-82.
187. Sakaue M, Adachi H, and Jetten AM. Post-transcriptional regulation of MyD118 and GADD45 in human lung carcinoma cells during 6-[3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphthalene carboxylic acid-induced apoptosis. *Molecular pharmacology*. 1999;55(4):668-76.
188. Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Ujihara H, and Koike T. Mobility shift detection of phosphorylation on large proteins using a Phos-tag SDS-PAGE gel strengthened with agarose. *Proteomics*. 2009;9(16):4098-101.
189. Kinoshita-Kikuta E, Kinoshita E, and Koike T. Phos-tag beads as an immunoblotting enhancer for selective detection of phosphoproteins in cell lysates. *Analytical biochemistry*. 2009;389(1):83-5.
190. Takiyama K, Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Fujioka Y, Kubo Y, and Koike T. A Phos-tag-based fluorescence resonance energy transfer system for the analysis of the dephosphorylation of phosphopeptides. *Analytical biochemistry*. 2009;388(2):235-41.
191. Cho HJ, Park SM, Hwang EM, Baek KE, Kim IK, Nam IK, Im MJ, Park SH, Bae S, Park JY, et al. Gadd45b mediates Fas-induced apoptosis by enhancing the interaction between p38 and retinoblastoma tumor suppressor. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(33):25500-5.
192. Pereira L, Ruiz-Hurtado G, Morel E, Laurent AC, Metrich M, Dominguez-Rodriguez A, Lauton-Santos S, Lucas A, Benitah JP, Bers DM, et al. Epac enhances excitation-transcription coupling in cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2012;52(1):283-91.
193. Laurent AC, Bisselier M, Lucas A, Tortosa F, Roumieux M, De Regibus A, Swiader A, Sainte-Marie Y, Heymes C, Vindis C, et al. Exchange protein directly activated by cAMP 1 promotes autophagy during cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovascular research*. 2015;105(1):55-64.
194. Laurent AC, Breckler M, Berthouze M, and Lezoualc'h F. Role of Epac in brain and heart. *Biochemical Society transactions*. 2012;40(1):51-7.
195. Cazorla O, Lucas A, Poirier F, Lacampagne A, and Lezoualc'h F. The cAMP binding protein Epac regulates cardiac myofilament function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(33):14144-9.
196. Yoo J, Ghiassi M, Jirmanova L, Balliet AG, Hoffman B, Fornace AJ, Jr., Liebermann DA, Bottinger EP, and Roberts AB. Transforming growth factor-beta-induced apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(44):43001-7.

197. Ju S, Zhu Y, Liu L, Dai S, Li C, Chen E, He Y, Zhang X, and Lu B. Gadd45b and Gadd45g are important for anti-tumor immune responses. *European journal of immunology*. 2009;39(11):3010-8.
198. Ofengeim D, and Yuan J. Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2013;14(11):727-36.
199. Azijli K, Yuvaraj S, van Roosmalen I, Flach K, Giovannetti E, Peters GJ, de Jong S, and Kruyt FA. MAPK p38 and JNK have opposing activities on TRAIL-induced apoptosis activation in NSCLC H460 cells that involves RIP1 and caspase-8 and is mediated by Mcl-1. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2013;18(7):851-60.
200. Azijli K, Weyhenmeyer B, Peters GJ, de Jong S, and Kruyt FA. Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family. *Cell death and differentiation*. 2013;20(7):858-68.
201. Cheung PCF, Campbell DG, Nebreda AR, and Cohen P. Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38 alpha. *Embo Journal*. 2003;22(21):5793-805.
202. Sicard P, Jacquet S, Kobayashi KS, Flavell RA, and Marber MS. Pharmacological postconditioning effect of muramyl dipeptide is mediated through RIP2 and TAK1. *Cardiovascular research*. 2009;83(2):277-84.
203. Li L, Chen Y, Doan J, Murray J, Molkenstein JD, and Liu QH. Transforming Growth Factor beta-Activated Kinase 1 Signaling Pathway Critically Regulates Myocardial Survival and Remodeling. *Circulation*. 2014;130(24):2162-+.
204. Salvador JM, Mittelstadt PR, Belova GI, Fornace AJ, Jr., and Ashwell JD. The autoimmune suppressor Gadd45alpha inhibits the T cell alternative p38 activation pathway. *Nature immunology*. 2005;6(4):396-402.
205. Coggins M, and Rosenzweig A. The fire within: cardiac inflammatory signaling in health and disease. *Circulation research*. 2012;110(1):116-25.
206. Swirski FK, and Nahrendorf M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science*. 2013;339(6116):161-6.
207. Liu J, Wang H, and Li J. Inflammation and Inflammatory Cells in Myocardial Infarction and Reperfusion Injury: A Double-Edged Sword. *Clinical Medicine Insights Cardiology*. 2016;10(79-84).
208. Hofmann U, Beyersdorf N, Weirather J, Podolskaya A, Bauersachs J, Ertl G, Kerkau T, and Frantz S. Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2012;125(13):1652-63.
209. Wange RL, and Samelson LE. Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity*. 1996;5(3):197-205.
210. Kaur M, Singh M, and Silakari O. Insight into the therapeutic aspects of 'Zeta-Chain Associated Protein Kinase 70 kDa' inhibitors: a review. *Cellular signalling*. 2014;26(11):2481-92.
211. Killip T, 3rd, and Kimball JT. Treatment of myocardial infarction in a coronary care unit. A two year experience with 250 patients. *The American journal of cardiology*. 1967;20(4):457-64.

Résumé

Le remodelage du ventricule gauche cardiaque post-infarctus est multifactoriel et bien connu. Il est caractérisé par un changement électrophysiologique, une fibrose et une mort des cellules cardiaques. La voie des Mitogen-activated protein kinase (MAPK) et plus particulièrement l'activation de la p38 MAPK est connue pour influencer ses processus et mener à l'insuffisance cardiaque (IC). La Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 (GADD45) est capable d'interagir et de réguler la p38 MAPK. GADD45 a des effets pléiotropiques mais son rôle dans le cœur est encore peu caractérisé. D'après la littérature, les différentes isoformes de GADD45 sont différentiellement exprimées lors d'une cardiomyopathie. Ici, nous avons tout d'abord identifié l'isoforme de GADD45 impliquée lors de l'infarctus du myocarde (IDM) de souris, GADD45 γ , puis nous avons étudié son impact dans les phases précoces et tardives du développement d'une IC après un IDM. Pour cela nous avons injecté en intraveineuse un vecteur adeno-associated viral (AAV9) codant GADD45 γ sous le contrôle du promoteur à la cardiac Troponin T (cTnT). Cette surexpression, mimant la dérégulation de GADD45 γ lors d'un IDM, a entraîné une augmentation de la fibrose, de l'apoptose et une dysfonction cardiaque de ces souris menant à une IC. De plus, un KO de GADD45 γ a permis de protéger ces souris de lésions dues à l'ischémie, notamment par une réduction de l'apoptose des cardiomyocytes. Nous démontrons enfin que les mécanismes permettant cette protection mettent en jeu l'activation de la receptor-interacting protein kinase 1 (RIP1) et de la caspase 8 par GADD45 γ sous le contrôle de la p38 MAPK. Notre travail démontre donc que l'accumulation de GADD45 γ lors de l'IDM est un élément important dans le développement de l'IC en induisant une apoptose dépendante de la p38 MAPK. Ce travail permet d'envisager GADD45 γ comme une cible thérapeutique potentielle de l'IC.

Abstract

Left ventricular post-infarction remodelling is multifactorial and well-known. It is characterized by an electrophysiological change, a fibrosis and a death of the cardiac cells. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway and more particularly the activation of p38 MAPK are known to influence its processes and to lead to heart failure (HF). Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 (GADD45) is able to interact and control p38 MAPK. GADD45 has pleiotropic effects but its role in the heart is little known. According to the literature, GADD45 isoforms are differentially expressed during a cardiomyopathy. Here, we first to identify the GADD45 isoform who upregulated during myocardial infarction (MI) of mouse, GADD45 γ , then we studied his impact to the acute and late phases of the development of HF after MI. Intravenous injection of an adeno-associated viral (AAV9) vector encoding GADD45 γ under the control of cardiac Troponin T (cTnT) promoter. This surexpression, miming the deregulation of GADD45 γ during MI, cause an increase in the fibrosis, apoptosis and a cardiac dysfunction of these mice leading to HF. Moreover, KO of GADD45 confers resistance to ischaemic injury, in particular by limiting cardiomyocyte apoptosis. We show finally that the mechanisms allowing this protection involves activation of the receptor-interacting protein kinase 1 (RIP1) and caspase 8 by GADD45 γ in a p38 MAPK dependant manner. Our works thus shows that GADD45 γ accumulation during MI is a significant component in HF development by inducing cardiomyocyte apoptosis in a p38 MAPK dependant manner. This work identify GADD45 γ as a potential therapeutic target in the development of HF.