

Université de Montréal

L'inhibition de la p38 α/β MAPK engendre une inhibition de la réponse inflammatoire et aboutit à la réintégration de deux populations distinctes de cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés dans le cycle cellulaire

Par
Mariana Kebbe

Département de Pharmacologie et Physiologie, Faculté de médecine
Institut de Cardiologie de Montréal

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de maîtrise en physiologie moléculaire, cellulaire et intégrative, option physiologie cardiovasculaire.

Mars 2024

©, Mariana Kebbe, 2024

Ce mémoire est intitulé

L'inhibition de la p38 α/β MAPK engendre une inhibition de la réponse inflammatoire et aboutit à la réintégration de deux populations distinctes de cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés dans le cycle cellulaire

Présenté par

Mariana Kebbe

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Madhu Anand-Srivastava

Président-rapporteur

Angelino Calderone

Directeur de recherche

Matthieu Ruiz

Membre du jury

Résumé et mots clés

Les expériences suivantes testent l'hypothèse que la sérine/thréonine kinase p38 α / β MAPK inhibe la rentrée dans le cycle cellulaire des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés (CVRNs), et induit l'expression d'un panel de cytokines/chimiokines inflammatoires. Le traitement des CVRNs par le phorbol 12,13-butyrate (PDBu), activateur de la protéine kinase C (PKC), aboutit au recrutement de l'isoforme conventionnelle (PKC- α) et des isoformes nouvelles (PKC- δ et PKC- ϵ) de PKC en l'absence de la rentrée dans le cycle cellulaire. Cette absence d'entrée dans le cycle cellulaire à la suite du traitement par PDBu est associée à une augmentation d'expression des ARNm des gènes qui bloquent la rentrée dans le cycle cellulaire. Les gènes comprennent Runx1(Runt-related transcription factor 1) et CDKN2a (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) également connu sous le nom de p16, inhibiteur du cycle cellulaire. En présence de l'inhibiteur de p38 α / β MAPK, SB203580, le traitement PDBu induit une entrée dans le cycle cellulaire de deux populations distinctes de cardiomyocytes caractérisées par l'absence ou l'expression de novo de la protéine filamenteuse Nestine. En parallèle, le co-traitement PDBu/SB203580 atténue l'augmentation du niveau d'expression de l'ARNm de Runx1 et CDKN2a. L'inhibition pharmacologique du recrutement de PKC- α par GF109203X, inhibe sélectivement la rentrée dans le cycle cellulaire des CVRNs qui présentent une expression de novo de Nestine. En parallèle, le traitement par PDBu augmente le niveau d'ARNm d'un panel de cytokines inflammatoires et la co-administration de SB203580 inhibe cette réponse. Ces données révèlent que le cœur des rats nouveau-nés contient deux sous-populations distinctes de cardiomyocytes ventriculaires qui rentrent dans le cycle cellulaire à la suite d'un co-traitement PDBu / SB203580, et que la réponse proliférative est associée à une diminution des cytokines inflammatoires. Collectivement, ces résultats mettent en relief une nouvelle prémisse selon laquelle le recrutement de p38 α / β MAPK médié par PKC- α joue un rôle central dans l'inhibition de l'entrée dans le cycle cellulaire et induit une réponse inflammatoire robuste par les CRVNs.

Mots clés : Cycle cellulaire, Nestine, PKC, p38 α / β MAPK, régénération cardiaque.

Abstract and keywords

The following experiments test the hypothesis that the serine/threonine kinase p38 α/β MAPK inhibits the cell cycle re-entry of neonatal rat ventricular cardiomyocytes (NNVMs) and induces the expression of a panel of inflammatory cytokines/chemokines. Treatment of NNVMs with phorbol 12,13-butyrate (PDBu), an activator of protein kinase C (PKC), results in the recruitment of the conventional isoform (PKC- α) and novel isoforms (PKC- δ and PKC- ϵ) of PKC in the absence of cell cycle re-entry. This lack of cell cycle re-entry following PDBu treatment is associated with an increase in the expression of mRNA of genes that inhibit cell cycle re-entry. These genes include Runx1 (Runt-related transcription factor 1) and CDKN2a (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), also known as p16, a cell cycle inhibitor. In the presence of the p38 α/β MAPK inhibitor, SB203580, PDBu treatment induces cell cycle re-entry in two distinct populations of cardiomyocytes characterized by the absence or de novo expression of the filamentous protein Nestin. In parallel, co-treatment with PDBu/SB203580 attenuates the increase in Runx1 and CDKN2a mRNA levels. Pharmacological inhibition of PKC- α recruitment by GF109203X selectively inhibits cell cycle re-entry of NNVMs exhibiting de novo Nestin expression. Additionally, PDBu treatment increases the mRNA levels of a panel of inflammatory cytokines, and co-administration of SB203580 inhibits this response. These data reveal that the heart of neonatal rats contain two distinct subpopulations of ventricular cardiomyocytes that re-enter the cell cycle following PDBu/SB203580 co-treatment, and that the proliferative response is associated with a decrease in inflammatory cytokines. Collectively, these results highlight a novel premise whereby p38 α/β MAPK recruitment mediated by PKC- α plays a central role in inhibiting cell cycle re-entry and induces a robust inflammatory response by NNVMs.

Key words: Cell Cycle re-entry, Nestin, PKC- α , p38 α/β MAPK, cardiac regeneration.

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| TABLE DES MATIERES | 4 |
| LISTE DES TABLEAUX | 6 |
| LISTE DES FIGURES | 7 |
| LISTES DES ABREVIATIONS ET DES SIGLES..... | 10 |
| DEDICACE..... | 15 |
| REMERCIEMENTS..... | 16 |
| INTRODUCTION | 17 |
| PHYSIOLOGIE DU CŒUR | 17 |
| LE PARCOURS DU CŒUR DES MAMMIFERES A TRAVERS LES PHASES EMBRYONNAIRE, NEONATALE ET ADULTE REVELE DES CHANGEMENTS INTERESSANTS AU NIVEAU CELLULAIRE | 20 |
| L'INFARCTUS DU MYOCARDE ENTRAINE LA NECROSE DES CARDIOMYOCYTES ET DECLENCHE UNE REPONSE INFLAMMATOIRE | 22 |
| LA NECROSE ET L'APOTOSE DES CARDIOMYOCYTES A LA SUITE D'UN INFARCTUS DU MYOCARDE DECLENCHENT UNE REPONSE INFLAMMATOIRE ROBUSTE | 26 |
| L'INFLUENCE ADAPTATIVE ET NON ADAPTATIVE DE L'INFLAMMATION SUR LA REPONSE REGENERATIVE CARDIAQUE. | 27 |
| LES CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES FONT UNE SOURCE ESSENTIELLE DE CYTOKINES INFLAMMATOIRES | 30 |
| CCL2 / MCP-1 - CHEMOKINE (CC-MOTIF) LIGAND 2 / MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1 | 32 |
| CCL3 / MIP-1A - CHEMOKINE (CC-MOTIF) LIGAND 2 / MACROPHAGE INFLAMMATORY PROTEIN 1 ALPHA..... | 34 |
| CCL12 - CHEMOKINE (CC-MOTIF) LIGAND 12..... | 35 |
| CCL22 - CHEMOKINE (CC-MOTIF) LIGAND 22..... | 35 |
| TNF-A - TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA..... | 35 |
| IL-1 – INTERLEUKIN 1..... | 36 |
| IL-6 – INTERLEUKIN 6..... | 38 |
| REG3-β – REGENERATING ISLET-DERIVED PROTEIN 3 BETA..... | 38 |
| LA REPONSE INFLAMMATOIRE EST CRUCIALE LORS D'UN INFARCTUS DU MYOCARDE | 39 |
| LA LIBERATION DES CYTOKINE ANTI-INFLAMMATOIRES CONSTITUE UN MECANISME ESSENTIEL POUR UNE REPONSE INFLAMMATOIRE BALANCEE ET UNE STABILITE CICATRICIELLE..... | 41 |
| LA FAMILLE DES P38 MAPK..... | 42 |
| P38α/β MAPK (P38 MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE) INHIBE LA RENTREE DANS LE CYCLE CELLULAIRE ET INDUIT UNE REPONSE INFLAMMATOIRE | 45 |
| LA VOIE DE SIGNALISATION HIPPO: UNE CIBLE POTENTIELLE DE LA P38α/β MAPK | 46 |
| L'ACTIVATION DE LA P38α/β MAPK INDUIT UNE REPONSE INFLAMMATOIRE ROBUSTE | 47 |
| L'INHIBITION DE LA P38α/β MAPK ABOUTIT A L'EXPRESSION DE NOVO DE LA PROTEINE FILAMENTEUSE NESTINE..... | 49 |
| LES POPULATIONS CELLULAIRES NESTINE ⁽⁺⁾ SONT IMPLIQUEES DANS LE REMODELAGE CARDIAQUE | 50 |
| EFFET BIOLOGIQUE DE L'EXPRESSION DE NESTINE | 51 |
| HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE L'ETUDE..... | 55 |
| HYPOTHESE | 56 |
| OBJECTIFS | 56 |
| MATERIELS ET METHODES | 58 |
| RECUPERATION DES CARDIOMYOCYTES ET DES FIBROBLASTES VENTRICULAIRES DES RATS NOUVEAU-NES | 58 |
| CULTURE CELLULAIRE DES CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES | 59 |
| TRAITEMENT DES CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES..... | 60 |
| ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES PAR QPCR | 61 |
| EXTRACTION DES PROTEINES ET ELECTROPHORESE DE TYPE WESTERN | 64 |

| | |
|--|-----------|
| IMMUNOFLUORESCENCE | 66 |
| STATISTIQUES..... | 68 |
| RESULTATS | 69 |
| PKC INDUIT UNE REPOSE HYPERTROPHIQUE AU NIVEAU DES CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES DE RATS NOUVEAU-NES..... | 70 |
| L'ACTIVATION DE PKC EN INHIBANT LA P38 MAPK STIMULE L'EXPRESSION DE NOVO NESTINE ET LA RENTRÉE DANS LE CYCLE CELLULAIRE DES CVRNS | 71 |
| PDBU RECRUTE LES ISOFORMES CONVENTIONNELLES ET NOUVELLES DE PKC DANS LES CVRNS ET PKC- α JOUE UN ROLE DANS L'EXPRESSION DE NOVO DE NESTINE..... | 75 |
| L'ACTIVATION DE PKC- α INDUIT L'HYPERTROPHIE ET LA RENTREE DANS LE CYCLE CELLULAIRE DES CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES DE RATS NOUVEAU-NES NESTINE ^(*) | 79 |
| EN CAS D'INHIBITION DE P38 MAPK, PKC- α INDUIT L'EXPRESSION DE NOVO DE NESTINE ET LA RÉENTRÉE DANS LE CYCLE CELLULAIRE DES CVRNS | 80 |
| PKC- α INDUIT, EN PRESENCE D'INHIBITION DE P38 MAPK, UNE DIMINUTION DE L'EXPRESSION DES ARNM DES GENES REPRESSEURS DU CYCLE CELLULAIRE ET UNE AUGMENTATION DE L'EXPRESSION DES ARNM DES GENES ACTIVATEURS DU CYCLE CELLULAIRE DANS LES CVRNS..... | 82 |
| L'ACTIVATION DE PKC ET L'INHIBITION DE LA P38 α/β MAPK DANS LES CVRNS INDUIT L'AUGMENTATION DE L'EXPRESSION D'ARNM DES CYTOKINES INFLAMMATOIRES | 85 |
| DISCUSSION | 88 |
| CONCLUSION, LIMITATIONS DE L'ETUDE ET FUTURES PERSPECTIVES..... | 98 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| TABLEAU 1: TABLEAU QUI RESUME LA COMBINAISON DES TRAITEMENTS POUR LES CARDIOMYOCYTES ET LES FIBROBLASTES DE CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES DE RATS NOUVEAU-NES..... | 61 |
| TABLEAU 2: TABLEAU QUI RESUME LES DIFFERENTS GENES TAQMAN UTILISES DANS LES REACTIONS DE QPCR AVEC LE NOM ET LE NUMERO D'IDENTIFICATION CORRESPONDANTS | 63 |
| TABLEAU 3: TABLEAU QUI RESUME LES ANTICORPS PRIMAIRES UTILISES DANS LE WESTERN BLOT, AVEC LA DILUTION CORRESPONDANTE ET LA SOURCE..... | 65 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| FIGURE 1: UNE PARTIE D'UNE SECTION LONGITUDINALE DU CŒUR QUI MONTRE LES DIFFERENTES TUNIQUES..... | 17 |
| FIGURE 2: SCHEMA REPRESENTANT LA STRUCTURE DU CŒUR HUMAIN..... | 18 |
| FIGURE 3: SCHEMA REPRESENTANT LA CIRCULATION SANGUINE DOUBLE, PULMONAIRE ET SYSTEMIQUE | 19 |
| FIGURE 4: : SCHEMA DU PHENOTYPE DES CARDIOMYOCYTES DURANT LE DEVELOPPEMENT..... | 20 |
| FIGURE 5: UN CŒUR ISCHEMIQUE EN SCHEMA ILLUSTRANT, DANS L'AGRANDISSEMENT DU RECTANGLE NOIR, LE BLOCAGE DE L'ARTERE CORONAIRE PAR DES PLAQUES D'ATHEROSCLEROSE | 23 |
| FIGURE 6: SCHEMA MONTRANT LA VARIATION DE LA FRACTION D'EJECTION CARDIAQUE EN FONCTION DE LA TAILLE DE L'INFARCTUS | 25 |
| FIGURE 7: LES MACROPHAGES FAVORISENT LA REGENERATION CARDIAQUE CHEZ LES RATS NOUVEAUX AGES DE 1 JOUR (P1) ALORS QU'ILS FAVORISENT LA CICATRICE CHEZ LES RATS ADULTES ²⁸ | 28 |
| FIGURE 8: LES CYTOKINES INFLAMMATOIRES BLOQUENT LA REGENERATION CARDIAQUE | 29 |
| FIGURE 9: VOIE DE SIGNALISATION DE LA DIFFERENTIATION DES MYOFIBROBLASTES ³⁴ | 30 |
| FIGURE 10: REPRESENTATION DE LA LIBERATION DES CYTOKINES INFLAMMATOIRES PAR LES CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES ET LA POSSIBILITE D'EXECUTION D'UN MECANISME AUTOCRINE POUR ARRETER LE CYCLE CELLULAIRE | 32 |
| FIGURE 11: VOIE DE SIGNALISATION ABOUTISSANT A LA TRANSCRIPTION DU GENE MCP-1 ⁴¹ | 33 |
| FIGURE 12: SCHEMA QUI RESUME LES EFFETS D'IL-1 ET TNF- α A DIFFERENTS NIVEAUX ⁵⁷ | 37 |

| | |
|---|----|
| FIGURE 13: SCHEMA QUI RESUME LA STIMULATION DE LA DIFFERENTIATION DES FIBROBLASTES EN MYOFIBROBLASTES. | 40 |
| FIGURE 14: SCHEMA REPRESENTATIF DE LA VOIE D'ACTIVATION DE P38 α/β MAPK..... | 42 |
| FIGURE 15: P38 CONTROLE LA TRANSITION DE LA PHASE G1 VERS LA PHASE S ET DE LA PHASE G2 VERS LA PHASE M DU CYCLE CELLULAIRE ⁷⁴ | 43 |
| FIGURE 16: LE STRESS ACTIVE LA P38 ET INDUIT L' APOPTOSE, LA PROLIFERATION ET LA DIFFERENTIATION CELLULAIRE ⁷⁴ | 44 |
| FIGURE 17: REPRESENTATION SCHEMATIQUE QUI RESUME LA PHOSPHORYLATION DE YAP-1 DE LA VOIE HIPPO..... | 47 |
| FIGURE 18: SCHEMA QUI RESUME LA VOIE DE SIGNALISATION CIBLEE PAR NOTRE ETUDE ET QUI MONTRE LE ROLE DE LA P38 MAPK DANS L'INFLAMMATION ET LA PROLIFERATION CELLULAIRE | 48 |
| FIGURE 19: 2 TYPES DE FIBROSE : REPARATRICE ET REACTIVE ⁹² | 51 |
| FIGURE 20: ANALYSE DE LA SUPERFICIE CELLULAIRE (EN μM^2) DES CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES DES RATS NOUVEAU-NES AGES D'UN JOUR MARQUE PAR L'IMMUNOREACTIVITE A LA TROPONINE T..... | 70 |
| FIGURE 21: LES FIGURES OBTENUES PAR IMAGERIE CONFOCALE DE L'EXPERIENCE D'IMMUNOFLUORESCENCE SUR LES CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES DE RATS NOUVEAU-NES AGES DE 1 JOURS ET CO-TRAITEES PAR PDBU ET SB203580 POUR 3 JOURS CONSECUTIFS..... | 72 |
| FIGURE 22: GRAPHIQUES QUI MONTRENT L'INTERCALATION DE LA BRD \bar{U} ET DE LA PHH3 DANS UN TOTAL DE 500 CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES DE RATS NOUVEAU-NES MARQUEES A LA TROPONINE T ET TRAITEES PENDANT 3 JOURS CONSECUTIFS | 73 |
| FIGURE 23: EXPRESSION PROTEIQUE DE NESTINE ET DES ISOFORMES DE PKC DANS LES CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES DE RATS NOUVEAU-NES AGES DE 1 JOUR ET TRAITEES PENDANT 3 JOURS CONSECUTIFS : UNE ANALYSE SEMI-QUANTITATIVE PAR WESTERN BLOT... .. | 75 |

| | |
|--|----|
| FIGURE 24: ANALYSE QUANTITATIVE DES RESULTATS DU WESTERN-BLOT PRECEDENT (FIGURE 23) | 76 |
| FIGURE 25: GRAPHIQUE QUI MONTRE LA SURFACE DES CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES DE RATS NOUVEAU-NES AGES DE 1 JOUR ET TRAITES POUR 3 JOURS CONSECUTIFS | 79 |
| FIGURE 26: ANALYSE QUANTITATIVE DES RESULTATS D'IMMUNOFLUORESCENCE MONTRANT L'INTERCALATION DE BRDU ET L'EXPRESSION DE NESTINE DANS LES CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES DE RATS NOUVEAU-NES TRAITES POUR 3 JOURS CONSECUTIFS ET MARQUES A LA TROPONINE-T | 80 |
| FIGURE 27: ANALYSE QUANTITATIVE DE L'EXPRESSION GENETIQUE (ARNM) DE NESTINE, CDKN2A, RUNX1, ECT2 ET BUB1, GENES IMPLIQUES DANS LA RENTREE DANS LE CYCLE CELLULAIRE, PAR RAPPORT A LA MOYENNE GEOMETRIQUE DES GENES DE REFERENCE GAPDH ET HPRT1 | 82 |
| FIGURE 28: EXPRESSION DE L'ARNM NORMALISEE PAR RAPPORT A LA MOYENNE GEOMETRIQUE DE HPRT1 ET GAPDH DE QUELQUES CYTOKINES INFLAMMATOIRES DANS LES CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES DE RATS NOUVEAU-NES SOUMIS A DIFFERENTS TRAITEMENTS POUR 3 JOURS CONSECUTIFS | 85 |
| FIGURE 29: FIGURE QUI MONTRE LES BANDES DE REG3- β ET PKC- α OBTENUES PAR WESTERN BLOT PAR RAPPORT AU GENE DE REFERENCE GAPDH..... | 86 |
| FIGURE 30: SCHEMA QUI RESUME LES VOIES DE SIGNALISATION QUI INDUISENT LA RENTREE DANS LE CYCLE CELLULAIRE DE DEUX POPULATIONS DISTINCTES DE CARDIOMYOCYTES..... | 99 |

Listes des abréviations et des sigles

| | |
|---------|---|
| ADN: | Acide désoxyribonucléique |
| ACE: | enzyme de conversion de l'angiotensine |
| ADNc: | Acide désoxyribonucléique complémentaire |
| AINSs : | Anti-inflammatoires non-stéroïdiens |
| AngII: | Angiotensin 2 |
| ANOVA: | Analysis of variance |
| Apaf-1: | facteur activateur apoptotique 1 |
| ARN: | Acide ribonucléique messenger |
| ATF2 : | Activating Transcription Factor 2 |
| ATF2: | Activating transcription factor-2 |
| B: | Basal |
| BrdU: | Bromodeoxyuridine |
| Bub1: | budding uninhibited by benzimidazoles 1 |
| °C : | Degrés Celsius |
| CAMKII: | Calcium/calmodulin-dependent kinase II |
| CCL12: | C-C motif chemokine ligand 12 |
| CCL2: | C-C motif chemokine ligand 2 |
| CCL22: | C-C motif chemokine ligand 22 |
| CCL3: | C-C motif chemokine ligand 3 |
| CCL7: | C-C motif chemokine ligand 7 |
| CCR2: | C-C motif receptor 2 |
| CCR4: | C-C motif receptor 4 |
| Cdc25 | cyclin-dependent kinases 25 |
| Cdc25: | Cell division cycle 25 |
| CDC25B: | cyclin-dependent kinases 25 B |
| CDK1: | cyclin dependant kinase 1 |
| CDKN2a: | cyclin-dependent kinase inhibitor 2A |
| CHOP: | C homologous protein |
| CO2: | Dioxyde de carbone |
| CT: | cycle threshold |
| CVRN: | Cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés |
| CVRN: | Cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés |
| DAG: | diacylglycerol |
| DCT: | Delta cycle threshold |
| DMEM: | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DNase: | Désoxyribonucléase |
| E2F: | transcription factor |
| ECL: | Enhanced chemiluminescence |

| | |
|------------------|--|
| ECM : | extracellular matrix |
| ECT2: | epithelial cell transforming sequence 2 |
| ERK ½: | Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 |
| FBS: | Fœtal bovine serum |
| FGF | fibroblast growth factor |
| G1: | Gap 1 phase |
| G2: | Gap 2 phase |
| GAPDH: | Glycéraldéhyde 3-phosphate dehydrogenase |
| GEOMEAN: | Geometric mean (moyenne géométrique) |
| GF109203X: | Bisindolylmaleimide I |
| GFX: | GF109203X |
| Gp130: | Glycoprotein 130 |
| GS | Glutamine Synthetase |
| GS: | Glutamine synthétase |
| h: | Heure |
| H2O2: | peroxyde d'hydrogène |
| HBSS: | Hanks' balanced salt solution |
| HF: | Heart failure |
| HPRT1: | Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 |
| HRP: | horse radish peroxidase |
| IL-10: | Interleukin 10 |
| IL-18: | Interleukin 18 |
| IL-4: | Interleukin 4 |
| IL-6: | Interleukin 6 |
| IL-6R | recepteur d'IL-6 |
| IL-a: | Interleukin alpha |
| IL-b: | Interleukin beta |
| ITS: | Insulin-transferrin-sodium selenite |
| JAK/STAT: | Janus kinase/ facteur de transcription activé par les stimulateurs de la transcription |
| JNK/SAPK : | kinase c-Jun N-terminal / kinase activée par le stress |
| K: | Potassium |
| KDa: | Kilo dalton |
| LSD: | Least Significant Difference |
| M : | Molaire |
| M (G1,S,G2,M): | Mitose |
| m ² : | Mètre carré |
| MAPK: | mitogen-activated protein kinases |
| MAPK11: | Mitogen activated protein kinase 11 |
| MAPK12: | Mitogen activated protein kinase 12 |
| MAPK13: | Mitogen activated protein kinase 13 |

| | |
|-------------------|--|
| MAPK14: | Mitogen activated protein kinase 14 |
| MAPKAP-2: | MAPK-activated protein kinase 2 |
| MAPKK: | Mitogen activated protein kinase kinase |
| MAPKKK: | Mitogen activated protein kinase kinase kinase |
| MCP-1: | Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) |
| MEF2C | Myocyte Enhancer Factor 2C |
| mg: | Microgrammes |
| MI: | Myocardial infarction |
| Min: | Minutes |
| MK2 | mitogen activated protein 2 |
| MKK: | Mitogen activated protein kinase kinase |
| MKKK: | Mitogen activated protein kinase kinase kinase |
| ml: | Microlitre |
| mm: | Micromètre |
| mM: | Micro molaire |
| mm ² : | Micromètre carré |
| mm2: | Milli mètre carré |
| MST-1: | mammalian Sterile20-like 1 |
| NES: | Nestine |
| NF-κB: | Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells |
| ng: | Nano grammes |
| NGS: | Normal Goat Serum |
| nm: | Nanomètre |
| NNVM: | Neonatal ventricular cardiomyocytes |
| NPPA: | Atrial natriuretic peptide (ANP) |
| OSM: | Oncostatin-M |
| P/S: | Pénicilline streptomycine |
| P<0.05 : | P-value inférieure a 0.05 |
| P12 : | plaque 12 puits |
| P19: | Mouse embryonic carcinoma cells line |
| P38d: | P 38 delta |
| P38g: | P38 gamma |
| p50 | sous-unité protéique du complexe NF-κB. |
| P6: | plaque 6 puits |
| p65 | sous-unité protéique du complexe NF-κB |
| PBS: | Phosphate-buffered saline |
| PBS-T: | Phosphate-buffered saline - Tween |
| PCR: | Polymerase chaine reaction |
| PDBu: | Phorbol 12,13-dibutyrate |
| PDGF | platelet derived growth factor |

| | |
|----------|--|
| PDL: | Poly-D-lysine |
| PHH3: | Phosphohistone H3 |
| PI-3k | phosphoinositide 3-kinase |
| PKC-a: | Protein kinase C - alpha |
| PKC-e: | Protein kinase C - epsilon |
| PMA: | phorbol myristate acetate |
| QPCR: | Quantitative real time polymerase chain reaction |
| RAGE: | Récepteur pour les produits avancés de glycation |
| Rb: | retinoblastoma |
| Reg3b | Regenerating islet-derived protein 3 beta |
| ROS: | Reactive oxygen species |
| Rpm: | Round per minute (tour par minute) |
| RT: | Reverse transcription |
| Runx1: | Runt-related transcription factor 1 |
| S: | Synthesis phase |
| SAV: | Protein salvador homolog 1 |
| SB : | SB203580 |
| SDS: | Sodium dodecyl sulfate |
| Ser: | Serine |
| Ser127: | Serine 127 |
| shRNA: | short hairpin RNA |
| SOD2 | superoxide dismutase 2 |
| STAT3: | Signal transducer and activator of transcription 3 |
| STAT3: | Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells |
| T75: | Flacon de 75 cm ² de surface |
| Taz: | transcriptional co-activator with PDZ binding motif |
| TEAD: | domaine TEA |
| TGF-b: | Transforming growth factor beta |
| Thr: | Thréonine |
| Thr-180: | Threonine - 180 |
| TIMPs: | tissue inhibitors of metalloproteinase |
| TLR: | toll like receptor |
| TNF-a: | Tumour Necrosis Factor alpha |
| TNFR1: | tumor necrosis factor receptor 1 |
| TNFR2: | Vascular endothelial growth factor |
| Treg: | T régulatrices |
| Treg: | Cellules T regulatrices |
| Trop-T : | Cardiaque Troponine-T |
| Tyr-182: | Tyrosine - 182 |
| UNG: | Uracil-DNA Glycosylase |
| VEGF: | Vascular endothelial growth factor |

YAP: Yes-associated protein
YAP-1: Yes-associated protein - 1

Dédicace

Ce mémoire est dédié à ma mère **Rima Tabsh** et mon mari **Mohamad Nour Dassoum**

Merci pour votre soutien tout au long du chemin !

Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements à mon directeur de recherche, Dr. Angelino Calderone, pour tout son support pédagogique, encadrement, orientation et d'avoir partagé ses connaissances et expériences avec moi, ce qui m'a permis de travailler dans une ambiance tranquille et encourageante. Merci pour m'avoir donné l'occasion de réaliser ce projet dans son laboratoire à l'institut de cardiologie de Montréal.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Dr. Patrice Naud, qui m'a aidé et m'a expliqué toutes les notions de l'ARN, réverse transcription et qPCR et la façon d'analyser les résultats.

Merci à mon comité de parrainage, formé de Dr. Bruce Allen et Dr. Mathieu Ruiz pour leur support et informations.

Merci à Louis Villeneuve qui a partagé ses connaissances en imagerie confocale et son aide à la réalisation des expériences et l'obtention des belles figures d'immunofluorescence.

Merci à tous les membres du laboratoire du Dr. Angelino Calderone, stagiaires et étudiants, qui ont participé à l'accomplissement de ce travail.

Ensuite je tiens à remercier l'institut de cardiologie de Montréal et mes professeurs à l'Université de Montréal pour leur encadrement.

Un grand Merci aux membres de mon jury, Dr Madhu Anand-Srivastava et Dr Matthieu Ruiz pour leur temps, leur attention et leur évaluation précieuse de mon mémoire. Je suis reconnaissante pour cette opportunité.

Merci à tous les membres de ma famille et mes amis, pour leur support et amour inconditionnels.

Merci à toute personne qui m'a influencé, aidé et supporté pour finaliser ce projet.

Introduction

Le cœur, la clé de voûte de notre existence et le moteur central du corps, est la pompe de vie musculaire qui assure l'alimentation des tous les organes en dioxygène et nutriments essentiels via des pulsations rythmiques automatiques involontaires assurant la circulation systémique ¹. Pour accomplir cette mission et fonctionner correctement, le cœur a besoin d'approvisionnement en dioxygène qui est assuré par la circulation coronaire qui alimente le muscle cardiaque ².

Physiologie du cœur

En passant de l'intérieur à l'extérieur, on voit que le cœur est composé de 3 tuniques ³ (Figure 1). La première, interne, est l'endocarde, surface lisse composée de cellules endothéliales et vaisseaux sanguins qui permettent la circulation sanguine. Cette couche est séparée du myocarde par du tissu conjonctif lâche ³. Ensuite le myocarde, la partie qui nous intéresse pour faire nos études et qui contient des populations distinctes de cardiomyocytes qui jouent un rôle dans l'automaticité et la contractilité. Les cellules de l'automaticité se trouvent dans le nœud sinusal, le nœud auriculo-ventriculaire et les fibres de Purkinje et sont responsables de maintenir le rythme cardiaque alors que les cellules cardiaques des oreillettes et des ventricules sont responsables de la contractilité ⁴. Enfin, la dernière couche est le péricarde, sacoché fibreuse qui enveloppe le cœur ^{3,5}.

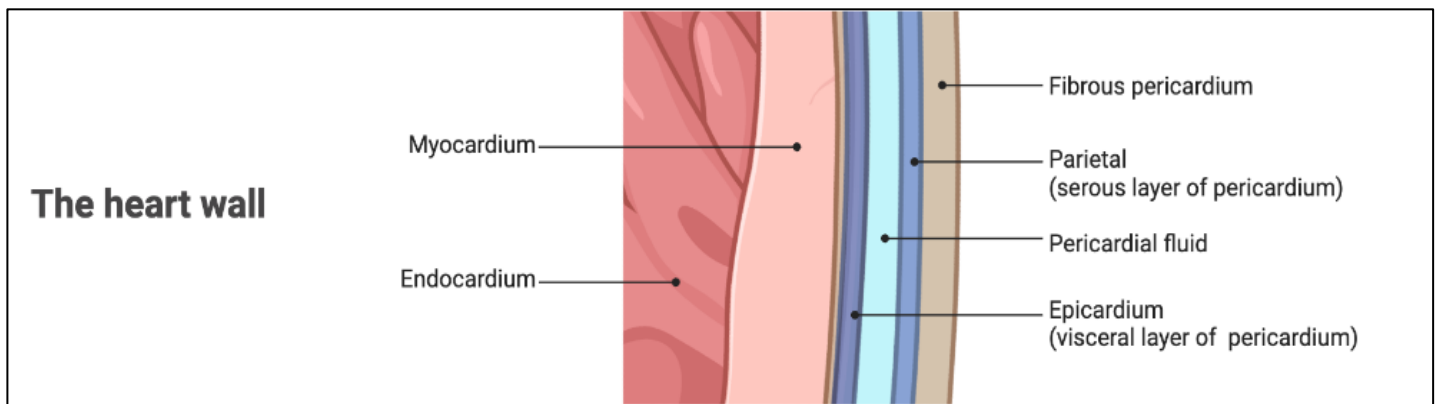


Figure 11: une partie d'une section longitudinale du cœur qui montre les différentes tuniques

Source : <https://microbenotes.com/layers-of-the-heart/>

La figure 1 représente une coupe de la paroi du cœur qui montre les 3 tuniques. On observe de l'intérieur vers l'extérieur : la tunique interne est l'endocarde, qui est suivie par le muscle cardiaque nommé myocarde et enfin le péricarde constitué de 3 couches et contient le liquide péricardique.

Les artères coronaires prennent naissance de l'aorte (Figure 2), entourent le cœur, et sont responsables d'irriguer le myocarde en sang oxygéné pour garantir son propre fonctionnement.

La figure 2 suivante montre les différentes régions du cœur humain adulte. Le cœur est composé de deux oreillettes et de deux ventricules. Ensembles, l'oreillette droite et le ventricule droit forment le cœur droit alors que l'oreillette gauche et le ventricule gauche forment le cœur gauche. La contraction des ventricules aboutit à la projection du sang à travers les artères Aorte et pulmonaires. Les oreillettes droite et gauche sont séparées par le septum inter-auriculaire tandis que les ventricules droit et gauche sont séparés par le septum inter-ventriculaire. Chaque oreillette est liée au ventricule correspondant par une valve. On mentionne la valve tricuspide dans la partie droite et la valve bicuspide ou mitrale dans la partie gauche. Les valvules sigmoïdes relient les ventricules aux artères. Ces valvules permettent au sang de passer dans un sens unidirectionnel à travers les différentes cavités du cœur.

Les veines sont les vaisseaux sanguins responsables du retour du sang vers le cœur. On distingue les veines caves (inférieure et supérieure) et les veines pulmonaires (gauches et droites). La figure 2 suivante résume les différents vaisseaux et compartiments mentionnés dans ce paragraphe.

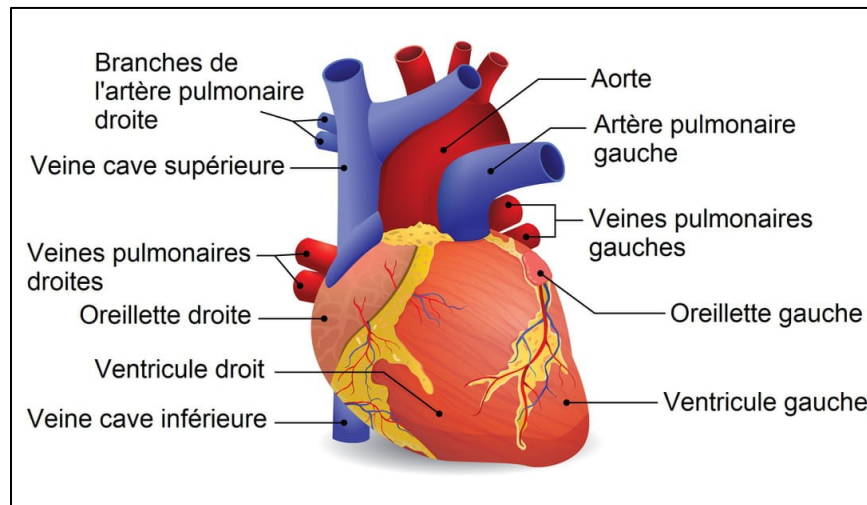


Figure 22: schéma représentant la structure du cœur humain

Source : <https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-anatomie-et-examens/2526844-coeur-anatomie-role-operation-maladies-cardiovasculaires/>

La figure 2 représente premièrement les 4 cavités du cœur : Oreillette gauche, Oreillette droite, Ventricule gauche et Ventricule droit ; deuxièmement, les artères : Aorte et pulmonaires (gauche et droite); troisièmement les veines : Veines caves (supérieure et inférieure), et Veines pulmonaires (gauche et droite).

En effet, le sang riche en dioxygène passe du ventricule gauche vers les organes par l'aorte pour leur fournir le dioxygène et les nutriments essentielles à leur fonctionnement. Le sang sortant des organes sera riche en dioxyde de carbone et va atteindre le cœur par la veine cave. Ceci résume la circulation sanguine systémique.

Le sang riche en dioxyde de carbone passe par l'artère pulmonaire du cœur vers les poumons où il sera expulsé à l'extérieur du corps. Aussi dans les poumons, le sang s'enrichit en dioxygène puis repasse vers le cœur par la veine pulmonaire. Cela résume la circulation sanguine pulmonaire.

Les deux circulations, systémique et pulmonaire, sont représentées dans le schéma annoté qui suit (Figure 3).

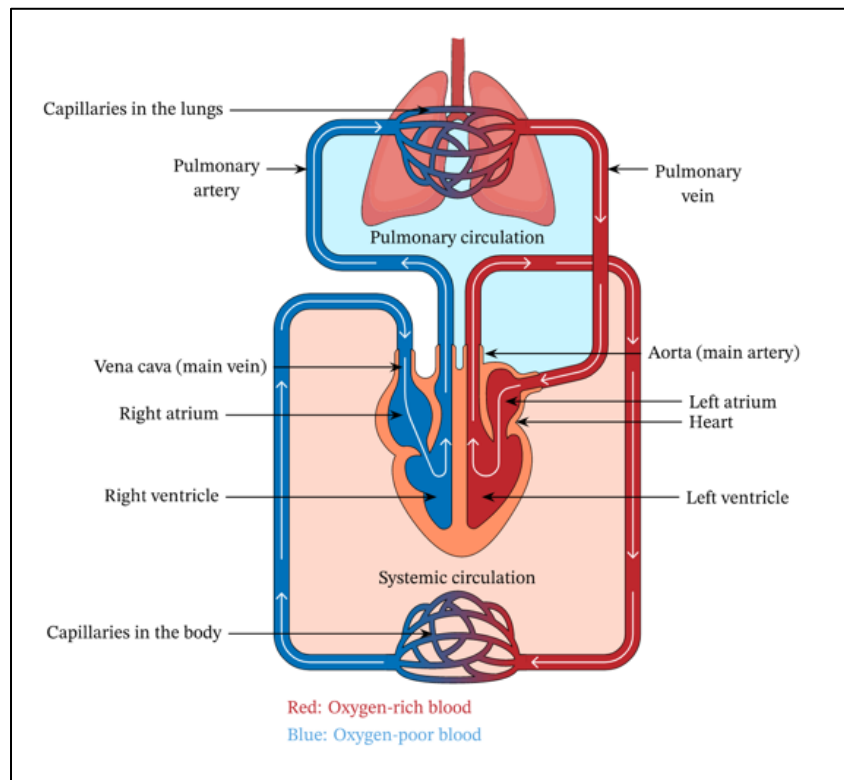


Figure 33: schéma représentant la circulation sanguine double, pulmonaire et systémique

Source : <https://www.nagwa.com/en/explainers/912123271719/>

Légende : en rouge : sang riche en dioxygène, en bleu : sang pauvre en dioxygène

La figure 3 représente les annotations des 4 cavités cardiaques, montre aussi les artères aorte et pulmonaires, ainsi que les capillaires. Elle résume les deux circulations sanguines : pulmonaire et

systemique. Le rouge correspond au sang riche en oxygène alors que le bleu correspond au sang pauvre en oxygène.

Le parcours du cœur des mammifères à travers les phases embryonnaire, néonatale et adulte révèle des changements intéressants au niveau cellulaire

Pour comprendre la raison de l'absence de la régénération cardiaque post-natale, on va comparer les cellules à travers les phases de développement des mammifères.

Le schéma suivant (figure 4) résume le phénotype des cardiomyocytes durant les phases du développement : embryonnaire, néonatale et adulte.

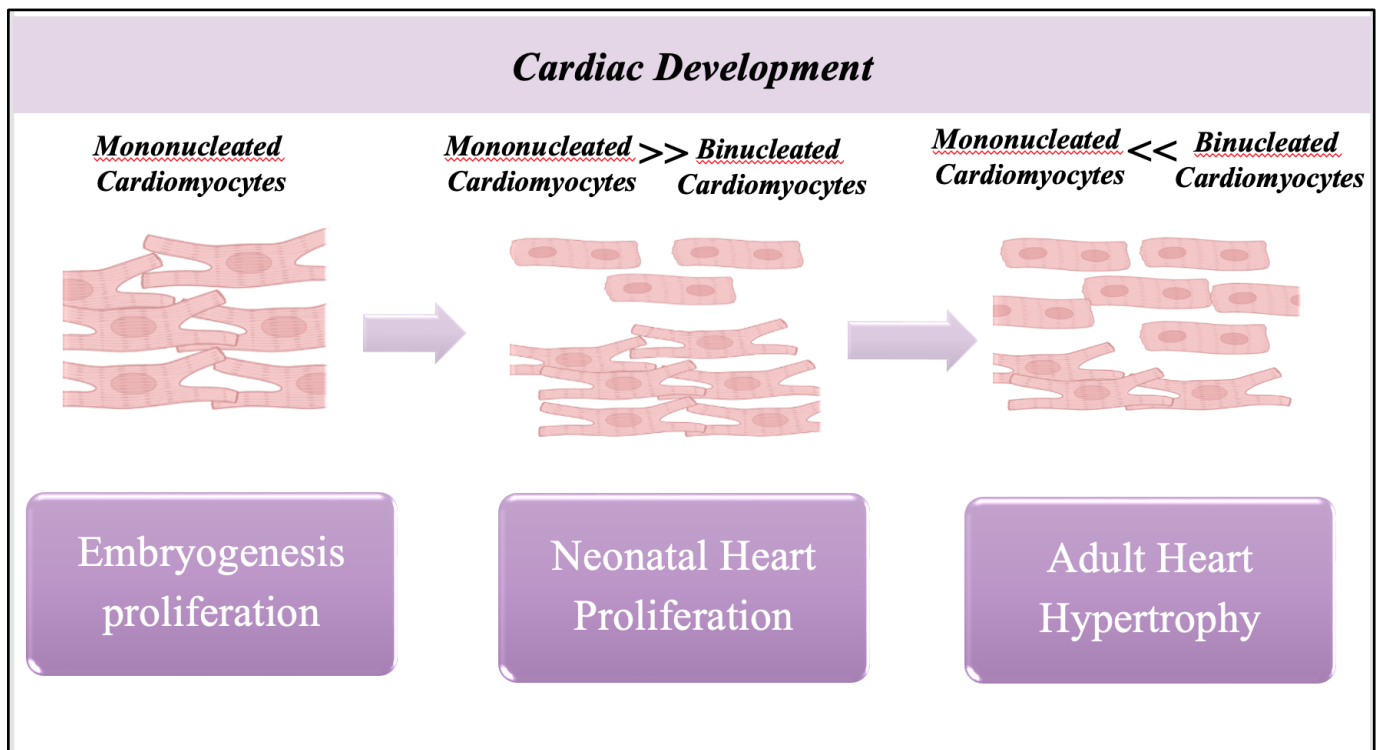


Figure 44: : schéma du phénotype des cardiomyocytes durant le développement

Source : Biorender.com

Légende : > supérieur à ; < inférieur à ; ⇒ passage d'une phase à l'autre

La figure 4 représente le phénotype des cardiomyocytes pendant les différentes phases du développement : dans la phase de l'embryogenèse, tous les cardiomyocytes sont mononucléés et en état de prolifération ; durant la phase néonatale la majorité des cardiomyocytes sont mononucléés avec apparition d'une population mineure de cardiomyocytes binucléés et cette phase est aussi caractérisée par une prolifération ; durant la phase adulte, la majorité des cardiomyocytes sont binucléés avec persistance d'une population mineure de cardiomyocytes mononucléés, et cette phase est caractérisée par l'hypertrophie.

La croissance cardiaque chez les rongeurs durant la phase d'embryogenèse est médiée par la prolifération des cardiomyocytes mononucléés⁶. Durant la phase proliférative d'embryogenèse, les cardiomyocytes sont mononucléés (figure 4) et rentrent dans le cycle cellulaire constitué de 4 phases successives (G1, S, G2 et M) durant lesquelles il y a une duplication du matériel génétique suivie par une division de la cellule mère en deux cellules filles identiques. C'est dû à la capacité des cellules d'entrer dans le cycle cellulaire et de subir une division du noyau (Karyokinèse) suivi par la formation de deux régions cytoplasmiques distinctes (cytokinèse) pendant la Mitose menant à la formation de deux cellules filles identiques. Après la naissance (jour 1 à jour 3) la population prédominante de cardiomyocytes dans le cœur des rongeurs nouveau-nés reste mononucléée (figure 4). Ceci a été confirmé par une étude qui a visé à isoler par une méthode enzymatique les cardiomyocytes de rats nouveau-nés Sprague-Dawley à 1 et 3 jours de naissance. Dans ces 3 premiers jours, la majorité des cardiomyocytes étaient mononucléés, à peu près 4% des cardiomyocytes étaient binucléés ($P < 0.001$)⁷. Alors, le cœur d'un rongeur âgé de 1 à 3 jours (période postnatale), peut se régénérer après une blessure parce que les cardiomyocytes mononucléés peuvent rentrer dans le cycle cellulaire, se diviser et finalement former du nouveau myocarde⁸.

Aussi, une étude publiée en 2016 a montré la capacité du cœur humain d'un nouveau-né à se régénérer à la suite d'un infarctus du myocarde⁹. Le nouveau-né a été diagnostiqué par une occlusion thrombotique de l'artère interventriculaire antérieure gauche proximale pour une durée supérieure à 20 heures qui a induit un infarctus du myocarde et une insuffisance cardiaque ventriculaire gauche aigue. Le patient a subi une intervention chirurgicale de thrombolyse intraveineuse 28 heures après les premiers symptômes pour ouvrir l'artère coronaire. Le rapport final a montré qu'il y a une récupération fonctionnelle cardiaque totale, sans confirmation que cette régénération est encore possible suite à une occlusion permanente de l'artère⁹.

En fait, le développement postnatal a conduit à l'accumulation de cardiomyocyte binucléés et à la perte significative de cardiomyocytes mononucléés¹⁰. Malgré l'absence d'une réponse régénérative dans le cœur des mammifères adultes après un infarctus myocarde, quelques papiers ont démontré la présence d'une population modeste de cardiomyocytes mononucléés mais pour l'instant, il n'y a aucune évidence que cette population résiduelle modeste de cardiomyocytes

mononucléés, dans le cœur des mammifères adultes, rentre dans le cycle cellulaire à la suite d'un dommage ischémique.¹⁰.

Cependant, le cœur du triton adulte contient exclusivement une population de cardiomyocytes mononucléés qui rentre dans le cycle cellulaire après une blessure et provoque une régénération complète du cœur ¹¹. Aussi, les cardiomyocytes du poisson zèbre, gardent la capacité intrinsèque de prolifération des cardiomyocytes mononucléés même à l'âge adulte, ce qui leur permet de régénérer leur cœur à la suite d'une résection ventriculaire ¹².

Le cœur des mammifères adultes s'adapte à la suite d'une ischémie, en absence d'une réponse régénérative, via la formation d'une cicatrice fibrotique, et en parallèle, une réponse hypertrophique définie par une augmentation de la masse des cardiomyocytes binucléés secondaire à la synthèse des sarcomères indépendamment de la division cellulaire. ^{13,14}. La réponse hypertrophique vise à augmenter la fonction cardiaque en compensant la perte de tissu myocardique causée par une insulte ischémique. Ce remodelage cardiaque est nécessaire dans le cas d'un infarctus du myocarde.

L'infarctus du myocarde entraine la nécrose des cardiomyocytes et déclenche une réponse inflammatoire

En 1912, le médecin américain "James Herrick" a suggéré que l'infarctus du myocarde est causé par un thrombus qui bloque les artères nourrissant le cœur ¹. La diminution du diamètre de l'artère coronaire ou son occlusion complète à la suite de la formation de plaque d'athéromes est la principale cause de l'ischémie (Figure 6), et si celle-ci demeure pour plus que 20 minutes, les cellules seront en nécrose et la fonction cardiaque de pompage sera compromise. A mesure que l'obstruction progresse vers la partie supérieure de l'artère, qui précède la bifurcation, les dommages seront plus graves ¹⁵.

Le schéma suivant (Figure 5) présente un cœur ischémique de mammifère adulte :

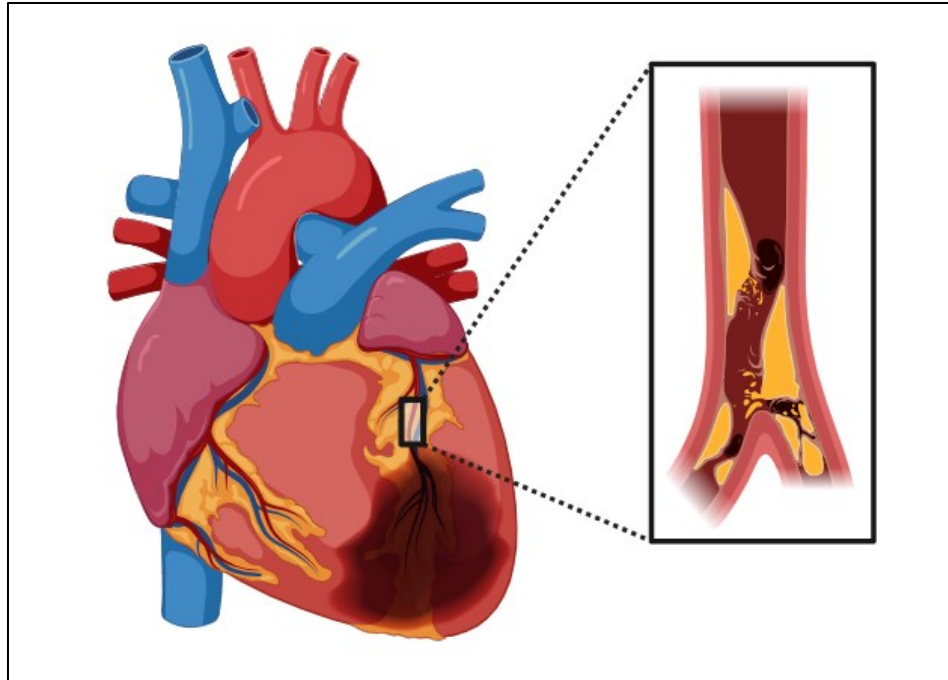


Figure 55: Un cœur ischémique en schéma illustrant, dans l'agrandissement du rectangle noir, le blocage de l'artère coronaire par des plaques d'athérome

Source : Biorender.com

Cette figure représente le cœur humain avec un accent particulier sur l'artère coronaire bloquée par les plaques d'athéromes. Ces plaques sont majoritairement formées de graisses et de cholestérol. Ils obstruent le passage du sang qui irrigue le muscle cardiaque (le myocarde) ce qui aboutit à une ischémie et peut engendrer un infarctus du myocarde.

Après une ischémie, on est en présence de deux mécanismes distincts, la nécrose et l'apoptose, qui provoquent la mort des cardiomyocytes. Pour mieux expliquer comment l'ischémie entraîne la nécrose des cardiomyocytes, on passe au niveau moléculaire. Puisque le flux sanguin est obstrué, une baisse importante de la phosphorylation oxydative et du métabolisme aérobie parvient ce qui aboutit à la diminution des réserves pour générer de l'ATP. Pour compenser, la glycolyse anaérobie, qui va utiliser le glycogène intracellulaire, prend lieu ce qui induit une accumulation de lactate dans le myocarde. Malheureusement, la glycolyse anaérobie ne peut pas totalement compenser le manque d'ATP, et l'accumulation du lactate rend le milieu acide ce qui inhibe les enzymes participantes à la glycolyse. Les cardiomyocytes dépourvus de réserves énergétiques sont incapables de maintenir leur homéostasie et meurent ¹⁶. De plus, l'altération de la répartition des ions potassium et sodium dans les milieux intra et extracellulaires aboutissent à un gonflement des cardiomyocytes et la rupture de leur membrane ¹⁶. Au niveau mitochondrial, la nécrose se caractérise par l'entrée des ions calcium dans la mitochondrie ce qui provoque l'ouverture du pore

de transition de perméabilité de la mitochondrie entraînant une perte du potentiel de membrane de la mitochondrie, l'arrêt de synthèse d'ATP et le gonflement qui est dû à l'entrée de l'eau¹⁶.

L'apoptose, quant à elle, est un processus de mort programmée des cellules. Elle se déroule à travers deux voies principales : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. La voie intrinsèque également connue sous le nom de la voie mitochondriale de l'apoptose est déclenchée par des facteurs intracellulaires tel que le stress oxydatif et le dommage de l'ADN. Cela induit la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie et par la suite la libération du cytochrome C dans le cytosol. Le cytochrome C libéré dans le cytosol forme avec le facteur activateur apoptotique (Apaf-1) l'apoptosome. Celui-ci active la caspase 9 qui à son tour active d'autres effecteurs qui induisent la mort de la cellule. En revanche, l'apoptose extrinsèque, est déclenchée par des signaux de stress extracellulaires comme le TNF- α qui conduit à l'activation de la caspase 8 qui induit par la suite, l'activation des caspases 3 et 7 ce qui entraîne le clivage de substrats cellulaires essentiels et cause la mort cellulaire¹⁷.

Indépendamment du mécanisme (nécrose vs apoptose), la taille de l'infarctus du myocarde (figure 5), affecte la fraction d'éjection cardiaque. On remarque que la fraction d'éjection cardiaque diminue quand la taille de l'infarctus augmente (Figure 6).

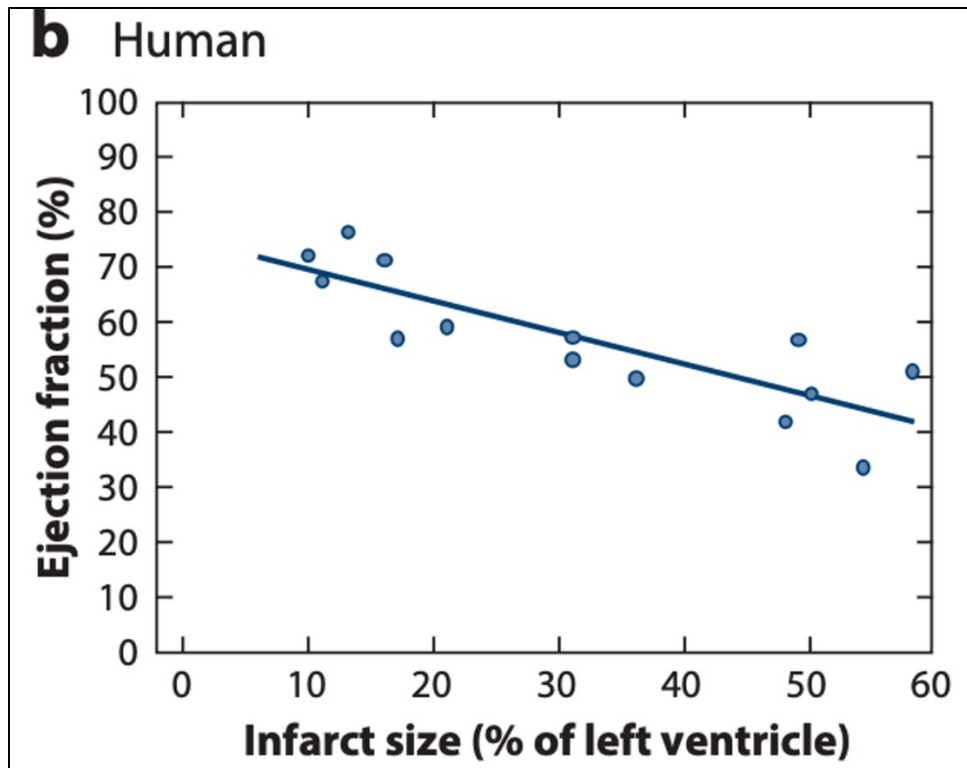


Figure 66: schéma montrant la variation de la fraction d'éjection cardiaque en fonction de la taille de l'infarctus

Source: *cardiac regeneration new hope for an old dream*¹⁸, by Florian Weinberger and Thomas Eschenhagen ;

Données de Burns et al. : Burns RJ, Gibbons RJ, Yi Q, Roberts RS, Miller TD, et al. **2002**. The relationships of left ventricular ejection fraction, end-systolic volume index and infarct size to six-month mortality after hospital discharge following myocardial infarction treated by thrombolysis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 39(1):30-36

Ce graphique (Figure 6) montre la variation de la fraction d'éjection du cœur humain adulte en fonction de la taille de cicatrice du ventricule gauche. La fraction d'injection diminue avec l'augmentation de la taille de l'infarctus du myocarde dans le ventricule gauche humain. Cette corrélation représente la fraction d'éjection chez des patients humains un an après l'infarctus du myocarde et la taille de l'infarctus correspond à celle mesurée lors de leur sortie de l'hôpital.

Actuellement, des médicaments pharmacologiques tels que les inhibiteurs des enzymes de conversion de l'angiotensine (ACE) et les bêta-bloquants sont utilisés pour limiter la réduction de la fraction d'éjection chez les patients ayant subi un infarctus du myocarde¹⁹. Cependant, la seule approche qui pourrait significativement améliorer la fonction cardiaque consiste à induire une réponse régénérative cardiaque et ceci est présentement indisponible. Néanmoins, c'est prometteur de spéculer qu'une réponse cardiaque régénérative potentielle pourrait être induite si la modeste population de cardiomyocytes mononucléés dans le cœur des mammifères adultes pouvait être incitée pharmacologiquement à rentrer dans le cycle cellulaire.

La nécrose et l'apoptose des cardiomyocytes à la suite d'un infarctus du myocarde déclenchent une réponse inflammatoire robuste

La nécrose des cardiomyocytes induit la libération de signaux de danger (exemple : IL-1 α), déclenchant ainsi une réponse inflammatoire intense dont le but est de se débarrasser des débris cellulaires et des cellules mortes²⁰.

Les signaux de danger libérés par les cellules nécrotiques et apoptotiques déclenchent une réponse inflammatoire en activant les voies dépendantes des récepteurs TLR (TLR2, TLR3, TLR4), RAGE et des récepteurs à interleukines. Ces TLRs sont exprimés sur les cardiomyocytes, fibroblastes et cellules endothéliales. La liaison de ces signaux aux TLRs et Ceci active et recrute une cascade de molécules dans une voie de signalisation qui aboutit à l'activation de la MAPKKK puis MAPK ce qui induit la translocation de NF- κ B, p65 et p50 dans le noyau. Ceci permet la transcription des gènes des cytokines inflammatoires et chimiokines comme le CCL2 (MCP-1)²¹.

De plus, l'activation du système du complément induit des réponses pro-inflammatoires. Aussi, la libération des espèces réactives de l'oxygène, active le complément et active le facteur nucléaire (NF)- κ B ce qui induit la transcription des cytokines et chimiokines inflammatoires et ainsi accentue la réponse inflammatoire. Les fibroblastes et les cardiomyocytes qui se trouvent à la frontière de la zone nécrotique aussi forment une source importante de sécrétion de cytokines inflammatoires surtout IL-1 β tandis que, les cellules endothéliales secrètent majoritairement du CCL2¹⁶.

L'expression de CCL2 dans la région nécrotique aboutit au recrutement des monocytes inflammatoires qui s'infiltrent dans le myocarde et se différencient en macrophages résultant en une sécrétion d'un immense mélange de cytokines inflammatoires²². Les macrophages CCR2⁺ produisent des ligands qui contribuent à la migration des leucocytes vers la région ischémique ainsi que la sécrétion de CCL2 favorise le recrutement des monocytes de la moelle osseuse et la rate vers le milieu de l'ischémie. Ces monocytes se différencient en macrophages qui vont produire des cytokines inflammatoires comme le TNF- α qui cause l'hypertrophie des cardiomyocytes, TGF- β qui induit la conversion des fibroblastes en myofibroblastes essentielle pour la formation de la cicatrice et VEGF qui stimule l'angiogenèse²³. L'effet de TNF- α sur les cardiomyocytes a été démontré dans une étude qui vise à isoler les cardiomyocytes de chats adultes et les mettre en culture puis les stimuler avec TNF- α . Pour des concentrations supérieures à 50U/ml similaire à

celles retrouvées in vivo lors d'un stimulus stressant, TNF- α augmente la synthèse générale des protéines par les cardiomyocytes, une diminution de la dégradation des protéines synthétisées et une augmentation de 2.4 fois de la synthèse de la protéine actine et une augmentation de 3.3 fois de la synthèse de la myosine²⁴. En effet, l'inflammation est un processus essentiel pour la guérison, son exacerbation altère la cicatrisation alors que sa gestion favorise le processus de guérison et limite les complications à long terme. La question évidente en ce contexte est : « est-ce que les cellules pro-inflammatoires, monocytes et macrophages sont la seule source de sécrétion de cytokines inflammatoires ? »

L'influence adaptative et non adaptative de l'inflammation sur la réponse régénérative cardiaque.

Une vaste variété de médiateurs inflammatoires, cytokines et chimiokines, sont produites lors d'une ischémie cardiaque par le tissu lésé privé d'oxygène et de nutriments²⁵. Ceci stimule le système immunitaire pour déclencher une réponse rapide.

A la suite d'un infarctus du myocarde, les neutrophiles sont parmi les premiers à s'infiltrer dans la région infarctée et activent les macrophages résidants dans le myocarde pour phagocyter les cellules nécrotiques^{26,22,21} (Figure 7).

Il est important de prendre en considération que, chez les nouveaux nés, la réponse inflammatoire est différente de celle des adultes : les macrophages chez les nouveaux nés proviennent du sac vitellin, et sont le résultat de l'extension d'une sous population dépourvue de CCR2 (C-C chemokine receptor type 2) qui, lors de sa présence, permet le recrutement des monocytes et des macrophages vers le milieu de la lésion en se liant à CCL2 (CC-chemokine ligand 2)²⁷. Les macrophages CCR2⁽⁻⁾ colonisent le cœur humain durant les phases embryogénique et post-natale précoce, durant lesquelles une régénération cardiaque est possible^{28,29}. Ils inhibent le recrutement des monocytes en interrompant la voie de signalisation MCP1-CCR2²⁷. En revanche, les macrophages chez les adultes sont en majorité CCR2⁺ et sont la conséquence de la différenciation des monocytes circulatoires³⁰. Ils favorisent la sécrétion et le recrutement des cytokines inflammatoires ce qui engendre une cicatrice. Dans le cœur des rongeurs adultes, on trouve une modeste population résidente de macrophages CCR2⁻, qui restent de la phase embryonnaire³⁰.

Le fait que la réponse inflammatoire chez les nouveau-nés est distincte de celle chez les adultes pourrait expliquer au moins en partie pourquoi la régénération cardiaque s'observe chez les nouveau-nés mais pas chez les adultes¹². Une étude sur un modèle de résection apicale effectuée sur des souriceaux nouveau-nés de 1 jour a montré une prolifération des cardiomyocytes menant à une régénération cardiaque. Cependant, cette régénération a été absente chez les souriceaux âgés de 7 jours avec apparition de fibrose³¹. Cette absence de régénération peut s'expliquer soit par la nucléation des cellules (mononucléées vs binucléées) ou bien par des réponses inflammatoires différentes selon l'âge des souriceaux. La figure 7 suivante résume les effets des macrophages dans le cœur nouveau-né et adulte à la suite d'une ischémie.

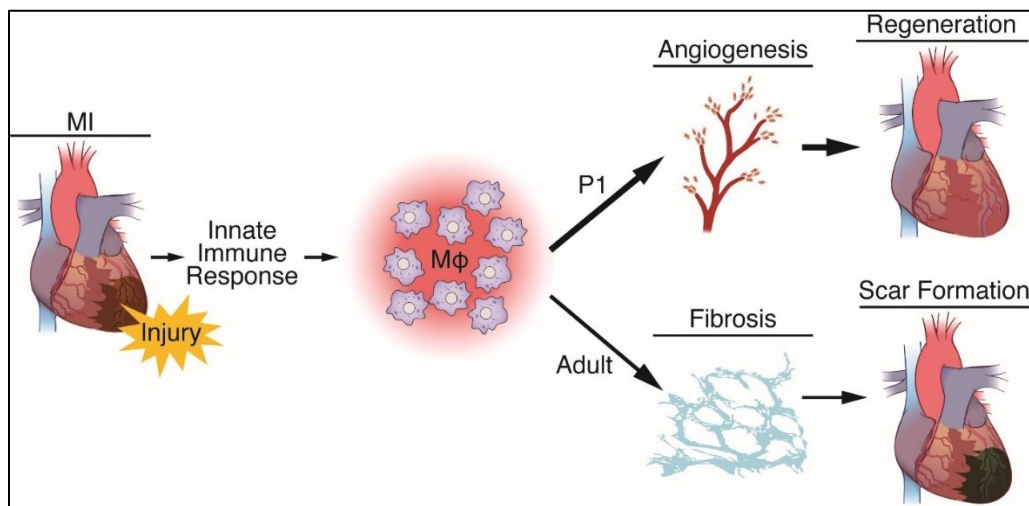


Figure 77: les macrophages favorisent la régénération cardiaque chez les rats nouveau-nés âgés de 1 jour (P1) alors qu'ils favorisent la cicatrice chez les rats adultes²⁸

Source: Macrophages are required for neonatal heart regeneration. J Clin Invest. 2014

Légende: → engendre, MI : Myocardial infarctus (Infarctus du myocarde), P1 : rat âgé de 1 jour

Une lésion au niveau du myocarde induit une réponse immunitaire robuste qui se caractérise par le recrutement des macrophages vers le lieu de l'ischémie. Chez un rat nouveau-né âgé de 1 jour (P1), la réponse inflammatoire produite à la suite d'une lésion au niveau du myocarde aboutit à une angiogenèse suivie par une régénération cardiaque. Par contre, chez un rat adulte, la réponse inflammatoire produite à la suite d'une lésion au niveau du myocarde aboutit à une fibrose suivie par une formation de cicatrice.

L'infarctus du myocarde active les voies adrénérgiques ce qui inhibe les répresseurs des cellules souches hématopoïétiques et par conséquent, stimule la production de monocytes par la moelle osseuse. Les espèces réactives d'oxygène et le MCP-1 recrutent ces monocytes vers le milieu de l'infarctus. Une fois dans le myocarde, ces monocytes se différencient en macrophages qui libèrent des cytokines inflammatoires (TNF- α et IL- β), accentuent le stress oxydatif, et phagocytent les cardiomyocytes morts ³². Le recrutement des macrophages et des neutrophiles accentue la libération des cytokines inflammatoires qui peuvent inhiber la réponse régénérative cardiaque (Figure 8).

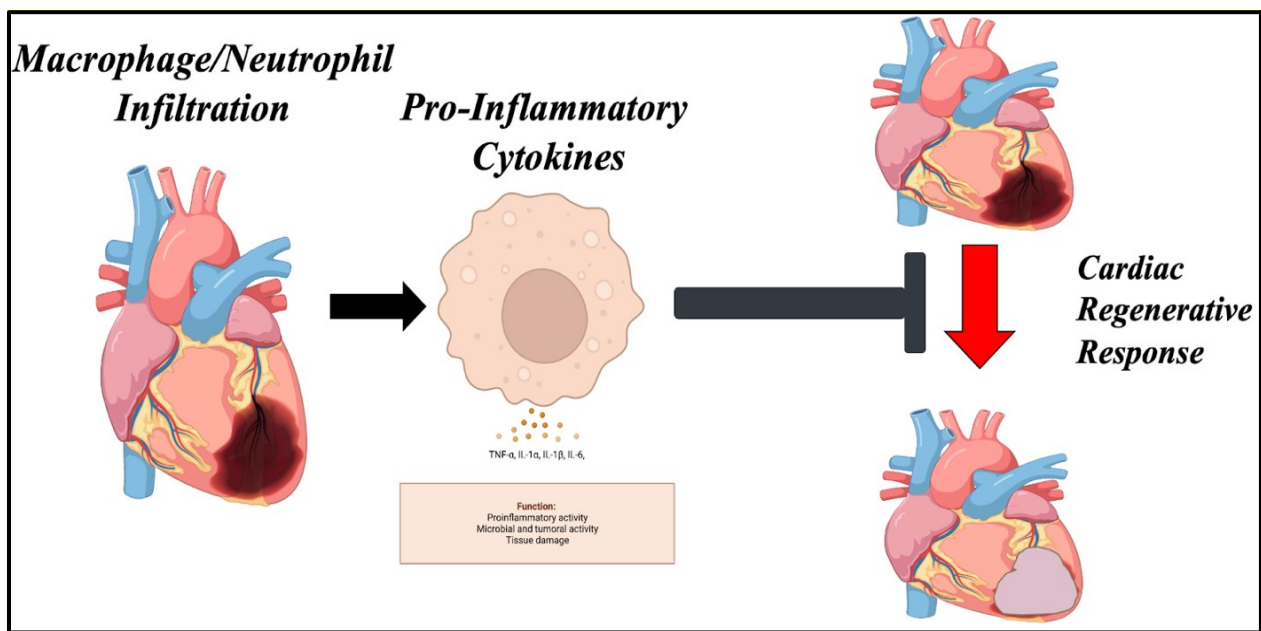


Figure 88: Les cytokines inflammatoires bloquent la régénération cardiaque

Source : Biorender.com

Légende : → Libération ; ⊥ inhibition ; ↓ engendre

Ce schéma représente un cœur de mammifère qui souffre d'un infarctus du myocarde (partie brune dans le ventricule gauche). Ceci engendre une infiltration des macrophages et des neutrophiles au lieu de l'ischémie. Ceci est suivi par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires tels qu'IL-6 et IL-1 α pouvant inhiber la régénération cardiaque.

Les cardiomyocytes ventriculaires sont une source essentielle de cytokines inflammatoires

Lors de leur nécrose à la suite d'un infarctus du myocarde, les cardiomyocytes ventriculaires libèrent des cytokines inflammatoires comme signal d'activation des macrophages et d'autres cellules immunitaires pour initier la réparation³³. Par exemple, TGF- β se lie sur son récepteur sur les fibroblastes cardiaques, augmente la production des ROS qui activent la phosphorylation de la p38 MAPK et ERK1/2 pour initier leur activation en myofibroblaste et induire la fibrose³⁴ selon la figure 9 suivante.

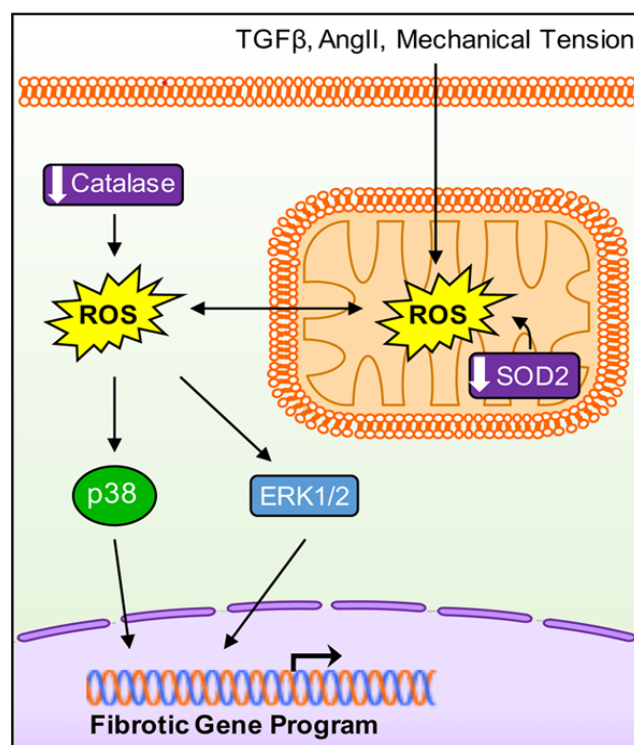


Figure 99: voie de signalisation de la différenciation des myofibroblastes³⁴

Source : Andrew A. Gibb et al ; Myofibroblasts and Fibrosis Mitochondrial and Metabolic Control of Cellular Differentiation ; 2020.

Légende: \rightarrow active ; \downarrow diminue ; \leftrightarrow passage à travers la membrane, ROS : reactive oxygen species, TGF- β : transforming growth factor beta, AngII : Angiotensin 2 ; SOD2: superoxide dismutase 2; ERK 1/2: Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2

Le stress, TGF- β et l'angiotensine II stimulent l'augmentation de la production de ROS dans la mitochondrie. Les ROS sortent dans le cytoplasme et activent la p38 MAPK et ERK1/2 ce qui stimule la transcription des gènes fibrotiques.

Il est important de préciser que la culture cellulaire n'est pas purement formée de cardiomyocytes, elle contient aussi des fibroblastes et des cellules non myocardiques (les macrophages résidents et les cellules vasculaires). Des expérimentations qui visent à quantifier l'ARNm et les protéines IL-1 α , comparent la sécrétion d'IL-1 α par ces différentes cellules. Ils ont montré qu'IL-1 α est fortement sécrété par les cardiomyocytes nécrotiques, non détecté dans les fibroblastes et faiblement détecté dans les cellules non myocardiques. Pour confirmer que cet IL-1 α est celle qui induit la sécrétion de CCL2 et IL-6 par les fibroblastes, l'étude a employé un anticorps anti-IL-1 α . Les résultats montrent une inhibition de la sécrétion de CCL2 et IL-6 par les fibroblastes ³⁵.

Aussi, les cardiomyocytes secrètent d'autres cytokines pro-inflammatoires comme MCP-1 (CCL2), IL-1 β , IL-6 et TNF- α qui induisent l'hypertrophie des cardiomyocytes ³⁶. Par exemple, une étude vise à comparer la libération d'IL-6 par deux cultures cellulaires, une qui contient les cardiomyocytes ventriculaires de rats Wistar nouveau-nés âgés de 1 jour, et l'autre qui contient les cellules non myocardiques séparés par pré-ensemencement des cardiomyocytes. Ces deux populations de cellules cardiaques ont été soumises à deux conditions expérimentales : la première condition est une hypoxie (le mélange gazeux dans les chambres scellées dans lesquelles se trouvent les cellules est formé de 95% N₂-5% CO₂) et La deuxième condition est une normoxie (le mélange gazeux dans les chambres scellées dans lesquelles se trouvent les cellules est formé de 95% air -5% CO₂). Les résultats montrent que, la libération d'IL-6 par les cardiomyocytes en hypoxie est beaucoup plus significative que celle des cardiomyocytes en normoxie. Cependant, les cellules non myocardiques libèrent un niveau semblable d'IL-6 en cas d'hypoxie ou de normoxie. Ceci indique que les cardiomyocytes ventriculaires sont une source de libération d'IL-6 et cette libération augmente en cas d'ischémie ³⁷. Les cardiomyocytes ventriculaires se trouvent alors comme source potentielle de cytokines inflammatoires.

Dans le cadre d'une étude expérimentale menée par Suetomi et al sur les souris, il est démontré que les cardiomyocytes ventriculaires des souris qui ont subi une surcharge de pression, induite par la constriction aortique transversale, ont libéré une variété de cytokines inflammatoires. Ces cytokines, tel que MCP-1, IL18 et IL-6, étaient surtout libérées dans les trois premiers jours ce qui engendre une réponse inflammatoire locale robuste qui va par la suite initier la réponse

inflammatoire générée par les cellules voisines, tels que les cellules endothéliales et les fibroblastes ainsi que les cellules immunitaires résidentes (les macrophages) ^{30,38}.

Des études préliminaires du Labo de Dr Calderone ont déjà montré que l'absence de la réponse régénérative du cœur ischémique est associée à une réponse inflammatoire robuste qui née à la suite de la lésion ¹⁰. On se demande, dans ce contexte, si les cytokines inflammatoires libérées par les cardiomyocytes ventriculaires en ischémie à la suite d'un infarctus du myocarde, induisent, par un mécanisme autocrine quelconque, l'inhibition de la rentrée dans le cycle cellulaire des cardiomyocytes mononucléés ce qui empêche leur prolifération (Figure 10).

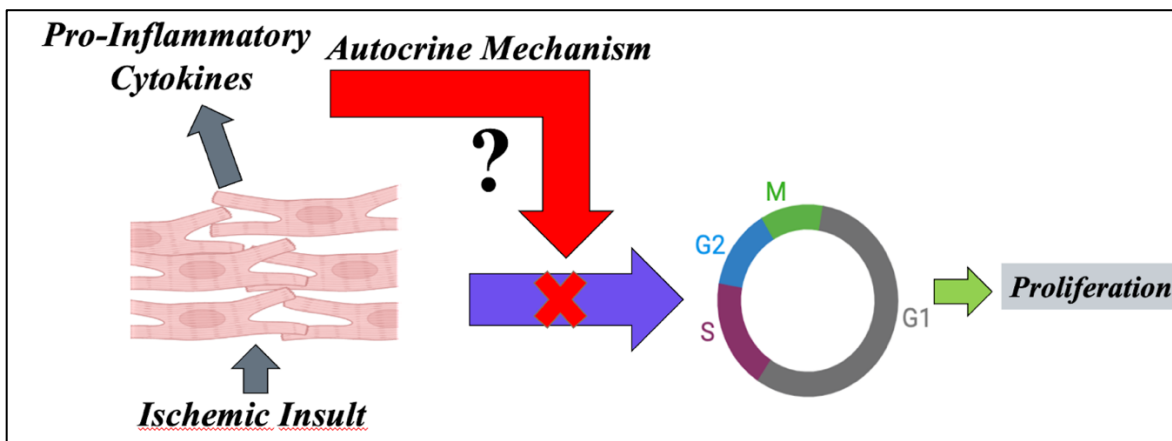


Figure 1010: Représentation de la libération des cytokines inflammatoires par les cardiomyocytes ventriculaires et la possibilité d'exécution d'un mécanisme autocrine pour arrêter le cycle cellulaire

Source : Biorender.com

Légende : → engendre ; ↘ : stimule ; cellules : cardiomyocytes ventriculaires ; flèche avec un x : arrêt ; cercle avec G1 S G2 M : cycle cellulaire

Une ischémie au niveau du myocarde provoque la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires par les cardiomyocytes. Ce qui n'est pas confirmé, c'est si cette réponse, par un effet autocrine, cause l'arrêt du cycle cellulaire des cardiomyocytes ventriculaires et empêche leur prolifération.

Un mélange énorme de cytokines inflammatoires est libéré lors de l'infarctus du myocarde dont on peut citer les suivants :

CCL2 / MCP-1 - Chemokine (CC-motif) ligand 2 / Monocyte chemoattractant protein-1

La chimiokine CCL2 ou encore nommée MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) appartient à la famille des CC Chimiokines, et possède comme récepteur le CCR2 qui est majoritairement exprimé sur les monocytes^{39,40}. Au niveau cardiaque, cette chimiokine est produite par les cellules endothéliales, les monocytes / macrophages et les fibroblastes⁴¹ en réponse aux ROS produites lors d'une réaction inflammatoire et elle contrôle la régulation de la migration et de l'infiltration des monocytes et des macrophages dans le tissu ischémique ainsi qu'elle régule la différenciation des monocytes en macrophages^{42,43}. La figure 11 suivante montre la voie de signalisation qui induit la transcription du gène MCP-1 lors d'une réponse inflammatoire.

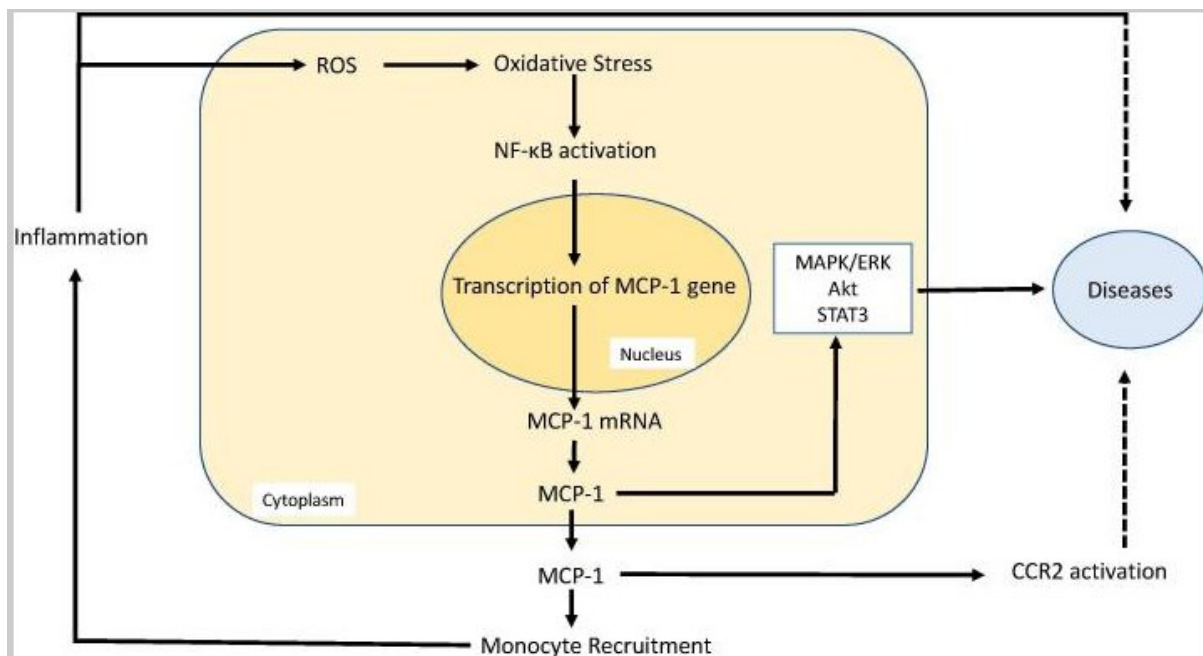


Figure 1111: voie de signalisation aboutissant à la transcription du gène MCP-1⁴¹

Source : Sanjiv Singh et. Al ; MCP-1: Function, Regulation, and Involvement in Disease ;2021

Légende : → : active ; ---> aboutit à ; ROS : reactive oxygen species ; mRNA : messenger RNA ; NF-κB : Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells ; Akt: Protein kinase B; STAT3: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells ; MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1 ; CCR2 : C-C chemokine receptor type 2

La réponse inflammatoire aboutit à une augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS). ROS active NF-κB qui stimule la transcription du gène MCP-1. La protéine MCP-1 induit le recrutement des monocytes.

CCL2 a été démontrée comme cible thérapeutique de l'ischémie du myocarde à la suite d'une étude qui a utilisé des souris mâles dont l'artère coronaire a été ligaturée. L'étude montre que les souris traitées avec un anti-MCP1 avaient une inflammation réduite et un infarctus diminué⁴⁴.

Aussi, le knock-out du gène qui code pour la MCP-1 lors d'une étude d'insuffisance cardiaque induite par une constriction aortique transverse chez des souris, réduit fortement la réponse inflammatoire en baissant le nombre des macrophages dans le milieu ³⁸.

D'autres études ont aussi montré que CCL2 peut être considérée comme cible thérapeutique contre l'infarctus du myocarde et ont employé plusieurs approches expérimentales pour le prouver. Une étude expérimentale faite en 2014 par Al-Amran et al a employé des souris âgées entre 12 et 20 semaines qui ont subi une ischémie myocardique par la ligature de l'artère coronaire descendante antérieure gauche pour 30 minutes, suivie de 3 jours de reperfusion. L'étude a comparé le groupe de souris qui a été injecté par 500 µg de l'anticorps anti-MCP-1 un peu avant la ligature de l'artère coronaire, à un autre groupe non traité. Les résultats ont montré que la surface affectée par la ligature chez les souris traitées par anti-MCP-1 avant la ligature de l'artère était plus petite que celle chez les souris non-traitées. De plus, l'apoptose cellulaire dans le myocarde des souris traitées (11%) est plus faible que celle des souris non traitées (24%). Aussi, l'activation et la déposition du complément C3 est plus faible chez les souris traitées par anti-MCP-1 par comparaison aux souris non traitées ⁴⁴. Ainsi, l'inhibition compétitive de l'expression génique de CCL2 réduit l'infiltration des monocytes dans le milieu de l'ischémie et réduit la fibrose. Aussi, la neutralisation de CCL2 par emploi des anticorps anti-MCP-1 a réduit la taille de l'infarctus et a minimisé l'infiltration des macrophages ³⁸.

CCL3 / MIP-1α - Chemokine (CC-motif) ligand 2 / Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha

Aussi appelée "Macrophage inflammatory protein", cette chimiokine est significativement exprimée dans le lieu de l'ischémie et qui joue un rôle clé dans la régulation de la réponse inflammatoire. Au niveau cardiaque, CCL3 attire différentes cellules immunitaires vers le site de l'ischémie. Cela inclut des cellules telles que les monocytes, les macrophages et les lymphocytes, qui sont essentielles pour la réponse inflammatoire ⁴⁵. Une fois activés, les macrophages peuvent libérer des cytokines pro-inflammatoires, contribuant ainsi à l'amplification de la réponse inflammatoire dans le cœur. Dans le cadre d'un essai clinique portant sur les chimiokines inflammatoires chez des personnes souffrant d'un infarctus du myocarde aigu, le taux de CCL3 dans le plasma chez 22 personnes saines (39.8 pg/ml) est inférieur à celui observé chez 44 patients

atteints d'un infarctus du myocarde aigu (47.7 pg/ml) ⁴⁶. Lors d'un infarctus du myocarde, CCL3 induit la migration des cellules T des organes lymphoïdes (par exemple la rate) vers le milieu de l'ischémie. En effet, CCL3 se lie à son récepteur CCR5⁺ qui se trouve sur les cellules T ⁴⁶.

CCL12 - Chemokine (CC-motif) ligand 12

Aussi connue comme MCP-5 (monocyte chemotactic protein-5), CCL12 est surexprimé et entrave le déclenchement de la réponse réparatrice à la suite d'une ischémie cardiaque. CCL12 prolonge l'inflammation et inhibe la conversion des fibroblastes en myofibroblastes, ce qui aboutit à la formation de cicatrices réduite. La libération de CCL12 par les macrophages induit le recrutement des macrophages qui dérivent des monocytes (circulants) vers le milieu de l'ischémie. De plus, la sécrétion de CCL12 par les macrophages directement altèrent le dépôt de fibronectine et de collagène, tout en stimulant indirectement la dégradation du collagène par le biais d'une augmentation de la métalloprotéinase de matrice-2 ⁴⁷ et affaiblit les bienfaits cardioprotecteurs du post conditionnement ischémique dans le cœur de rats ⁴⁸. En effet CCL12 chez les souris présente une homologie avec CCL2 chez les humains et ces deux chimiokines lient le même récepteur CCR2 ⁴⁹.

CCL22 - Chemokine (CC-motif) ligand 22

Une étude clinique conduite en 2016 a révélé que le niveau d'expression de CCL22 dans le sérum des patients souffrant d'un infarctus du myocarde est significativement plus élevé que celui des sujets sains ⁵⁰.

CCL22 est une cytokine qui joue un rôle vital dans la migration cellulaire et se lie à CCR4 comme seul récepteur qui est exprimé sur les cellules T régulatrices (Treg) ^{51,52,53}. Alors CCL22 favorise le recrutement des cellules T vers le milieu de l'ischémie.

TNF- α - tumor necrosis factor alpha

Le facteur de nécrose tumoral alpha est une cytokine inflammatoire sécrétée par les monocytes et les macrophages en réponse à une inflammation. Il joue un rôle central dans la transmission de

signaux divers à l'intérieur de la cellule pouvant conduire à la mort cellulaire soit par apoptose ou par nécrose ⁵⁴. En se liant à une de ses deux récepteurs TNFR1 et TNFR2, le TNF- α prévient la formation des tumeurs et élimine les agents pathogènes ⁵⁵.

Une étude sur les rats faite par Jude et al., a montré que TNF- α exerce un effet négatif sur l'inotropie cardiaque ainsi qu'elle active PKC- α et PKC- ε ⁵⁶. En effet, TNF- α perturbe l'équilibre du calcium dans les cardiomyocytes, ce qui aboutit à la réduction de la force de battement. Aussi, TNF- α active l'apoptose des cardiomyocytes ⁵⁷. De plus, TNF- α joue un rôle crucial dans le remodelage cardiaque, représenté dans la figure 11, en induisant l'augmentation de l'expression des métalloprotéinases matricielles et des cytokines inflammatoires dans les fibroblastes cardiaques tel qu' IL-1 α , IL-1 β et IL-6 qui est médiée par la p38 α / β MAPK ⁵⁸. De plus, TNF- α induit la dégradation de la matrice extra-cellulaire au niveau des fibroblastes et augmente la perméabilité au niveau des vaisseaux sanguins ⁵⁷

IL-1 – Interleukine 1

Les interleukines 1 induisent aussi le remodelage cardiaque à la suite de leur implication dans l'augmentation de l'expression des métalloprotéinases matricielles ⁵⁹.

La figure 12 ci-dessous, résume les différents phénomènes médiés par TNF- α et IL-1 au niveau des cardiomyocytes, des fibroblastes, de la dégradation de la matrice extra-cellulaire, de la sécrétion des cytokines inflammatoires et de la fonction systolique.

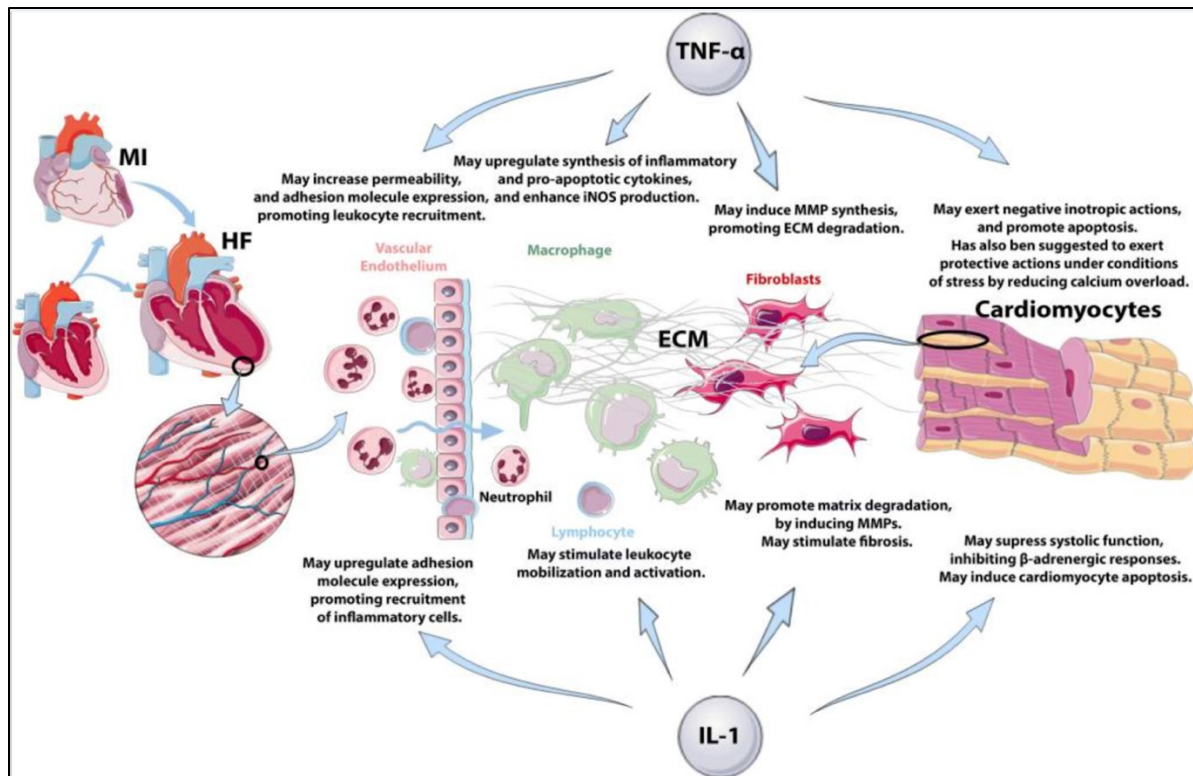


Figure 1212: Schéma qui résume les effets d'IL-1 et TNF-α à différents niveaux ⁵⁷

Source : Hanna et Frangogiannis, 2020

Légende : → engendre, ECM : extra cellulaire matrice, MI : myocardial infarction, HF : heart failure

TNF-α induit le recrutement des leucocytes, augmente la synthèse des cytokines inflammatoires, induit la synthèse des métalloprotéinases et la dégradation de la matrice extra-cellulaire et peut causer un effet inotrope négative. IL-1 induit le recrutement des cellules inflammatoires, active et mobilise les leucocytes, stimule la fibrose et induit la dégradation de la matrice extra-cellulaire et induit l'apoptose des cardiomyocytes.

TNF-α et IL-1 sont des cytokine pléiotropes qui modulent le phénotype et la fonction des cardiomyocytes, des cellules immunitaires, des fibroblastes et des cellules vasculaires. Ces deux cytokines induisent l'apoptose des cardiomyocytes ce qui réduit la fonction cardiaque (réponse inotrope négatif). De plus, ils provoquent l'expression des MMP, ce qui induit la dégradation de la matrice extracellulaire cardiaque (MEC) et stimule la signalisation inflammatoire au sein des leucocytes et des cellules endothéliales vasculaires.

IL-6 – Interleukine 6

Cette cytokine considérée comme pro-inflammatoire augmente dans le cas d'un infarctus du myocarde et elle est libérée par les cardiomyocytes, les fibroblastes ainsi que les monocytes et macrophages infiltrés dans le milieu de l'ischémie ⁵⁷. Dans les cas homéostatiques normaux, la concentration d'IL-6 dans le sang est de 1-5 pg/ml tandis que ce niveau augmente plus que 1000 fois dans le cas d'activation de la réponse inflammatoire ⁶⁰.

Elle est responsable de l'activation de la voie de signalisation gp130/STAT3 ce qui accentue l'inflammation dans un cœur infarci. IL-6 peut activer deux voies de signalisations, une classique et l'autre est une trans-signalisation dans lesquelles elle peut agir comme anti-inflammatoire et pro-inflammatoire respectivement. Dans la voie de signalisation classique, IL-6 se lie à son récepteur qui est lié à la membrane, tandis que, dans le cas de la trans-signalisation, IL-6 se lie à un récepteur soluble ⁵⁷. Lorsqu'IL-6 se lie à son récepteur IL-6R membranaire, ce dernier associe la glycoprotéine 130 KDa (gp130) ce qui induit la voie de signalisation intracellulaire via JAK/STAT, ras/MAPK et PI-3k ⁶⁰.

De ce fait, IL-6 peut d'une part jouer un rôle bénéfique pour le cœur en préservant la fonction de la mitochondrie, et stimulant la synthèse de la matrice extracellulaire. D'autre part, IL-6 peut avoir une action pro-inflammatoire, induire l'hypertrophie des cardiomyocytes et la prolifération des fibroblastes ⁵⁷.

Reg3-β – Regenerating islet-derived protein 3 beta

Une grande diversité de cytokines est libérée en réponse à l'inflammation déclenchée lors d'une ischémie cardiaque. Parmi ces cytokines, on distingue l'Oncostatine-M (OSM) qui est un membre de la famille des IL-6 et qui possède la capacité de se lier aux macrophages et les activer par la suite. Ces macrophages, à leur tour, libèrent un éventail de cytokines qui stimulent les cardiomyocytes encore actifs à proximité du tissu nécrotique (cardiomyocytes viables qui se trouvent dans la région péri-infarctique), induisant ainsi la sécrétion de Reg3β (Regenerating Islet-Derived Protein 3 Beta).

Une étude d'immunofluorescence menée sur des tissus cardiaques de 10 humains atteints de cardiomyopathie ischémique en phase terminale révèle que la concentration de Reg3b est plus élevée que celle chez 5 humains sains non ischémiques ⁶¹.

Cette chimiokine est produite par les cardiomyocytes viables et joue un rôle essentiel dans l'attraction des macrophages vers le cœur ischémique. Ces macrophages contribuent à éliminer les neutrophiles, ainsi que les débris cellulaires et les cellules mortes, ce qui est nécessaire pour limiter l'expansion de l'inflammation vers les régions saines du ventricule. De plus, Reg3 β favorise la préservation de la matrice pour soutenir une cicatrisation optimale ^{61,62}.

La réponse inflammatoire est cruciale lors d'un infarctus du myocarde

Effectivement l'inflammation a des effets indésirables sur le cœur ²⁵ surtout dans le cas de son exacerbation, et en même temps, son inhibition, par exemple avec des AINSs (anti-inflammatoires non stéroïdiens) en cas d'un infarctus du myocarde, cause une rupture de la cicatrice suivie par le décès. Ceci indique qu'un contrôle de la réponse inflammatoire et une balance entre la sécrétion des cytokine pro et anti-inflammatoires sont nécessaires pour bénéficier de l'inflammation et limiter ses effets indésirables. En effet, Le blocage de la réponse inflammatoire à la suite d'un infarctus du myocarde, empêche le recrutement des fibroblastes et leur différenciation en myofibroblaste. La réponse fibrotique réparatrice sera donc altérée et l'amincissement de la cicatrice aboutira à une rupture cardiaque ²⁶. Ceci indique qu'elle est cruciale pour la cicatrisation du cœur à la suite d'un infarctus du myocarde. Par exemple, des études in vivo ont montré que le traitement des rats par une dose de 50mg/kg de méthylprednisolone à la suite d'une ischémie cardiaque due à l'occlusion de l'artère coronaire, mène à une altération de la cicatrisation, de la fonction des fibroblastes et déposition du collagène ⁶³. Aussi, le traitement des chiens qui ont subi une occlusion de l'artère coronaire par de l'indométacine montre un amincissement important de la cicatrice ce qui peut causer sa rupture ⁶⁴. Donc les anti-inflammatoires à large spectre ne sont pas bénéfiques. Ceci indique qu'une réponse inflammatoire bien contrôlée est indispensable pour la guérison cardiaque à la suite d'un infarctus du myocarde.

L'inflammation joue un rôle important dans la réparation et le remodelage cardiaque ; Elle est considérée comme l'étape cruciale pour l'initiation de la réparation tissulaire à la suite d'une ischémie cardiaque ⁶⁵.

L'incapacité du cœur adulte à se renouveler est un obstacle qui empêche sa guérison totale. L'inflammation aide le cœur ischémié à se débarrasser des milliers des cardiomyocytes morts ainsi que des débris de la matrice extracellulaire ⁶⁶. C'est une réponse à intention réparatrice. L'activation d'une cascade inflammatoire aboutit à l'activation des fibroblastes, leur recrutement et différenciation en myofibroblastes sécrétant de collagène, ce qui induit la formation d'une cicatrice non contractile, une réponse physiologique qui aide le cœur à s'adapter à sa nouvelle condition ^{67,66}. Ceci constitue la fibrose réparatrice.

La différenciation des fibroblastes en myofibroblastes est représentée dans la figure 13 suivante :

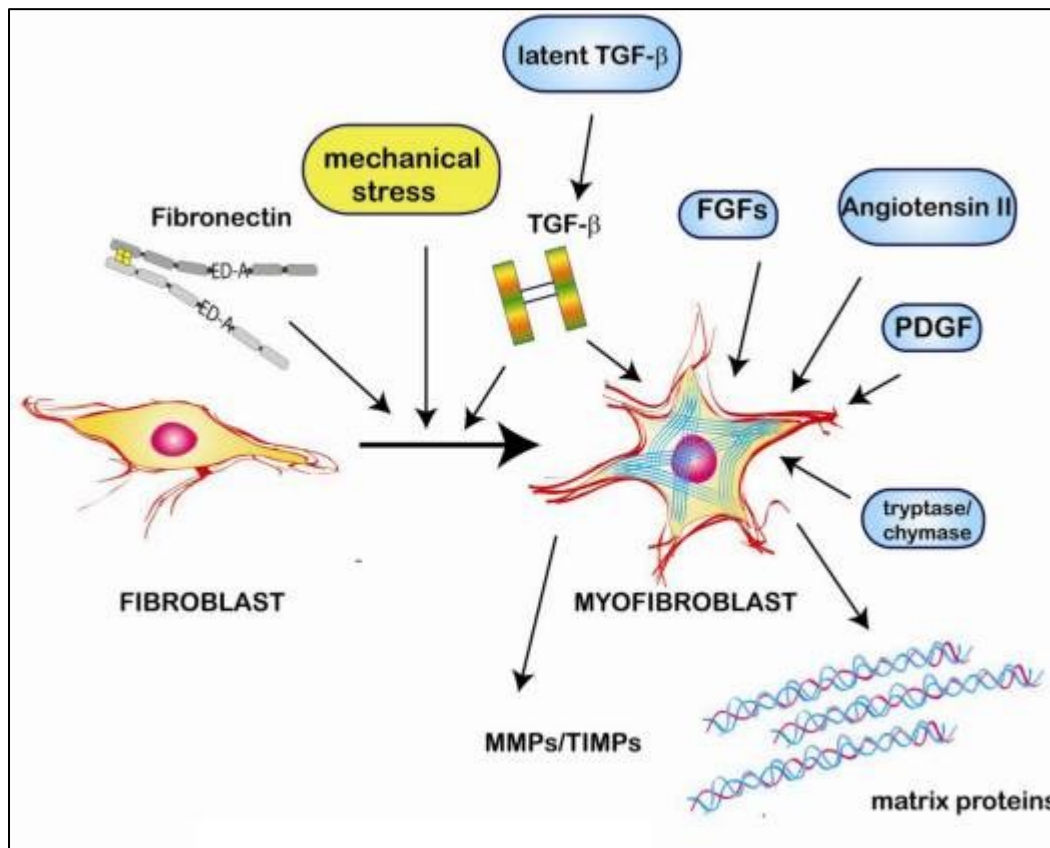


Figure 1313: schéma qui résume la stimulation de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes.

Source : N.G. Frangogiannis, Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair, 2012 ²⁶

Légende : → active ; TGF-b : transforming growth factor ; FGF : fibroblast growth factor; PDGF: platelet derived growth factor; MMPs: matrix metalloproteinases; TIMPs: tissue inhibitors of metalloproteinase

Cette figure montre la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes sous l'action de divers stimuli tel que le stress, la fibronectine et TGF- β . Les myofibroblastes ainsi formés peuvent être stimulés davantage par d'autres stimuli tel que l'Angiotensine II, les FGF et PDGF, pour synthétiser et libérer des métalloprotéinases de matrice (MMPs) et leur inhibiteurs TIMPS, et des protéines de matrice comme le collagène.

Une inflammation excessive induit l'exacerbation du remodelage, aboutit à une altération de la réparation fibrotique et nuit au tissu cardiaque⁶⁸. La formation d'une cicatrice stable initiée par une réponse inflammatoire bien contrôlée, empêche l'expansion de l'infarctus qui aboutit à l'insuffisance cardiaque^{22,12}.

La libération des cytokine anti-inflammatoires constitue un mécanisme essentiel pour une réponse inflammatoire équilibrée et une stabilité cicatricielle

Pour mettre fin à la réponse inflammatoire, empêcher son exacerbation, et débiter la réparation cardiaque, il y a recrutement des monocytes anti-inflammatoires et des cellules T régulatrices. De plus, les cellules immunitaires comme les mastocytes et les cellules dendritiques, secrètent des cytokines anti-inflammatoires tels que l'interleukine 4 (IL-4) et l'interleukine 10 (IL-10)²¹. A la suite de l'ingestion des neutrophiles apoptotiques, les macrophages acquièrent un phénotype anti-inflammatoire (secrètent TGF- β , IL-10). Aussi, les cardiomyocytes viables de la région péri-infarctique secrètent des médiateurs anti-inflammatoires pour prévenir l'expansion de la réponse inflammatoire²⁰. Cette phase sera suivie par des modifications phénotypiques des fibroblastes²¹ : la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes qui migrent dans le lieu de l'infarctus pour proliférer. C'est le remodelage cardiaque qui constitue la fibrose réparatrice, la réponse physiologique du cœur qui lui permet de maintenir son intégrité structurelle. En effet, la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes est initiée par les cytokines inflammatoires générées à la suite de l'ischémie (Figure 12). Les myofibroblastes sont caractérisés par l'expression des protéines tels que α -actine du muscle lisse et la vimentine filamentueuse intermédiaire. En effet, les myofibroblastes sont riches en collagène et fibronectine^{69,70,71}. La phase de fin de l'inflammation met en relief l'importance de la balance entre les cytokines pro et anti-inflammatoires.

On se demandait s'il y a une relation quelconque entre la réponse inflammatoire et l'inhibition de la rentrée dans le cycle cellulaire. En effet, la voie de la sérine-thréonine p38 α/β MAPK est une des médiateurs qui jouent un rôle séminale dans la réponse inflammatoire dans plusieurs tissus à la

suite d'une blessure et en même temps joue un rôle dans l'inhibition de la prolifération cellulaire ⁶. En effet, Les MAPK sont des éléments clés des réseaux de signalisation cellulaire, agissant sur des processus comme la division cellulaire, la différenciation, le développement et la mort cellulaire. On en distingue trois grandes familles : les ERK, les JNK/SAPK et les p38 MAPK ⁷².

L'inhibition de la p38 α/β MAPK (p38 Mitogen Activated Protein Kinase)

Commençons par définir la p38 MAPK et la voie de son activation et son implication dans l'induction des cardiomyocytes ventriculaires dans la rentrée dans le cycle cellulaire et dans la réponse inflammatoire produite à la suite d'un infarctus du myocarde.

La famille des p38 MAPK

La p38 α/β MAPK est une kinase généralement stimulée par un signal stressant externe ⁷³. Cette kinase est activée par une double phosphorylation des résidus Thr¹⁸⁰ et Tyr¹⁸² via la voie de signalisation MAPK (Figure 13). Elle est le plus souvent étudiée dans les cellules cancéreuses.

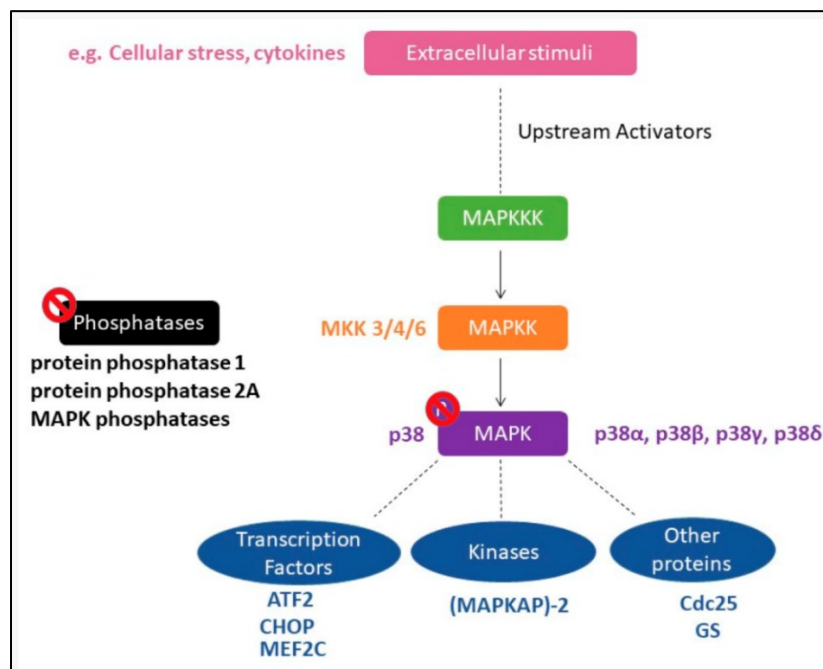


Figure 1414: Schéma représentatif de la voie d'activation de P38 α/β MAPK

Source: El Rawas, R ; Amaral, I.M.; Hofer, A. Is p38 MAPK Associated to Drugs of Abuse-Induced Abnormal Behaviors? Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 4833. <https://doi.org/10.3390/ijms21144833>

Légende : → stimule, ⊖ déphosphoryle, ATF2 : Activating Transcription Factor 2, CHOP : C homologous protein, MEF2C : Myocyte Enhancer Factor 2C, GS : Glutamine Synthetase, Cdc25 : Cyclin-dependent kinases 25, MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

En effet, il existe 4 isoformes de la p38MAPK : p38 α (MAPK14), p38 β (MAPK11), p38 γ (MAPK12), et p38 δ (MAPK13)⁷³. Dans le cœur des adultes, p38 α est la forme prédominante par rapport à p38 β and p38 γ . Aussi, p38 α est la forme dominante dans le cœur des rongeurs.

Sachant que la p38 α MAPK contrôle la régulation du cycle cellulaire des cardiomyocytes, elle est inversement associée avec le développement cardiaque. En effet, l'activité de la p38 MAPK dépend du type cellulaire. Par exemple, dans les fibroblastes, l'inhibition de la transition de la phase G1 à la phase S par la p38 MAPK durant le cycle cellulaire est en corrélation avec une diminution des niveaux d'expression de la Cycline D1: la p38 MAPK régule la stabilité de la protéine cycline D1 par phosphorylation de son résidu Thr-286 ce qui cause la dégradation de la protéine^{74, 75}. Aussi, la p38 MAPK cause l'interruption de la progression de la phase G2 vers la phase M du cycle cellulaire : p38 active par phosphorylation la molécule MK2 qui par la suite phosphoryle CDC25B and CDC25C phosphatases qui sont nécessaires pour déphosphoryler le CDK1. Les CDC25B/C phosphorylés seront dégradés ce qui induit l'arrêt de la progression de la phase G2 vers la phase M du cycle cellulaire. Ces deux mécanismes sont rapportés dans la figure 14 suivante⁷⁵.

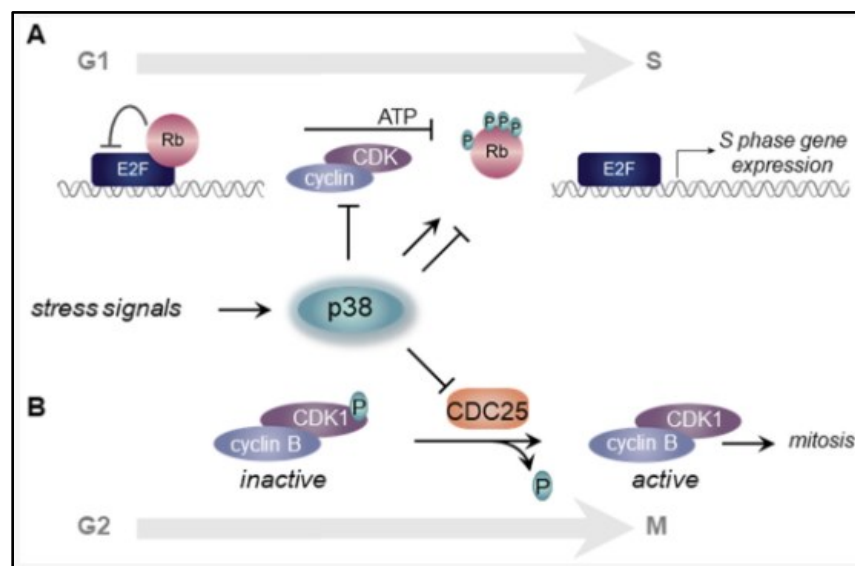


Figure 1515: p38 contrôle la transition de la phase G1 vers la phase S et de la phase G2 vers la phase M du cycle cellulaire⁷⁴

source: Robert H Whitaker et.al ; 2021

Légende : → active, --| inhibe ; CDC25 : cell division cycle 25 ; CDK1 :cyclin dependant kinase 1 ; Rb : retinoblastoma ; E2F : transcription factor

- (A) La transition de la phase G1 vers la phase S est contrôlée par la phosphorylation de Rb. En effet, le stress active la p38 qui va phosphoryler Rb. Rb phosphorylée va pouvoir inhiber E2F. De plus la p38 induit la phosphorylation de la cycline D ce qui cause sa dégradation.
- (B) La transition de la phase G2 vers la mitose (phase M) se fait suite à la déphosphorylation de CDK1 par CDC25 ce qui active CDK1/cycline B.

En addition, elle joue un rôle important dans l'apoptose, la migration cellulaire, le métabolisme ainsi que la différenciation cellulaire à la suite de l'activation de la voie MK2/3 Et ceci est illustré dans la figure 15 suivante :

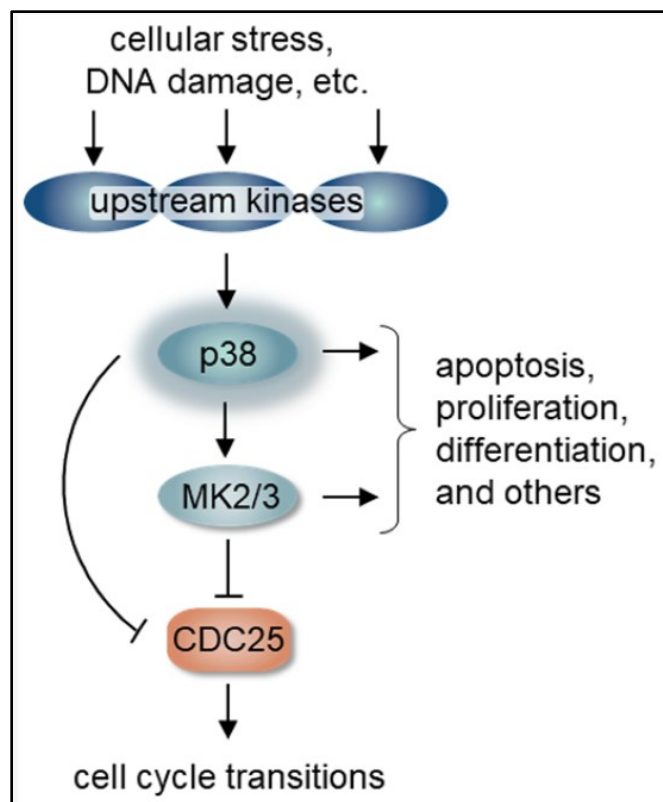


Figure 1616: Le stress active la p38 et induit l'apoptose, la prolifération et la différenciation cellulaire ⁷⁴

source: Robert H Whitaker et.al ; 2021

Légende : → active, CDC25 : cell division cycle 25 ; MK2/3 : mitogen activated protein 2/3

Le stress cellulaire active la voie p38 MAPK qui a son tour active la MK2/3. Cette dernière inhibe par phosphorylation le CDC25 qui est le régulateur de la transition cellulaire.

p38 α / β MAPK (p38 Mitogen Activated Protein Kinase) inhibe la rentrée dans le cycle cellulaire et induit une réponse inflammatoire

L'administration in vivo de la molécule phorbol 12,13-dibutyrate PDBu activatrice de la protéine kinase C (PKC), qui induit la phosphorylation de la p38 MAPK, bloque l'incorporation du BrdU dans les cardiomyocytes de rats nouveau-nés ⁷⁶, donc inhibe la prolifération des cardiomyocytes et empêche leur rentrée dans le cycle cellulaire. Ceci a encore été démontré par l'utilisation d'un autre activateur de PKC, le PMA (phorbol myristate acétate) dans les cellules musculaires lisses aortiques de rats et cela a impliqué une augmentation de $230 \pm 27\%$ de l'activité de la p38 MAPK par rapport aux rats contrôles.

Pour confirmer le rôle de p38 α / β MAPK dans la régulation de la division cellulaire des cardiomyocytes, des études ont utilisé le SB203580, une molécule sélective et pharmacologiquement inhibitrice de l'activité de p38 α et p38 β MAPK ⁷⁷. Ils ont trouvé que l'inactivation ciblée de p38 α dans les cardiomyocytes de rats adultes âgés de 12 semaines en les traitant par la molécule SB203580 avec le facteur de croissance FGF1 se traduit par une incorporation du BrdU ce qui reflète la rentrée des cardiomyocytes adultes dans le cycle cellulaire ⁷⁸, d'où ils ont déduit le rôle de régulation négative de p38 α des gènes responsables de la mitose des cardiomyocytes adultes.

De plus, une étude menée sur les cardiomyocytes des rats nouveau-nés a montré par qPCR que l'inhibition de la p38 α / β MAPK par le SB203580, conduit à l'augmentation de l'expression des gènes cycline A2 et cycline B impliquées dans la cytokinèse et la mitose.

Cependant, le co-traitement des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau nés avec le PDBu et SB203580 qui est l'inhibiteur de la p38 MAPK, induit l'incorporation du BrdU dans les cardiomyocytes ⁶ et favorise la rentrée des cellules dans le cycle cellulaire. Ceci a été confirmé par des études dans le labo de Dr Calderone, qui ont montré que la stimulation de la protéine kinase C par le phorbol ester PDBu en présence de l'inhibiteur de la p38 MAPK, SB203580 induit la rentrée dans le cycle cellulaire et l'expression de novo de la protéine filamenteuse Nestine dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés.

Globalement, ces données confirment que l'activation de la p38 α / β MAPK inhibe la rentrée des cardiomyocytes ventriculaires dans le cycle cellulaire. Cela suggère que la p38 α / β MAPK peut être considérée comme cible, dont l'inhibition peut induire la rentrée des cardiomyocytes dans le cycle cellulaire et peut-être, pouvoir induire une régénération cardiaque.

La voie de signalisation HIPPO: une cible potentielle de la p38 α / β MAPK

La voie de signalisation HIPPO est une voie de signalisation qui contient une cascade de protéines kinases, et qui est cruciale pour le développement du cœur. Elle est responsable de la régulation de la prolifération cellulaire et la rentrée dans le cycle cellulaire⁷⁹. En effet, les kinases impliquées dans cette voie de signalisation, phosphorylent une protéine adaptatrice Salvador (Figure 17), puis le complexe des protéines activatrices de la transcription des gènes dans les cellules, Yap et Taz (Figure 17). Yap-1 non phosphorylée passe dans le noyau de la cellule, interagit avec le facteur transcriptionnel TEAD pour induire la transcription des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Figure 17)⁸⁰. La phosphorylation de ce complexe protéique implique sa dégradation, ce qui inhibe sa translocation dans le noyau cellulaire, ainsi inhibant la transcription des gènes et la prolifération des cellules par la suite (Figure 17). Des études du labo de Dr Calderone sur les cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés âgés de 1 jour ont montré que le traitement de ces cellules par le phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu, 100nM) qui active la p38 MAPK en induisant sa phosphorylation, cause la phosphorylation de la SER¹²⁷ de YAP-1 ce qui l'empêche de passer dans le noyau. Cependant, le co-traitement des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés âgés de 1 jour par PDBu (100 nM) et par la SB203580 (10 μ M) qui bloque l'activité de la p38 MAPK, a augmenté significativement l'incorporation de BrdU dans les cardiomyocytes ce qui indique leur rentrée dans le cycle cellulaire⁸¹. Ainsi, La voie HIPPO est considérée comme cible de la p38 MAPK^{82,83}.

Une autre étude chez des souris saines adultes âgés de 3 mois, montre que l'inhibition de Salvador par injection des souris par du tamoxifène, induit une incorporation du 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) nucléaire dans les cardiomyocytes ce qui confirme la rentrée de ces cardiomyocytes dans le cycle cellulaire. Tandis que, dans les cœurs de souris contrôles, il y a incorporation de EdU seulement dans les fibroblastes⁷⁹.

En résumé, La p38 α MAPK est une kinase qui sert à ajouter un élément phosphate sur la sérine (Ser127) de YAP-1 de la voie HIPPO (Figure 17) ce qui inhibe sa translocation dans le noyau cellulaire. Cependant, l'inhibition de la p38 α MAPK inhibe cette phosphorylation, ce qui permet à la YAP-1 déphosphorylée de rentrer dans le noyau cellulaire et activer la prolifération ¹⁰.

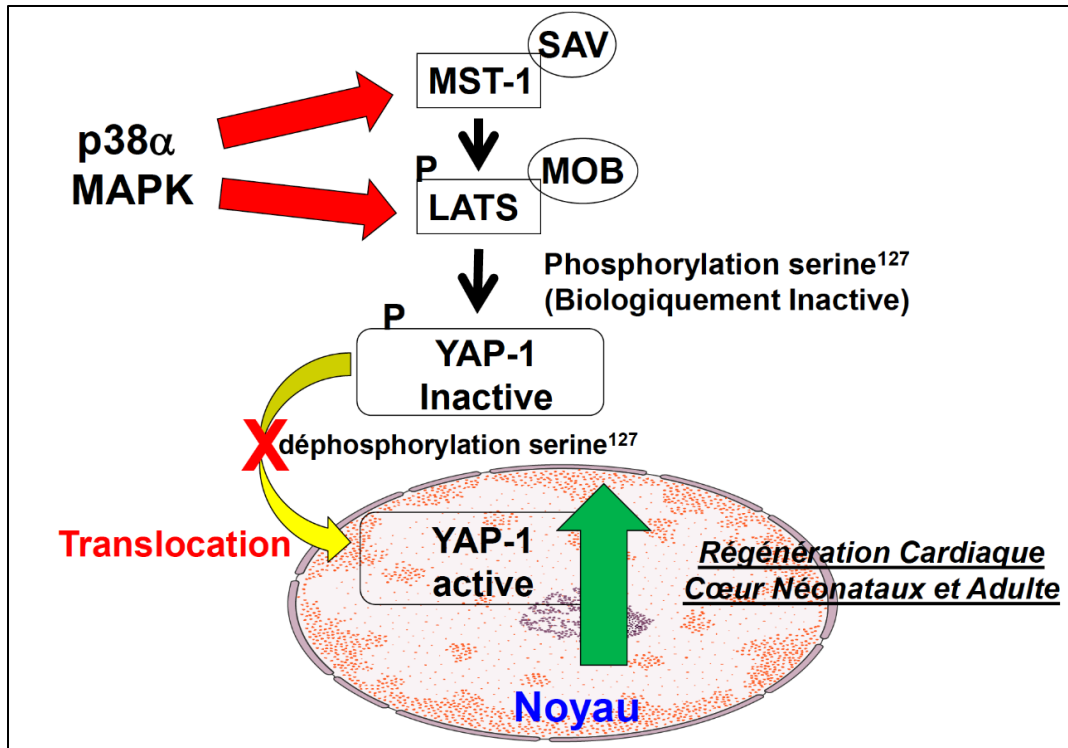


Figure 1717: Représentation schématique qui résume la phosphorylation de Yap-1 de la voie HIPPO

Source : Angelo Calderone

Legende : \rightarrow : active ; $-x\rightarrow$: inhibe ; MST-1: serine/threonine protein kinases, mammalian homolog of the Hippo kinase from Drosophila ; LATS: Ser/Thr kinase associated with the tumor suppressor pathway known as the Hippo-LATS/Warts pathway; SAV: Salvador; MOB:Mps One Binder; Yap-1: Yes Associated protein.

Dans la voie de signalisation HIPPO, p38 α MAPK empêche, par phosphorylation, la translocation de YAP-1 dans le noyau de la cellule.

L'activation de la p38 α / β MAPK induit une réponse inflammatoire robuste

Les études ont déjà montré plusieurs voies de signalisation couplées à la p38 MAPK qui jouent un rôle majeur dans la régulation des médiateurs inflammatoires ⁸⁴, expression des gènes, hypertrophie des cardiomyocytes, prolifération et apoptose ⁸⁵. En effet, les cytokines

inflammatoires stimulent le recrutement de la p38 MAPK selon la voie de signalisation dans la figure 18 suivante :

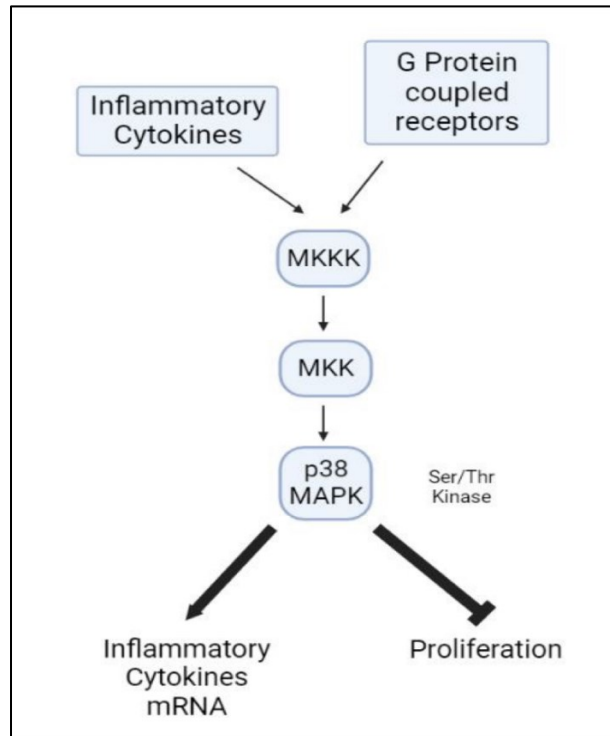


Figure 1818: Schéma qui résume la voie de signalisation ciblée par notre étude et qui montre le rôle de la p38 MAPK dans l'inflammation et la prolifération cellulaire

Source: Biorender.com.

Légende : → active, -| inhibe ; MKKK : MAP Kinase Kinase Kinase; MKK: MAP Kinase Kinase; Ser/thr: Sérine / thréonine

Les cytokines inflammatoires secrétées lors d'une réponse inflammatoire, ainsi que l'activation des récepteurs couplés à la protéine G, activent une cascade de signalisation qui induit l'activation de MKKK, puis MKK, puis la sérine thréonine Kinase, p38 MAPK. Cette dernière active la transcription des gènes des cytokines inflammatoires ce qui augmente le niveau de leur ARN messagers. Simultanément, la p38 MAPK inhibe la prolifération cellulaire.

Ensuite, la p38 MAPK stimule l'expression des ARNm des cytokines inflammatoires. En parallèle, la p38 MAPK inhibe la prolifération cellulaire.

Pour étudier si la voie de signalisation qui est couplée à la réponse inflammatoire dans les cardiomyocytes mononucléés est la même qui inhibe leur rentrée dans le cycle cellulaire on a étudié la p38 MAPK qui est généralement commune pour les 2 voies, joue un rôle dans l'inhibition de la prolifération cellulaire et l'expression de l'ARNm des cytokines inflammatoires.

L'inhibition de la p38 α / β MAPK aboutit à l'expression de novo de la protéine filamenteuse Nestine

Nestine est un membre de la classe 5 de la famille des protéines filamenteuses intermédiaires, qui a été détectée dans les cellules progénitrices cardiaques⁸⁶. Généralement, les cellules Nestine⁽⁺⁾ ont un niveau d'activité proliférative beaucoup plus élevé que les cellules Nestine⁽⁻⁾. Une modeste population de fibroblastes dans le cœur adulte normal exprime Nestine, et cette expression augmente dans le cas d'une fibrose⁸⁶.

La régénération cardiaque chez le poisson zèbre et les rongeurs nouveau-nés implique deux réponses essentielles : la rentrée dans le cycle cellulaire qui aboutit à la prolifération des cardiomyocytes mononucléés et aussi l'acquisition du caractère migratoire à la suite de l'expression de novo de la protéine filamenteuse Nestine^{87,88}.

Ce qui est intéressant c'est que Nestine apparaît dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats en phase embryonnaire proliférative^{89,6,90} et leur inhibition induit un arrêt de la rentrée dans le cycle cellulaire⁸⁹. Par exemple, l'étude réalisée par Dr Calderone qui implique le traitement des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés pour une durée de 3 jours consécutifs par PDBu (100 nM) n'a pas réussi à montrer une expression de Nestine par les cardiomyocytes ou bien leur entrée dans le cycle cellulaire. Tandis que, le co-traitement des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés âgés de 1 jour par PDBu (100nM) et par SB203580 (10 μ M) pour 3 jours consécutifs, induit une expression de Nestine dans 50% des cardiomyocytes, et 40% de ceux-ci ont réussi à rentrer dans le cycle cellulaire⁸¹.

L'expression de novo de Nestine dans les cardiomyocytes à la suite d'un infarctus du myocarde chez les adultes donne à ces cardiomyocytes un phénotype embryonnaire, et met en relief une possibilité de régénération cardiaque. Cependant, les études ont montré que les cardiomyocytes adultes Nestine⁽⁺⁾ sont incapables de rentrer dans le cycle cellulaire. Chez les rats adultes et aussi les humains qui ont subi un infarctus du myocarde, les études ont montré qu'il y a une expression de Nestine autour de la région infarctée. Cependant, chez les rats adultes, les cardiomyocytes ventriculaires Nestine⁽⁺⁾ de la région péri-infarctée étaient incapables de rentrer dans le cycle cellulaire^{89,6,91}.

Des études du labo de Dr Calderone sur des rats nouveau-nés âgés de 1 jour dont l'apex ventriculaire a été reséqué, ont montré que l'administration de SB203580 qui inhibe la p38 α/β MAPK lors de la formation du caillot de fibrine, met en relief une expression significative de Nestine dans les cardiomyocytes ventriculaires de la région péri-infarctée et que ceux-ci étaient capables de rentrer dans le cycle cellulaire ⁶.

Donc, on peut supposer qu'une autre voie de signalisation, peut-être celle de l'activation de la p38 α/β MAPK inhibe l'effet de l'expression de Nestine dans les cardiomyocytes ventriculaires des mammifères adultes.

Ceci peut être due au fait que le stress oxydatif généré lors d'un infarctus du myocarde ou d'une ischémie cardiaque active la p38 MAPK ce qui conduit à la phosphorylation de Yap-1 et par la suite à l'inhibition de la rentrée dans le cycle cellulaire. On pourrait supposer que les cellules ont l'intention de proliférer pour permettre la régénération cardiaque mais l'activité de la p38 MAPK leur empêche de le faire.

Les populations cellulaires Nestine⁽⁺⁾ sont impliquées dans le remodelage cardiaque

Chez les mammifères adultes, Nestine est constitutivement exprimée dans les cellules résidentes progénitrices du cœur dans lesquelles elle joue un rôle essentiel dans la fibrose réparatrice, l'angiogenèse et la neurogenèse stimulés par un infarctus du myocarde ⁸⁶. Aussi, Nestine est exprimée constitutivement dans les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Elle participe à la fibrose réparatrice, qui est la cicatrisation à base de collagène qui remplace les cellules nécrotiques, et la fibrose réactive qui est due à une prolongation du stimulus fibrotique et est considérée comme une réponse exacerbée de cicatrisation qui s'accompagne par une déposition du collagène autour des vaisseaux et entre les cellules et ceci aboutit à une insuffisance cardiaque. La différence entre la fibrose réparatrice et la fibrose réactive est présentée dans la figure 19 suivante ^{92, 93} :

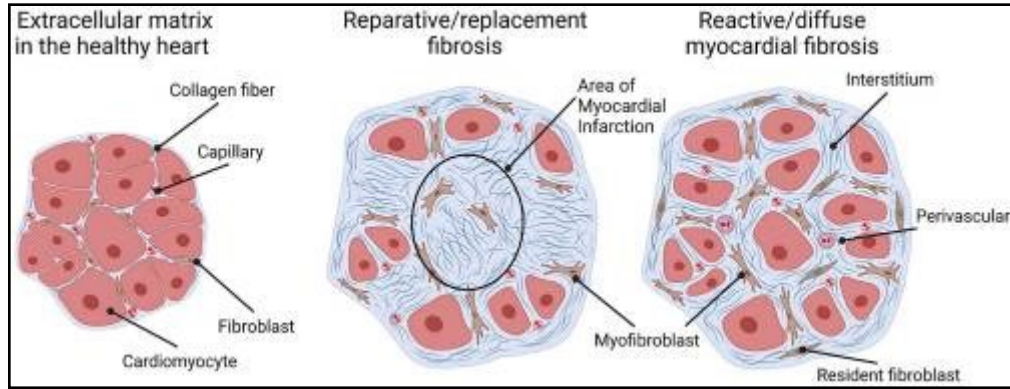


Figure 1919: 2 types de fibrose : réparatrice et réactive ⁹²

Source : Morphino P et. Al (2023)

La matrice extracellulaire dans le cœur sain (à gauche) est un réseau de collagène qui intègre les cardiomyocytes et les fibroblastes. La fibrose réparatrice (au centre) se manifeste par une cicatrice à base de collagène qui remplace les cardiomyocytes nécrotiques. La fibrose réactive (à droite) accompagne l'insuffisance cardiaque et se manifeste par un dépôt diffus de collagène dans les zones interstitielles et périvasculaires. (Modifié avec permission de Schimmel et al)

Aussi, Nestine est exprimée par les cellules qui participent à l'angiogenèse et au remodelage vasculaire. Ce qui est intéressant dans ces populations, c'est que l'expression de Nestine augmente à la suite d'un infarctus du myocarde ou d'une surcharge de pression ^{89,6,94,95}.

De plus, les cardiomyocytes ventriculaires mononucléés de rats nouveau-nés qui expriment Nestine, acquiert un phénotype migratoire marqué par l'apparition des saillies membranaires et un allongement significatif des cellules ⁹⁰.

Alors qu'on remarque une absence de l'expression de Nestine dans les cardiomyocytes ventriculaires du cœur adulte, elle est induite par l'infarctus du myocarde ce qui permet de trouver une expression de novo de Nestine dans la région infarctée et péri-infarctée. Ainsi, en se fondant sur les données obtenues dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés, il est tentant de spéculer que l'expression de novo de Nestine dans les cardiomyocytes ventriculaires adultes représente un événement clé pour permettre leur rentrée dans le cycle cellulaire à la suite d'une ischémie ^{89,6}.

Effet biologique de l'expression de Nestine

Des études ont démontré que les myofibroblastes qui expriment Nestine ont une plus grande synthèse d'ADN et expression d' α -actine. Par exemple, dans une étude réalisée par Beguin et al

l'introduction d'un lentivirus qui contient un shRNA contre Nestine dans les fibroblastes de rats nouveau-nés, diminue significativement leur synthèse d'ADN, ce qui implique un potentiel rapport entre la protéine Nestine et la synthèse d'ADN ⁹⁶. De plus, les fibroblastes des rats nouveau-nés expriment Nestine de façon supérieure aux rats adultes ce qui leur permet d'avoir une synthèse d'ADN supérieure à celle des adultes ⁹⁷.

Les travaux de notre labo ont déjà montré que les cardiomyoblastes de la lignée H9c2 de rats embryonnaires expriment la protéine filamenteuse Nestine. La diminution de l'expression de Nestine par utilisation de l'ARN lentiviral shRNA contre Nestine a engendré une inhibition du cycle cellulaire. Cela permet de supposer que Nestine joue un rôle crucial dans la prolifération cellulaire et la rentrée dans le cycle cellulaire ⁸⁹. Aussi, les études de notre labo confirment que l'inhibition de la protéine filamenteuse Nestine dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés en les infectant par un AAV9 (Adeno-associated virus) contenant du shRNA contre Nestine, diminue remarquablement l'intercalation de BrdU dans leurs noyaux, et ceci est par rapport aux mêmes cellules infectées par un AAV9 contenant du shRNA non spécifique (Scrambled) ⁸¹.

On suppose que les cardiomyocytes ventriculaires qui expriment de novo Nestine, dans les régions infarctée et péri-infarctée acquièrent un phénotype embryonnaire qui leur permet de rentrer dans le cycle cellulaire et ainsi induire une régénération cardiaque. Cependant, malheureusement, ceci n'est pas toujours le cas. Les cardiomyocytes ventriculaires des rats adultes de la région péri-infarctée du myocarde sont toujours incapables de rentrer dans le cycle cellulaire. Ceci nous permet de considérer que, peut-être, il existe une autre voie de signalisation cellulaire qui se croise avec celle de la rentrée dans le cycle cellulaire des cardiomyocytes ventriculaires Nestine⁽⁺⁾ de la région péri-infarctée.

En effet, la régulation du cycle cellulaire peut-être associée à des gènes qui jouent un rôle principal dans la prolifération des cardiomyocytes ventriculaires et dont l'induction ou l'inhibition affecte la rentrée de ces cellules dans le cycle cellulaire. Commençons par RUNX1 qui inhibe la progression de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire ⁹⁸. Ensuite, le CDKN2A qui est un inhibiteur de la kinase dépendante de la cycline A2. L'expression de ce gène cause l'arrêt du cycle cellulaire à la phase G1 en inhibant la CDK4 et induit la sénescence des cellules. Aussi, ECT2 qui

est impliqué dans la cytokinèse, son inhibition induit la binucléation des cardiomyocytes.^{99,100}. Enfin, Bub1, qui constitue un point de contrôle du fuseau mitotique qui garantit un alignement des chromosomes avant la poursuite du cycle cellulaire et donc participe à la coordination de la progression du cycle cellulaire¹⁰¹.

L'expression de ces gènes dans les cardiomyocytes ventriculaires, peut être considérée comme facteur crucial qui affecte la rentrée dans le cycle cellulaire des cardiomyocytes ventriculaires Nestine⁽⁺⁾. De ce fait l'expression de l'ARN messager de ces gènes a été étudié, dans ce mémoire, dans les cardiomyocytes ventriculaires Nestine⁽⁺⁾ de rats nouveau-nés qui rentrent dans le cycle cellulaire à la suite de leur co-traitement par PDBu et SB203580.

Ceci peut en outre expliquer le fait de l'incapacité des cardiomyocytes ventriculaires dans la région infarctée des cardiomyocytes adultes de rentrer dans le cycle cellulaire malgré leur expression de novo de la protéine filamenteuse Nestine. L'utilisation de rats nouveau-nés nous facilite le fait de comprendre la voie de signalisation dans une cellule qui rentre dans le cycle cellulaire, pour pouvoir comparer les résultats obtenus chez les rats nouveau-nés avec ceux des rats adultes.

En effet, des études au labo de Dr Calderone ont montré que la stimulation de la protéine Kinase C (PKC) par le phorbol ester PDBu en présence de l'inhibiteur de la p38 α / β MAPK (SB203580) induit la rentrée dans le cycle cellulaire et stimule l'expression de novo de Nestine dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés âgés de 1 jour.

Ces résultats nous permettent de commencer à prévoir une voie de signalisation impliquée dans l'expression de Nestine et la rentrée dans le cycle cellulaire qu'on essaiera de clarifier dans ce mémoire et aussi de distinguer quelle isoforme de PKC est impliquée dans ce phénomène.

La protéine Kinase C est une sérine/thréonine Kinase, enzyme responsable de la phosphorylation d'un large éventail de protéines impliquées dans différentes voies de signalisation ainsi que dans différents tissus y compris les cardiomyocytes.

L'activation physiologique de la plupart des PKC est généralement médiée par le 1,2-diacylglycérol ou le calcium, alors que l'activation externe se fait en utilisant les phorbol esters^{102,103}.

Parmi les substrats phosphorylés par les PKC on note les canaux sodiques, calciques et potassiques ainsi que les protéines contractiles actine et myosine des cardiomyocytes ¹⁰².

Ça fait longtemps que plusieurs études ont été menées pour étudier les différentes isoformes et leurs voies de signalisation et il a été montré que l'expression de PKC diminue dans le cœur adulte. Chez les rats, durant la phase néonatale, il y a une expression de PKC- α , δ , et ϵ majoritairement, cependant, chez les rats adultes on trouve majoritairement PKC, δ et ϵ . ¹⁰².

Pour déterminer la location cellulaire des isoformes de PKC, des études immunohistochimiques et d'immunofluorescence sur une culture cellulaire de cardiomyocytes de rats nouveau nés ont permis de montrer que l'isoforme PKC- α est cytosolique et sera transloquée vers la membrane à la suite de son activation dépendante du calcium et de DAG, alors que les isoformes δ et ϵ sont localisées dans le noyau et leur stimulation est médiée par DAG uniquement ^{102,104}.

Une étude publiée en 2002 a montré que PKC- α induit l'hypertrophie des cardiomyocytes en stimulant ERK1/2 ¹⁰⁵ et ceci est aussi associé à la p38 MAPK ^{105,106}.

Les cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés expriment PKC- α ainsi que les isoformes δ et ϵ . Les expériences de notre labo ont montré que le traitement des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés avec le phorbol ester PDBu active ces isoformes de PKC. De plus, l'inhibition pharmacologique de l'isoforme conventionnelle PKC- α par la molécule GF109203X inhibe l'expression de Nestine dans les fibroblastes ventriculaires de ces rats. Toutes ces données nous invitent à poser une autre hypothèse qui exige d'identifier laquelle des isoformes de PKC est impliqué dans l'expression de Nestine de novo dans les cardiomyocytes.

Hypothèses et objectifs de l'étude

Les approches conventionnelles employées en clinique pour traiter les patients ayant subi un infarctus du myocarde impliquent l'utilisation d'une variété de médicaments qui tentent de stabiliser la fonction cardiaque et de réduire la postcharge, diminuant ainsi la charge hémodynamique sur le myocarde compromis. Cependant, une autre approche plausible pour traiter les patients atteints d'IM consiste à promouvoir une réponse régénératrice cardiaque en stimulant la réentrée dans le cycle cellulaire de la modeste population de cardiomyocytes ventriculaires mononucléés identifiés dans le cœur endommagé par ischémie. Cependant, les événements sous-jacents impliqués dans la réentrée dans le cycle cellulaire des cardiomyocytes ventriculaires mononucléés dans le contexte *in vivo* du cœur ischémique de mammifères adultes restent indéfinis.

Le laboratoire de Dr Calderone a révélé que la région péri-infarctique du cœur de rat et de souris endommagé ischémiquement contient une modeste population de cardiomyocytes ventriculaires mononucléés exprimant la protéine filamenteuse intermédiaire Nestine. Dans les cellules souches neurales et diverses formes de cancer, Nestine joue un rôle majeur dans la prolifération cellulaire. En se basant sur ces données, il était tentant de spéculer sur un rôle similaire chez les cardiomyocytes ventriculaires. Cependant, les événements de signalisation liés à l'expression de Nestine chez les cardiomyocytes ventriculaires restent inconnus. Pour résoudre cette question, le laboratoire du Dr Calderone a utilisé des cardiomyocytes ventriculaires mononucléés de rats nouveau-nés âgés d'un jour pour élucider les événements de signalisation associés à l'expression de Nestine. Dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés non traités, l'expression de Nestine est absente. Les travaux de recherche du laboratoire de Dr Calderone ont révélé que le traitement des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés avec un ester de phorbol recrutant à la fois des isoformes conventionnelles et nouvelles de la PKC en présence de l'inhibiteur $p38\alpha/\beta$ MAPK SB203580, conduit à la réentrée dans le cycle cellulaire et à la réexpression à nouveau de la protéine filamenteuse Nestine dans une sous-population prédominante. En outre, l'épuisement de la Nestine dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés et les cardiomyocytes ventriculaires embryonnaires H9c2 du rat a inhibé la réentrée dans le cycle cellulaire, soulignant son rôle déterminant dans la réponse proliférative. Cependant, l'identité de l'isoforme de la PKC impliquée dans l'expression à nouveau de la Nestine et la réentrée ultérieure

dans le cycle cellulaire des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés en présence d'inhibition de p38 α / β MAPK reste actuellement inconnue. Des preuves préliminaires à la suite d'expériences faites dans le labo de Dr. Calderone sur les fibroblastes ventriculaires de rats nouveau-nés âgés de 1 jour, suggèrent que la PKC- α était impliquée dans l'expression de la Nestine, soutenant un rôle potentiellement analogue dans les cardiomyocytes ventriculaires.

En plus d'inhiber la réentrée dans le cycle cellulaire, la signalisation de la p38 α / β MAPK est identifiée en lien avec l'expression des cytokines inflammatoires. Cependant, il reste inconnu si la signalisation de la p38 α / β MAPK dans les CVRNs (cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés) est également couplée à l'expression des ARNm d'un ensemble de cytokines inflammatoires. Biologiquement, ce dernier paradigme est important car les cytokines inflammatoires libérées par les macrophages après des dommages ischémiques au cœur de mammifère adulte favorisent préférentiellement la formation des cicatrices plutôt que de promouvoir une réponse régénérative cardiaque. De plus, il a été rapporté que les cytokines inflammatoires IL-1 β et TNF- α activaient la signalisation de la p38 α / β MAPK dans les cardiomyocytes ventriculaires. Ainsi, la libération locale de cytokines inflammatoires par les CVRNs via une voie dépendante de la p38 α / β MAPK pourrait agir de manière autocrine pour inhiber davantage la réentrée dans le cycle cellulaire via le recrutement de la p38 α / β MAPK. Cette découverte suggère qu'une réponse inflammatoire robuste des cardiomyocytes ventriculaires pourrait coïncider avec l'inhibition de la réentrée dans le cycle cellulaire médiée par p38 α / β MAPK.

Hypothèse

- 1- L'inhibition de la p38 α / β MAPK aboutit à l'expression de novo de Nestine par les cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés médiés par l'isoforme PKC- α .
- 2- L'activation de la voie de signalisation PKC- α /p38 α / β MAPK induit l'augmentation de l'expression d'un panel de cytokines inflammatoires dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés.

Objectifs

Les objectifs de cette étude sont premièrement de démontrer que l'activation de PKC par PDBu couplée à l'inhibition de la p38 α / β MAPK se traduit par la rentrée dans le cycle cellulaire des

cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés âgés de 1 jour. Notre approche consiste à isoler et traiter des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés âgés d'un jour. Ces cardiomyocytes sont principalement mononucléés et possèdent la capacité intrinsèque de réintégrer le cycle cellulaire en réponse à un stimulus approprié. Ceci nous permet facilement, d'une façon simplifiée, de suivre les voies de signalisations mises en place. Ainsi, cette série d'expériences permettra de déterminer si les CVRNs associés à l'expression de novo de Nestine représentent la population prédominante ayant réintégré le cycle cellulaire. Pour examiner la réentrée dans le cycle cellulaire, l'immunofluorescence sera utilisée pour évaluer l'incorporation de BrdU (marqueur de la phase S) et le marquage nucléaire PHH3 (marqueur de la phase G2-M du cycle cellulaire) dans les CVRNs immunoréactives à la troponine T (présence ou absence d'une expression de novo de Nestine) traités avec PDBu et le co-traitement PDBu/SB203580. Le deuxième objectif est de déterminer si l'expression d'un panel de gènes directement impliqués dans la réentrée dans le cycle cellulaire est influencée par le co-traitement PDBu/SB203580 des CVRNs et si le modèle d'expression coïncide avec l'expression de novo de Nestine. Ainsi, dans cette série d'expériences, une approche de qPCR examinera les niveaux d'ARNm de Runx1, CDKN2a, ECT2 et Bub1 en réponse au PDBu et au co-traitement PDBu/SB203580. Le troisième objectif est d'utiliser une approche pharmacologique pour élucider si les isoformes conventionnelles ou nouvelles de PKC induisent l'expression de novo de Nestine dans les CVRNs. Ainsi, l'inhibiteur de l'isoforme conventionnelle de PKC, GFX sera ajouté aux CVRNs traités avec PDBu/SB203580 pour évaluer l'expression de novo Nestine par Western blot et la réentrée dans le cycle cellulaire via l'immunofluorescence. Le quatrième objectif est d'examiner le rôle direct de la p38 α/β MAPK dans l'expression d'ARNm d'un panel de cytokines inflammatoires précédemment rapportées comme élevées à la suite des dommages ischémiques au cœur des mammifères adultes. Enfin, une approche pharmacologique sera utilisée pour déterminer plus précisément si l'isoforme PKC- α est impliquée dans l'expression médiée par la p38 α/β MAPK des ARNm de cytokines inflammatoires.

Matériels et Méthodes

Dans la section suivante on décrit les matériels et les méthodes employés dans notre approche expérimentale pour étudier la réponse cellulaire du cœur des rats. Pour atteindre l'objectif de notre étude, on a effectué la digestion du cœur de rats nouveau-nés âgés d'un jour, et on a exploré différents traitements sur les cardiomyocytes ventriculaires. Afin de compléter les études, on a employé des approches semi-quantitatives comme le western blot, l'immunofluorescence et la qPCR qui sont toutes détaillées dans cette section.

L'utilisation des rats nouveau-nés âgés de 1 jour de laboratoire dans les expérimentations suivantes est conforme aux directives du Conseil Canadien de Protection des Animaux et approuvée par le Comité de Déontologie Animale du Centre de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal.

Récupération des cardiomyocytes et des fibroblastes ventriculaires des rats nouveau-nés

Des rats nouveau-nés « Sprague-Dawley » de 1 jour (Charles River, Canada) sont utilisés pour valider l'hypothèse de travail. En utilisant une approche veillant à minimiser la souffrance des rats, on procède à l'excision de leur ventricule gauche tout en utilisant des matériaux stériles. On transfère les ventricules isolés dans un bain de solution saline tamponnée de « Hank's Balanced Salt Solution » (HBSS) puis on les coupe en deux et on les transfère à nouveau dans un autre bain de HBSS similaire. Ceci facilite la digestion des ventricules. Ensuite, ces derniers sont incubés dans une solution de 0.25% de trypsine pour une nuit à 4 degrés Celsius et sous une agitation constante, afin de digérer les protéines de la matrice extra cellulaire ce qui facilite la digestion du tissu.

Le lendemain, la procédure débute par arrêter le travail de l'enzyme (la trypsine) en ajoutant 10 ml d'un mélange composé de « Dulbecco's Modified Eagle Medium » (DMEM low glucose, Hyclone Laboratories, Logan, UT) et de Sérum bovin foetal (FBS) 7% préalablement inactivé par la chaleur, et de 10 ml de 1% Pénicilline/Streptomycine (P/S) au tissu. Ensuite, on commence les digestions physiques manuelles et successives par la collagénase 0.5% à 37 degrés Celsius par trituration pour 5 fois avec une pipette de 10ml. À la fin de chaque digestion, la solution récupérée est directement refroidie sur glace. Les culots cellulaires, résultants des 5 digestions successives,

sont récoltés par centrifugation à 1500 tours par minutes (rpm) à 4 degrés Celsius pendant 5 minutes. Les culots sont ensuite suspendus dans du sérum de bœuf fœtal (FBS 7%).

Les culots obtenus contiennent à la fois des cardiomyocytes et des fibroblastes. La séparation de ces deux types cellulaires repose sur leur vitesse d'adhérence à la surface des plaques, tout en notant que les fibroblastes sont plus rapides en ce processus. Pour cela, la suspension cellulaire obtenue est placée dans des pétris cellulaires de type T75 dans l'incubateur à 37 degrés Celsius pendant 45min, puis les cardiomyocytes en suspension sont récupérés. Ce passage est effectué pour 3 fois consécutives dans des plaques T75 pour assurer une adhésion maximale de la majorité des fibroblastes ce qui aboutit à une suspension quasiment pure de cardiomyocytes ventriculaires représentant 75-80% de la population cellulaire.

Culture cellulaire des cardiomyocytes ventriculaires

L'étape suivante consiste à compter les cardiomyocytes. Pour le faire, on prend 10 μ l de la suspension contenant les cardiomyocytes ventriculaires et on la met sur un hématocytomètre pour déterminer sa concentration en cardiomyocytes. Cela nous permet de réaliser une dilution précise pour atteindre la densité souhaitée de cardiomyocytes par puit (400-500 cellules/mm²).

Les expérimentations qui suivent sont l'électrophorèse de type western et la qPCR, pour lesquelles des pétris à 6 puits (P6) sont utilisés. Des pétris 12 puits sont utilisés pour les expériences d'immunofluorescence dans lesquels sont placés au préalable des lamelles revêtues de Poly-D-Lysine (PDL).

Notons que l'électrophorèse de type western permet d'évaluer le niveau d'expression des protéines (méthode semi-quantitative), l'immunofluorescence permet la détection et la localisation des antigènes d'intérêt, alors que la qPCR concerne les acides ribonucléiques (ARN) messagers et permet de mesurer le niveau d'expression de gènes spécifiques.

Pour les puits de P6 destinés à ensemercer les cellules servant ensuite pour l'extraction de l'ARNm messager, une densité de 400-500 cellules/mm² est atteinte. Le volume nécessaire de cellules est mis dans les puits qui sont ensuite incubés à 37 degrés Celsius pendant 2 jours dans un milieu composé de « DMEM-low glucose » (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA) supplémenté par

7% FBS inactivé préalablement par la chaleur, avec 1% pénicilline-streptomycine pendant 48 heures ensuite les cellules sont soigneusement lavées et maintenues dans du DMEM- de faible teneur en glucose auquel on a ajouté de l'insuline (5 µg/mL), transferrine (5 µg/mL), et sélénium (5 ng/mL) (ITS; BD Bioscience, Bedford, MA, USA) pendant une période de 24 heures.

Ensuite les cellules sont sujettes à différentes combinaisons de traitements avec les molécules suivantes :

1. L'activateur des isoformes de PKC, le Phorbol 12, 13-dibutyrate (**PDBu**, 10^{-7} M; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO),
2. L'inhibiteur de p38 α/β MAPK **SB203580** (10 µM; LC Laboratories, Woburn, MA)
3. L'inhibiteur de l'isoforme conventionnelle PKC- α , le **GF109203X** (1 µM, CAS#176504-36-2 ; Sigma-Aldrich)

Notons que SB203580 est ajouté 10-15 minutes avant l'ajout du PDBu et qu'une condition basale dans laquelle les cellules ne subissent aucun traitement, est considérée comme contrôle négatif.

Les cellules seront exposées aux mêmes traitements pendant 3 jours consécutifs (chaque exposition dure 24 heures), la durée totale de traitement est de 72 heures.

Traitement des cardiomyocytes ventriculaires

Les cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés sont traités pendant 3 jours consécutifs (72 heures). Les différents traitements sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 11: Tableau qui résume la combinaison des traitements pour les cardiomyocytes et les fibroblastes de cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés

| Traitement des cardiomyocytes |
|--|
| SB203580 (10 μ M) |
| PDBu (10 ⁻⁷ M) |
| GFX (1 μ M) |
| PDBu (10 ⁻⁷ M) + SB203580 (10 μ M) |
| PDBu (10 ⁻⁷ M) + GFX |
| PDBu (10 ⁻⁷ M) + SB (10 μ M) + GFX(1 μ M) |

PDBU est dissous dans l'éthanol et la concentration finale du solvant est de 0,001 % d'éthanol. SB est dissous dans du DMSO et la concentration finale du solvant est de 0,01 % de DMSO. GFX est également dissous dans du DMSO et la concentration finale du solvant est de 0,01 % de DMSO.

De plus, des expériences ont déjà été réalisées dans notre labo qui confirment que 0,001 % d'éthanol et 0,01 % de DMSO seuls n'ont aucun effet sur l'incorporation de BrdU.

Analyse de l'expression des gènes par qPCR

- Extraction de l'ARN

Le kit NucleoSpin de MACHEREY NAGEL (Allemagne) a été employé pour l'extraction de l'ARN total des cardiomyocytes en culture. Ce kit fonctionne par la rétention des acides nucléiques sur colonne et différentes étapes de lavage visant à isoler spécifiquement les ARN. De plus, une étape de traitement à la DNase permet l'élimination de la contamination par l'ADN génomique assurant ainsi une extraction d'ARN hautement pure.

Dans les plaques à six puits (P6) utilisées pour cultiver et traiter les cellules, trois puits sont consacrés pour chaque condition. Le milieu de culture dans lequel se trouvent les cellules est complètement aspiré puis 350 μL de tampon de lyse sont ajoutés dans les puits de chaque condition sur les cellules attachées pour les lyser.

Le produit sera filtré une première fois, par centrifugation, pour éliminer les débris cellulaires.

Pour fixer l'ARN sur la membrane des colonnes du kit, 350 μL d'éthanol sont ajoutés à chaque lysat avant centrifugation. Ensuite, l'enlèvement des sels et la digestion de l'ADN par une DNase recombinante (fonctionnant à température ambiante) sont effectués, avant 3 étapes de lavages, précédant l'ultime étape d'élution avec 50 μL d'eau distillée ultra pure sans DNase/RNase .

La concentration de l'ARN obtenu est mesurée à l'aide du spectrophotomètre « NanoDrop » en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ et puis les échantillons sont conservés à -80 degrés Celsius pour les prochaines utilisations.

- Reverse Transcription

L'ARN isolé est ensuite utilisé dans une réaction de reverse transcription (RT) pour la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc). Pour se faire, le Kit « High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit » (Thermofisher, MA, USA, numéro de catalogue : 4368814) est utilisé pour la rétrotranscription de 400 ng d'ARN messagers. La rétrotranscription s'effectue sur un thermocycleur à 25 degrés Celsius pendant 10 minutes, suivi par 2 heures à 37 degrés Celsius et enfin 30 secondes à 85 degrés Celsius. A l'issue de la rétrotranscription, les ADNc sont dilués pour obtenir une concentration théorique de 2ng/ μL d'ARN messagers.

Cette méthode est de même employée pour extraire l'ARN des tissus des ventricules gauches obtenus des rats adultes pour les expériences faites in vivo, juste qu'on utilise un appareil polytron pour aider dans la lyse du tissu dans la première étape de cette procédure.

Les ADNc sont conservés à -20 degrés Celsius pour les prochaines étapes de qPCR.

- qPCR

Cinq 5µl d'ADNc est mélangé avec 15 µl d'un mix global comprenant le Master Mix (TaqMan™ Fast Advanced Master Mix, no UNG Catalog number: A44360 ; TaqMan™ Fast Advanced Master Mix Catalog number: 4444557), de l'eau sans RNase, et la sonde TaqMan correspondant au gène de référence et/ou au gène d'intérêt.

Les sondes TaqMan utilisées dans les expériences sont présentées dans le tableau suivant tout en notant que GAPDH et HPRT1 sont les gènes de référence.

Tableau 22: Tableau qui résume les différents gènes TaqMan utilisés dans les réactions de QPCR avec le nom et le numéro d'identification correspondants

| Gene TaqMan | Name of the gene | Assay ID |
|---------------------------|--|--|
| GAPDH (gène de référence) | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | Rn01775763_g1 Hs02786624_g1 |
| HPRT1 (gène de référence) | Hypoxanthine phosphoribosyltransferase1 | Rn01527840_m1 |
| NES | Nestin | Rn01455599_g1 |
| REG3B | regenerating islet-derived 3 beta | Rn00583920_m1 |
| CCL2 | chemokine (C-C motif) ligand 2 | Rn00580555_m1 |
| CCL3 | chemokine (C-C motif) ligand 3 | Rn01464736_g1 |
| CCL7 | chemokine (C-C motif) ligand 7 | Rn01467286_m1 |
| CCL12 | chemokine (C-C motif) ligand 12 | Rn01464638_m1 |
| CCL22 | chemokine (C-C motif) ligand 22 | Rn01536591_m1 |
| IL6 | interleukin 6 | Rn01410330_m1 |
| IL-1β | interleukin 1 Beta | Rn00580432_m1 |
| IL-1α | interleukin 1 alpha | Rn00566700_m1 |
| NPPA | natriuretic peptide A | Rn00664637_g1 |
| TNF-α | tumor necrosis factor alpha | Rn99999017_m1 |
| CDKN2a | cyclin-dependent kinase inhibitor 2A | Rn00580664_m1 |
| Runx1 | runt-related transcription factor 1 | Rn01645281_m1 |
| ECT2 | epithelial cell transforming 2 | Rn01457089_m1 |

| | | |
|------|---|-------------------------------|
| Bub1 | BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase | Rn01484954_m1 |
|------|---|-------------------------------|

La machine utilisée pour faire la réaction de polymérisation en chaîne est le « StepOnePlus™ Real-Time PCR System ».

Les 2 étapes du cycle de la polymérisation qui seront répétées 40 fois :

-30 secondes : 95°C : Séparation des doubles brins d'ADN, et libération des polymérases fixés aux cycles précédents.

- 1 minute : 60°C : Fixation des amorces sur les sites complémentaires (hybridation des amorces), fixation de la polymérase aux amorces et élongation. Les courbes de fluorescence obtenues sont analysées par le calcul du delta CT (ΔCT) consistant en une soustraction du CT (cycle au seuil) du gène cible par la moyenne géométrique des CT des gènes de référence, pour chaque échantillon. La valeur du niveau d'expression est obtenue en calculant le $2^{-\Delta CT}$

Extraction des protéines et électrophorèse de type western

Les cellules attachées dans les puits des pétris sont lavées par du PBS (1X) puis incubées pendant 30 minutes dans le tampon de lyse qui contient des inhibiteurs pour les phosphatases et les protéases. Les cellules sont ensuite transférées dans des tubes Eppendorf puis subissent la centrifugation à 10,000 tours par minutes (RPM) et à 4 degrés Celsius durant 10 minutes. Le surnageant, contenant les protéines visées, est transféré dans un nouveau tube Eppendorf à partir duquel on prélève 10ul pour faire le dosage des protéines par la méthode Bradford.

Sachant la concentration des protéines, des aliquots sont préparés de façon à obtenir 30 µg de protéines par échantillon. Ainsi, les protéines sont mélangées avec de l'acétone dans lequel elles sont suspendues dans le congélateur à -20 degrés Celsius pour une nuit ; cette étape permet la précipitation des protéines. Le lendemain, à la suite de leur centrifugation, les culots de protéines restant après aspiration du surnageant, sont re-suspendues dans une solution Laemmli Buffer 2X (Bio-Rad laboratories) contenant 5% de 2-Mercaptoéthanol et sont alors prêts pour l'utilisation dans l'électrophorèse de type western.

Les échantillons sont chauffés pendant 5 minutes à 100°C, pour dénaturer les protéines, en utilisant l'appareil PTC-100 (Programmable Thermal Controller, MJ Research) et puis sont injectés pour migration dans les puits d'un gel de SDS-polyacrylamide 10%. Ensuite, les protéines migrées sont transférées sur une membrane de Nitrocellulose durant une durée de 90 minutes.

La membrane est alors incubée dans une solution de 5% de lait écrémé dans du PBS-T (PBS 1X contenant 0.01% de Tween20) pour bloquer les sites non spécifiques pour une durée d'une heure.

Par la suite, la membrane est incubée dans une solution de blocage de 5% de lait écrémé dans du PBS-T contenant les anticorps primaires pendant une nuit à 4°C. Les anticorps primaires utilisés sont cités dans le tableau suivant :

Tableau 33: tableau qui résume les anticorps primaires utilisés dans le western blot, avec la dilution correspondante et la source

| Cible | Anticorps | Dilution et source |
|-----------------|--|--|
| Nestine | Mouse monoclonal anti-Nestine | 1:500, RRID:AB_305313; Abcam, Canada |
| PKC- α | Rabbit monoclonal anti-PKC- α | 1:2000, catalogue #59745; Cell Signaling |
| PKC- δ | Rabbit monoclonal anti-PKC- δ | 1:2000, catalogue #2058; Cell Signaling |
| PKC- ϵ | Rabbit polyclonal anti-PKC- ϵ | 1:2000, catalogue #2683; Cell Signaling |
| Reg3 β | Rabbit Regenerating Islet Derived Protein 3 Beta Polyclonal Antibody | 1 :500, catalogue #MBS2026321, My BioSource |
| GAPDH | Mouse monoclonal anti-GAPDH | 1:10,000, RRID:AB_437392; Ambion, Austin, TX |

Le lendemain matin, la membrane est lavée avec la solution de PBS-T et incubée dans une solution de blocage, contenant les anticorps secondaires correspondants conjugués au HRP (horseradish peroxidase 1:20,000, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) pendant 2 heures à température ambiante.

Enfin, les protéines sont visualisées par incubation de la membrane dans une solution de ECL (Enhanced ChemiLuminescent, Perkin Elmer, Waltham, MA)

La révélation se fait sur un hyperfilm (GE Healthcare Life Sciences) sensible aux signaux chimioluminescents. Les bandes sont enfin analysées avec l'interface d'Image J (Image J software®) et chaque signal protéique est normalisé par rapport au signal de la protéine de référence GAPDH.

Immunofluorescence

Les cardiomyocytes ventriculaires des rats nouveau-nés qui sontensemencés sur les lamelles dans les plaques à 12 puits (P12) et traités pendant une période de 72h sont fixés à l'aide d'une solution de 2% de paraformaldéhyde dans une solution tampon saline PBS 1X pendant une durée de 20 minutes à température ambiante. Les lamelles sont ensuite lavées avec une solution de PBS 1X.

Par la suite, les cellules sont bloquées avec une solution de 2% de sérum de chèvre normal (NGS - Normal Goat Serum) et du 0.2% de TRITON X-100 dans du PBS 1X pendant une durée de 90 minutes. A la suite de cette étape, on remplace le bloqueur par la solution tampon (NGS 1% + TRITON 0.05% dans PBS 1X) contenant les anticorps primaires spécifiques : Troponine-T, Nestine, BrdU et PHH3, pour une incubation de 90 minutes à température ambiante. Ensuite, les lamelles sont transférées au réfrigérateur à une température de 4 degrés Celsius pendant la nuit.

Les anticorps primaires utilisés sont:

- mouse monoclonal anti-nestin (1:400, RRID:AB_305313; Abcam)
- mouse monoclonal anti-cardiac troponin-T (1:200, RRID:AB_306445; Abcam)
- chicken polyclonal anti-nestin (1:200, RRID:AB_2753197; Abcam)
- rabbit polyclonal anti-cardiac troponin-T (1:200, catalogue #ab209813; Cell Signaling)
- chicken polyclonal anti-bromodeoxyuridine (1:500, RRID:AB_10562139; Abcam)

- rabbit polyclonal against phosphorylated serine¹⁰ residue of histone 3 (1:200, RRID:AB_304763; Abcam)

Le noyau a été marqué par du 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich).

Le jour suivant, on aspire la solution contenant les anticorps primaires, on lave soigneusement les cellules par du PBS 1X puis on leur ajoute la même solution tampon mais cette fois-ci contenant l'anticorps secondaire. Les lamelles sont alors incubées pour une durée de 90 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Les anticorps secondaires utilisés sont:

- goat anti-mouse IgG conjugated to Alexa-555 or Alexa-647 (1:600; Life Technologies),
- goat anti-rabbit IgG conjugated to Alexa-488 or Alexa-647 (1:600; Life Technologies),
- goat anti-chicken IgG conjugated to Alexa-488 or Alexa-555 (1:600; Life Technologies).

L'immunofluorescence a été visualisée avec un objectif apochromatique monté sur une lentille grossissante confocale Zeiss Axiovert 100M. Le nombre de cellules troponine-T⁽⁺⁾ ont été compté et standardisé à 500 cellules. La surface cellulaire (μm^2) a été calculée avec le programme d'image Zeiss LSM.

Statistiques

Dans cette étude, une hypothèse nulle n'a pas été pré-spécifiée et aucun calcul formel de taille d'échantillon n'a été effectué. Par conséquent, l'étude était de nature exploratoire et les valeurs p calculées sont descriptives. Néanmoins, l'étude a testé l'hypothèse selon laquelle la PKC- α était l'isoforme primaire de la PKC impliquée dans l'apparition de Nestine⁽⁺⁾-CVRNs qui incorporaient la 5-bromo-2'-désoxyuridine (BrdU), exprimaient PHH3 et favorisaient l'induction d'un profil transcriptomique délimitant un phénotype prolifératif. Ces hypothèses ont été testées en utilisant n=4-5 portées indépendantes par groupe, ce qui fournissait une puissance de 80% pour détecter des tailles d'effet (définies comme la différence entre la moyenne du paramètre d'intérêt dans deux groupes/écart type du paramètre d'intérêt) dans la plage de 3,2 à 4,8, une magnitude qui peut être attendue pour une étude in vitro. Ces calculs de puissance ont été déterminés en supposant un niveau de signification conservateur à deux côtés de 0,005 pour tenir compte du fait que même si un taux d'erreur de type I global de 0,05 était visé, des comparaisons par paires entre les groupes ont été réalisées à l'aide de tests post-hoc qui utilisent des niveaux de signification par paires inférieurs. Les données sont évaluées par une analyse one-way ANOVA suivie du test post hoc Fisher LSD. Aussi, Les données de qPCR des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés ont été évalué par une analyse one-way ANOVA suivie d'un test post-hoc Fisher LSD et une différence significative déterminée par une valeur de $P < 0,05$ (Origin 2016).

Résultats

Dans la section suivante, nous présentons les résultats de notre investigation sur la réponse des cardiomyocytes de rats nouveau-nés à la suite de différents traitements. Nos résultats reflètent la dynamique cellulaire complexe des cardiomyocytes envers l'activation des isoformes de PKC et l'inhibition simultanée de la p38 MAPK, ainsi que l'expression génique et protéique cardiaque à la suite d'une réponse inflammatoire robuste. Cette section mettra en évidence des indicateurs potentiels de régénération cardiaque chez les rats nouveau-nés.

PKC induit une réponse hypertrophique au niveau des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés

Commençons tout d'abord par examiner les effets du phorbol ester et de la molécule SB203580 sur les cardiomyocytes ventriculaires des rats nouveau-nés, et ceci a été montré dans la figure 20 suivante :

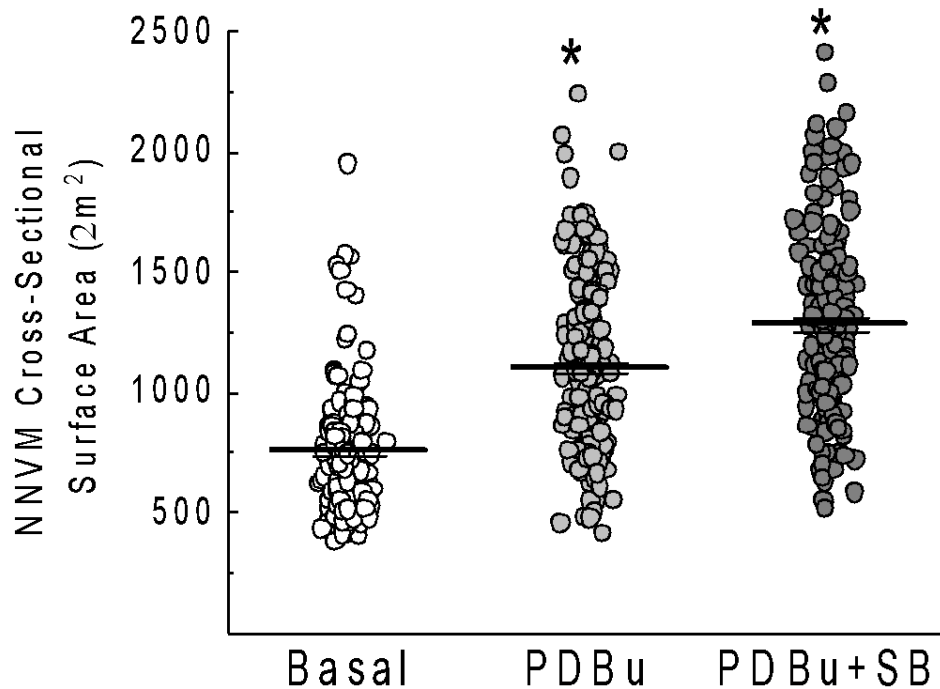


Figure 2020: Analyse de la superficie cellulaire (en μm^2) des cardiomyocytes ventriculaires des rats nouveau-nés âgés d'un jour marqué par l'immunoréactivité à la troponine T

Figure 20: Analyse de la superficie cellulaire (en μm^2) des cardiomyocytes ventriculaires des rats nouveau-nés âgés d'un jour marqué par l'immunoréactivité à la troponine T

Les traitements : PDBu (Phorbol 12,13 dibutyrate ; 100 nM) et PDBu + SB203580 (SB ; 10 μM)

Au niveau cellulaire, les résultats semi-quantitatifs illustrés dans le graphique ci-joint (Figure 20) dévoilent la réponse des cardiomyocytes ventriculaires des rats nouveau-nés âgés d'un jour, évalués par immunofluorescence, à la suite de divers traitements. En comparaison avec les cellules basales non traitées, l'exposition des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés à l'activateur de la PKC, le phorbol ester PDBu (100 nM) pendant 3 jours consécutifs montre que la

majorité des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés ont subi une hypertrophie, caractérisée par une augmentation notable de leur surface cellulaire (Figure 20).

Les travaux antérieurs de notre labo ont rapporté que l'inhibiteur de la p38 MAPK, SB203580 (10 uM) inhibe complètement la phosphorylation de la protéine de choc thermique 27 (HSP27), une cible en aval de p38 MAPK, induite par PDBu ⁸⁹.

Ces données confirment la sélectivité pharmacologique de l'inhibition de l'activité de la p38 MAPK par SB203580. Le co-traitement des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés par l'inhibiteur de la p38 MAPK en présence de PDBu, n'inhibe pas la réponse hypertrophique : l'augmentation de la surface cellulaire de la majorité des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés (CVRNs) traités par PDBu et SB203580 est similaire à l'augmentation de la surface des CVRNs traités par PDBu seul (Figure 20). Notons qu'on a obtenu des données non montrées dans cette section qui indiquent que le traitement des cardiomyocytes par SB203580 seul n'a aucun effet sur la surface des cellules.

L'activation de PKC en inhibant la p38 MAPK stimule l'expression de novo Nestine et la rentrée dans le cycle cellulaire des CVRNs

En l'absence de stimulation (état basal) ou en présence de SB203580 (10 uM) seul pour une période de 3 jours consécutifs, un nombre modeste de CVRNs montre une incorporation de BrdU et une expression du PHH3 nucléaire (Figure 22). Le traitement des CVRNs, immunoréactifs à la troponine-T (notons que dans les expériences d'immunofluorescence, le marquage à la troponine-T permet l'identification d'un cardiomyocyte ventriculaire), par 10^{-7} M de PDBu seul, ne stimule pas la rentrée des CVRNs dans le cycle cellulaire puisque le nombre de CVRNs traitées par PDBu et qui incorporent le BrdU est similaire à celui des CVRNs non traités (Figure 22). Cependant, le co-traitement des CVRNs, immunoréactifs à la Troponine-T, par 10^{-7} M PDBu et 10 μ M de SB203580 provoque une augmentation de l'incorporation de BrdU (Figures 21 et 22).

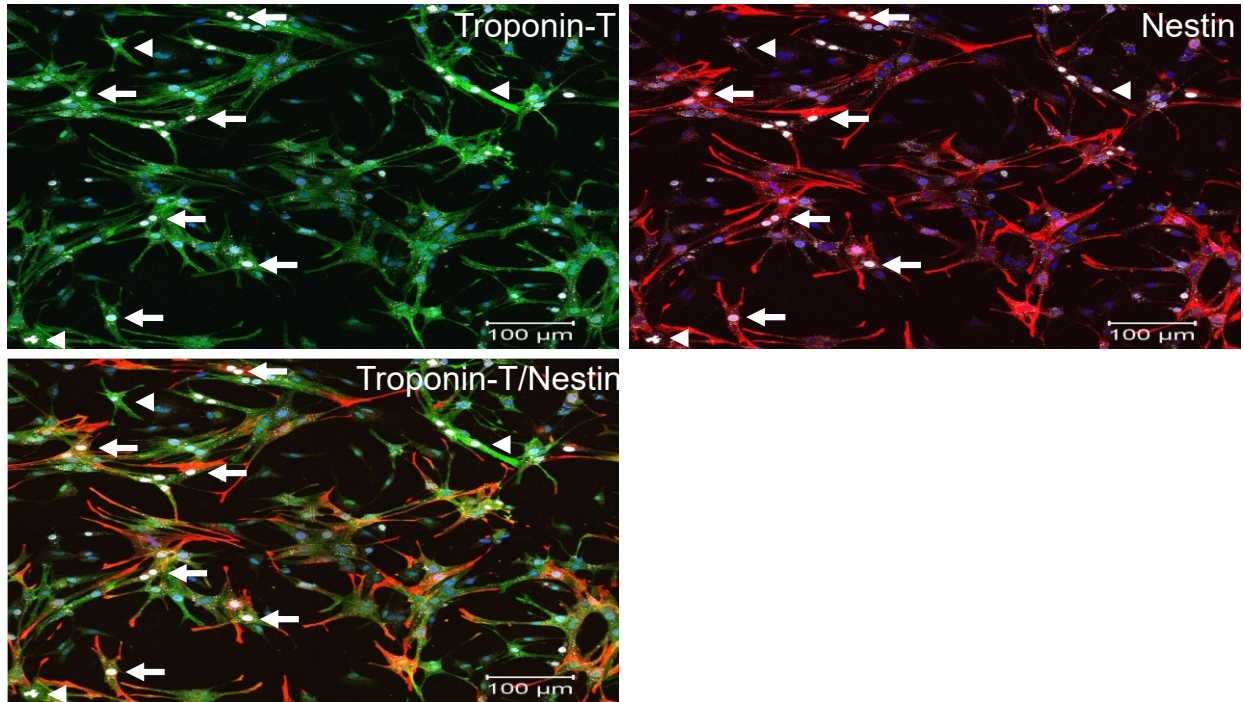


Figure 2121: Les figures obtenues par imagerie confocale de l'expérience d'immunofluorescence sur les cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés âgés de 1 jour et co-traitées par PDBu et SB203580 pour 3 jours consécutifs

Légende : le rouge correspond à Nestine et le vert à la troponine-T.

- ▶ désigne incorporation de BrdU dans les cardiomyocytes Nestine⁽⁻⁾ ; → : désigne l'incorporation de BrdU dans les cardiomyocytes Nestine⁽⁺⁾
- n=5 préparations indépendantes de CVRNs

Comme déjà montré dans nos études précédentes, une population significative de CVRNs qui rentrent dans la phase S du cycle cellulaire (comme illustré par l'incorporation de BrdU à la suite du co-traitement des CVRNs par PDBu/SB203580 (Figure 21), est associée avec une expression de novo de la protéine filamenteuse intermédiaire Nestine (Figures 21 et 22). Dans la figure 21, les CVRNs immunoréactifs à la troponine-T et à Nestine en même temps, et qui incorporent aussi le BrdU sont présentés par une flèche. En revanche, des analyses supplémentaires ont montré que l'incorporation de BrdU et l'expression de PHH3 nucléaire a été aussi associée aux CVRNs immunoréactifs à la troponine-T uniquement et qui manquent l'expression de novo de Nestine. Dans la figure 21, les CVRNs immunoréactifs à la troponine-T et qui manquent l'expression de Nestine sont indiqués par la pointe de flèche. Ensemble, ces données montrent que parmi l'ensemble de cardiomyocytes ventriculaires ayant incorporé le BrdU, environ 69 % étaient associées à une expression de novo de Nestine, tandis que la sous-population restante d'environ 31

%, qui réintérait le cycle cellulaire, ne présentait pas d'expression de la protéine filamenteuse intermédiaire.

Une analyse quantitative des données d'immunofluorescence est représentée dans la figure 22 suivante.

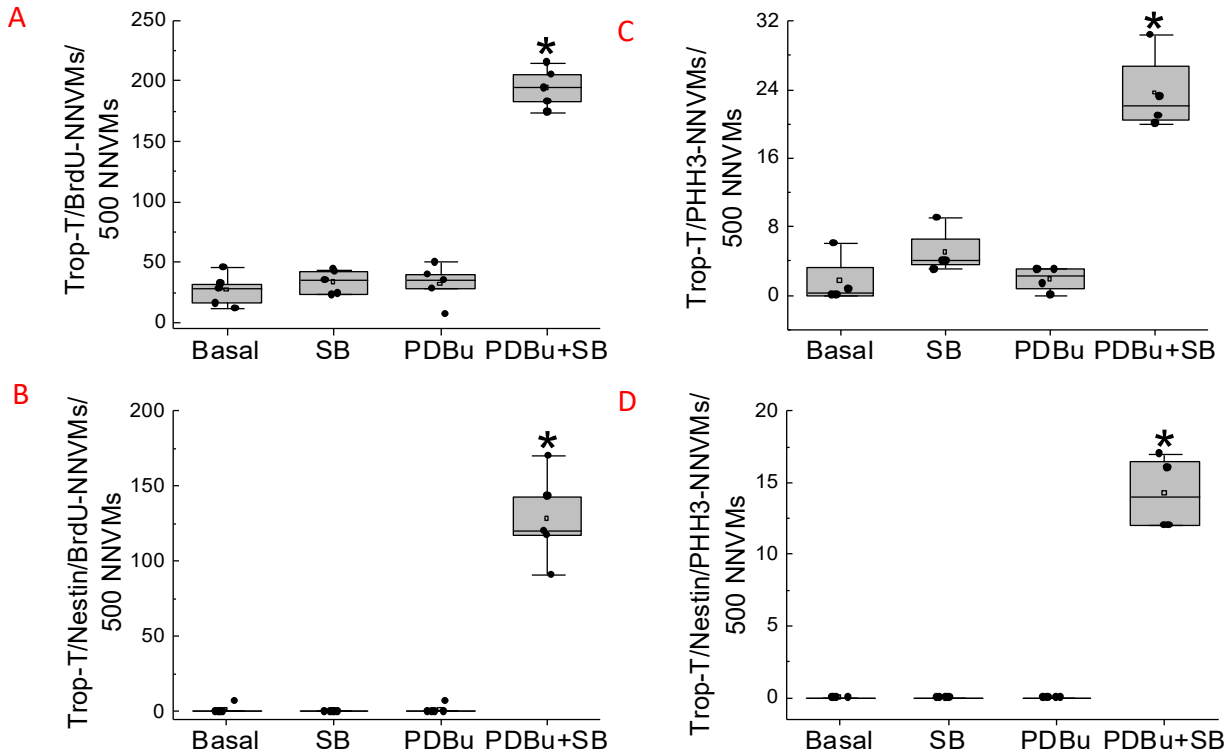


Figure 2222: Graphiques qui montrent l'intercalation de la BrdU et de la PHH3 dans un total de 500 cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés marqués à la troponine T et traités pendant 3 jours consécutifs

Les traitements sont SB seul, PDBu seul et un co-traitement de SB + PDBu.

(A) montre l'intercalation de BrdU dans les cardiomyocytes totaux. (B) montre l'intercalation de BrdU dans les cardiomyocytes ventriculaires Nestine⁽⁺⁾. (C) montre l'expression de PHH3 dans les cardiomyocytes totaux. (D) montre l'expression de PHH3 dans les cardiomyocytes ventriculaires Nestine⁽⁺⁾.

Les traitements : PDBu (Phorbol 12,13 dibutyrate ; 100 nM), SB203580 (SB ; 10 uM) et PDBu + SB203580

légende : n=4-5 pour chaque expérience; (*) signifie un P<0.01 par rapport au basal, SB et PDBu.

Les données ayant été normalisées sur 500 cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés âgés d'un jour, traités pendant 3 jours consécutifs et marqués à la troponine-T.

La rentrée dans la phase S du cycle cellulaire ne correspond pas à la mitose et à la division cellulaire ultérieure. Pour cela nous avons examiné l'expression nucléaire du marqueur de la phase G2-M, le PHH3, pour confirmer que les CVRNs co-traités par PDBu/SB203580 subissent la division cellulaire.

Tout comme pour le BrdU, l'état basal et le traitement des CVRNs par du SB203580 seul pour 3 jours consécutifs sont associés avec une faible densité de marquage par le PHH3 nucléaire.

De plus, le traitement des CVRNs par PDBu (100 nM) seul pour une période de 3 jours consécutifs, n'induit pas une augmentation de la densité des cardiomyocytes qui expriment le PHH3 nucléaire, comparé aux CVRNs basales non traités (Figure 20 C). Cependant, le co-traitement des CVRNs par SB203580 (10 µM), suivi par PDBu (100 nM), engendre une augmentation significative de l'expression de PHH3 dans les noyaux des cardiomyocytes qui sont immunoréactifs à la troponine-T (Figure 20 C).

Aussi, comme observé avec la rentrée dans la phase S du cycle cellulaire, le marquage avec PHH3 a été identifié dans les CVRNs qui expriment Nestine et aussi dans les CVRNs qui manquent l'expression de Nestine. Des analyses supplémentaires ont montré que 64% des CVRNs immunoréactifs à Nestine/troponine-T rentrent dans la phase G2-M du cycle cellulaire alors que 36% des CVRNs immunoréactifs à la troponine-T et qui manquent l'expression de Nestine sont associés avec un marquage de PHH3 nucléaire.

Ensembles, ces données montrent que le cœur des rats nouveau-nés âgés d'un jour contient deux sous-populations distinctes de cardiomyocytes ventriculaires qui peuvent réentrer dans le cycle cellulaire *in vitro* à la suite du co-traitement par PDBu/SB203580 et ces deux sous-populations peuvent être distinguées par l'absence ou la présence de l'expression de novo de Nestine.

Ensemble, ces résultats permettent de suggérer que la rentrée dans le cycle cellulaire des 2 sous-populations distinctes de CVRNs peut être médiée par des isoformes distinctes de PKC. Ainsi, pour examiner cette hypothèse, on emploie une approche pharmacologique.

PDBu recrute les isoformes conventionnelles et nouvelles de PKC dans les CVRN et PKC- α joue un rôle dans l'expression de novo de Nestine

Pour étudier le recrutement et l'activation des isoformes de PKC, on effectue une expérimentation de western-blot qui nous fournit une estimation protéique semi-quantitative des CVRN qui ont subi les traitements suivants pour 3 jours consécutifs. Les résultats sont présentés dans les figures 23 et 24 suivantes.

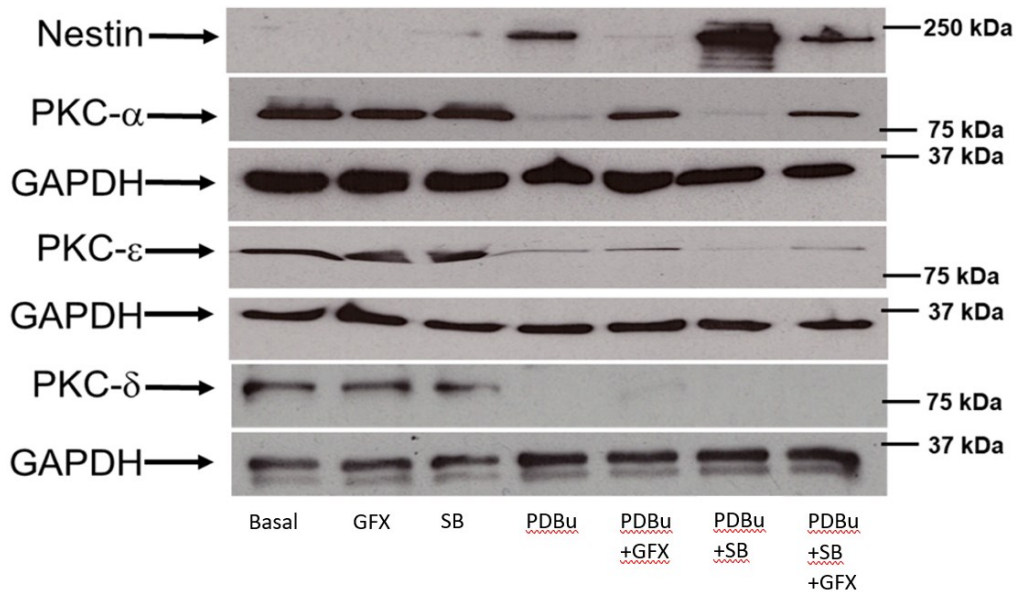


Figure 2323: Expression protéique de Nestine et des isoformes de PKC dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveaux âgés de 1 jour et traités pendant 3 jours consécutifs : une analyse semi-quantitative par Western Blot

(n=4 préparations indépendantes de CVRN)

Traitements: GF109203X- (GFX ; 1 μ M) ; SB203580 (SB ; 10 μ M) ; Prorbol 12,13-dibutyrate (PDBu ; 10⁻⁷ M) ; PDBu+GFX ; PDBu+SB ; PDBu+SB+GFX

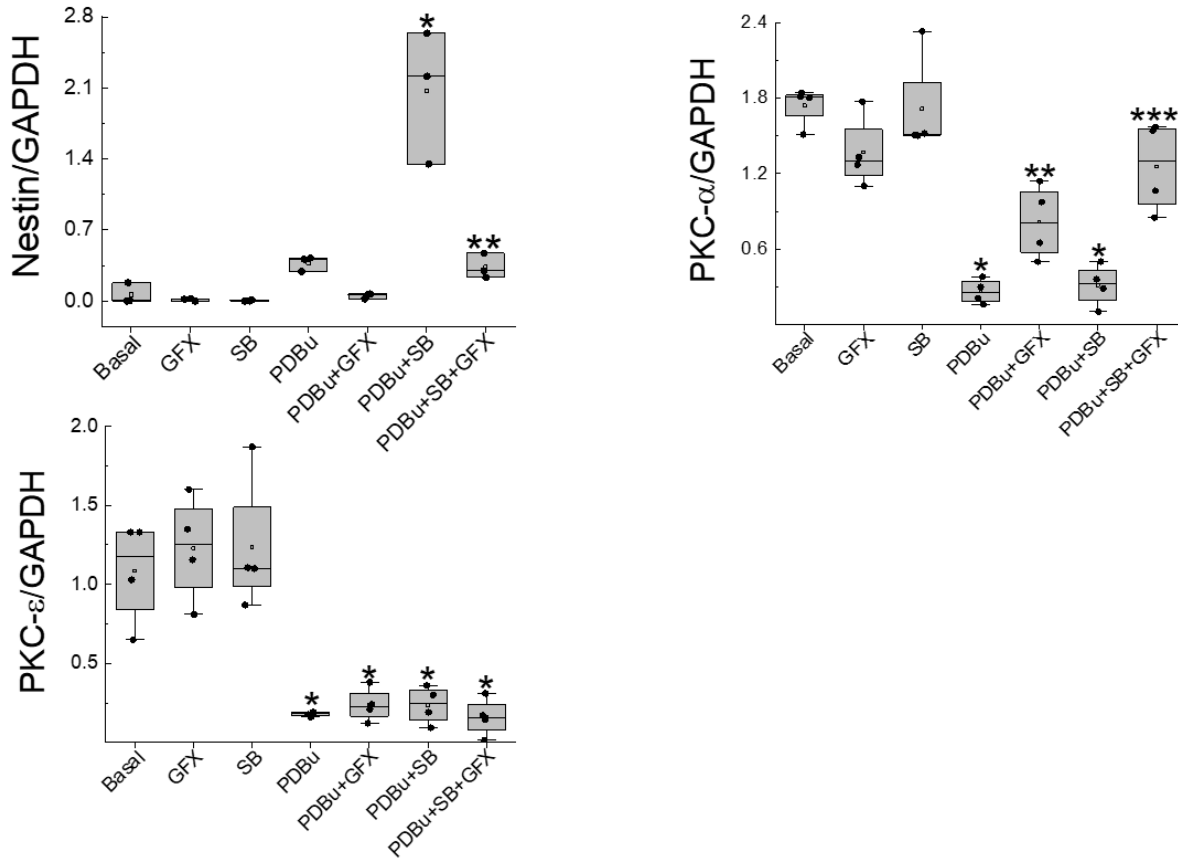


Figure 2424: Analyse semi-quantitative des résultats du western-blot précédent (figure 23)

(n=4 préparations indépendantes de CVRN). (*) signifie $P < 0.01$ versus basal, CVRN traité par SBet/ou PDBu, (**) signifie $P < 0.01$ versus CVRN traité par PDBu et (***) signifie $P < 0.01$ versus CVRN traité par PDBu/SB

Les études précédentes ont montré que le traitement aigu des cellules avec des esters de phorbol recrute à la fois des isoformes conventionnelles et nouvelles de la PKC, qui à leur tour initient un rôle biologique. Cependant, l'exposition chronique aux esters de phorbol entraînera une diminution de l'expression protéique des isoformes conventionnelles et nouvelles de la PKC¹⁰⁷. En se basant sur ces données publiées, la diminution de l'expression protéique d'une isoforme de PKC à la suite d'une stimulation par un ester de phorbol indique directement le recrutement de cette isoforme.

Dans les expériences d'immunofluorescence, le marquage à la troponine-T permet l'identification sans équivoque d'un cardiomyocyte ventriculaire. Cependant, dans chaque préparation de cellules ventriculaires isolées d'un cœur de rat nouveau-né âgé d'un jour, une modeste population (10-15 %) de fibroblastes ventriculaires persiste et ne peut pas être éliminée. Par conséquent, malgré la

présence modeste de fibroblastes ventriculaires, les changements dans le Western blot reflètent les changements dans la population prédominante de cardiomyocytes ventriculaires.

Le traitement chronique des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés âgés d'un jour pendant 72 heures avec du PDBu (100 nM) se traduit par un recrutement des isoformes de PKC caractérisé par la perte d'expression des protéines de l'isoforme conventionnelle PKC- α et des isoformes nouvelles de PKC (PKC- ϵ et PKC- δ) (Figure 23-24). Ces données ont été confirmées dans une étude antérieure par immunofluorescence, car le signal cytoplasmique intense prédominant de PKC- α et PKC- ϵ des CVRNs troponine-T⁽⁺⁾-non traités a été nettement réduit après un traitement de 72 heures avec PDBu (100 nM) ¹⁰⁷. De plus, le traitement par le PDBu seul a entraîné une augmentation significative de l'expression de la protéine filamenteuse intermédiaire Nestine, et cette réponse a été attribuée à la co-présence de fibroblastes ventriculaires. Une étude antérieure de notre laboratoire a rapporté que le traitement par le PDBu des fibroblastes ventriculaires de premier passage de rats nouveau-nés induisait l'expression de Nestine en l'absence d'inhibition de p38 MAPK. De plus, nous avons également rapporté que le traitement des CVRNs par PDBu seul n'induisait pas l'expression de novo de Nestine. Ainsi, l'augmentation des niveaux protéiques de Nestine à la suite du traitement des cellules ventriculaires isolées du cœur de rat nouveau-né d'un jour par le PDBU seul a été attribuée à la modeste population de fibroblastes ¹⁰⁸.

La diminution de l'expression protéique des isoformes de PKC (PKC- α , PKC- ϵ et PKC- δ) observée à la suite d'un traitement de 72 heures des CVRNs par PDBu a persisté en présence de SB203580 (Figure 23-24).

Cependant, le co-traitement des CVRNs par PDBu/SB203580 a conduit à une augmentation significative de l'expression protéique de Nestine (Figure 23-24), et les données d'immunofluorescence soutiennent l'hypothèse que cette réponse ultérieure était attribuée exclusivement à l'expression de novo de la protéine filamenteuse intermédiaire dans les cardiomyocytes ventriculaires.

Pour identifier l'isoforme de PKC impliquée dans l'expression de novo de Nestine dans les CVRNs, nous avons utilisé une approche pharmacologique. Une étude antérieure de notre laboratoire a

rapporté que l'inhibition sélective de l'isoforme conventionnelle PKC- α par le GF109203X dans les fibroblastes ventriculaires de premier passage de rats nouveau-nés, supprimait l'expression de Nestine en réponse au PDBu. Ces données suggèrent indirectement que la PKC- α pourrait également induire l'expression de novo de Nestine dans les CVRNs en présence de SB203580. Le traitement de 3 jours des cellules ventriculaires avec le GF109203X (GFX ; 1 μ M) a inhibé l'expression de Nestine en réponse au PDBu seul et a simultanément augmenté l'expression protéique de PKC- α . Ces données sont cohérentes avec notre étude précédente mettant en évidence un rôle clé de la PKC- α dans l'expression de Nestine induite par PDBu dans les fibroblastes ventriculaires de rats nouveau-nés. En revanche, la diminution de l'expression protéique de PKC- ϵ et PKC- δ a persisté après le co-traitement par PDBu et GFX. Ces données confirment que le GFX atténue sélectivement le recrutement et l'activation de l'isoforme conventionnelle PKC- α . De plus, le prétraitement des cellules ventriculaires avec le GFX avant le co-traitement PDBu/SB203580 a atténué significativement l'augmentation de l'expression de Nestine par rapport aux cellules ventriculaires co-traitées par PDBu/SB203580, et la réponse est associée à une augmentation de l'expression des protéines de PKC- α . Ainsi, ces données soutiennent l'hypothèse selon laquelle PKC- α joue un rôle majeur dans l'expression de novo de Nestine dans les CVRNs en présence d'un inhibiteur de la p38 MAP kinase.

L'activation de PKC- α induit l'hypertrophie et la rentrée dans le cycle cellulaire des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés Nestine⁽⁺⁾

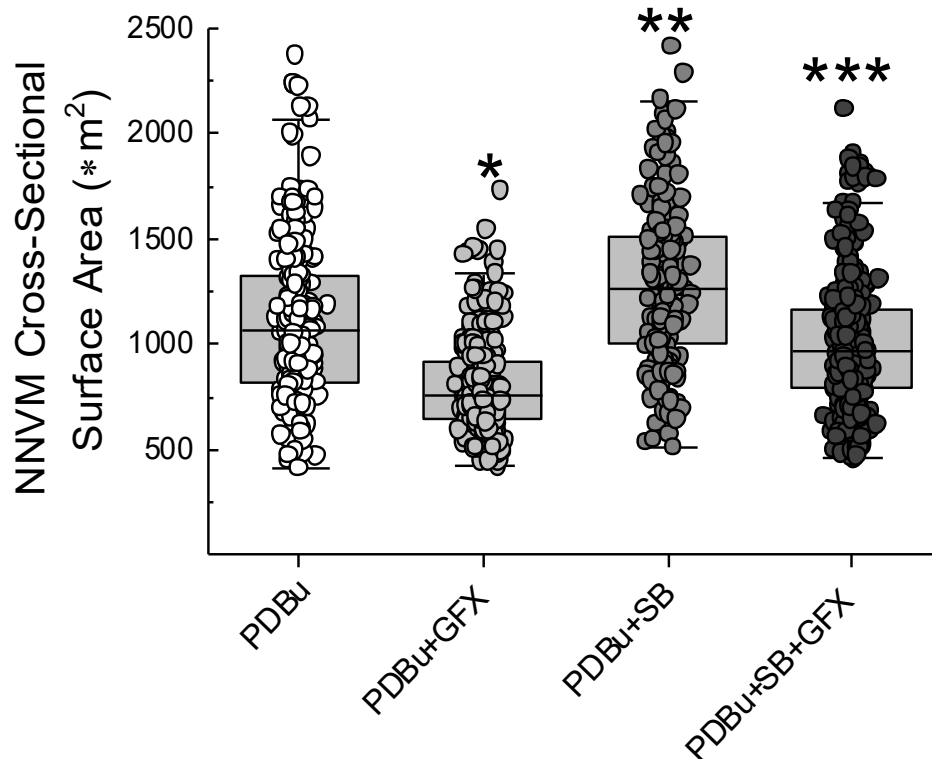


Figure 2525: Graphique qui montre la surface des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés âgés de 1 jour et traités pour 3 jours consécutifs

Traitements : Prorbol 12,13-dibutyrate (PDBu ; 10^{-7} M) ; PDBu+ GF109203X- (GFX ; $1 \mu\text{M}$) ; PDBu+ SB203580 (SB ; $10 \mu\text{M}$) ; PDBu+SB+GFX

Légende : n=170-341 cardiomyocytes ventriculaires mononucléés et n=5 préparations indépendantes ;
 (*) signifie un P<0.01 par rapport au PDBu, (**) signifie un P<0.01 par rapport au PDBu+GFX ;
 (***) signifie un P<0.01 par rapport au PDBu+SB

Les études précédentes ont montré que PKC- α induit une réponse hypertrophique des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés. En accord avec ces données, l'augmentation médiée par le PDBu de la surface cellulaire des CVRNs a été significativement atténuée à la suite du traitement par le GFX ($1 \mu\text{M}$) (Figure 25). De plus, l'effet inhibiteur de GFX sur la réponse hypertrophique médiée par PDBu a persisté à la suite du co-traitement par SB203580 (Figure 25).

Ainsi, ces données réaffirment davantage l'efficacité pharmacologique du GFX dans le ciblage de l'action hypertrophique de la PKC- α dans les cardiomyocytes ventriculaires.

En cas d'inhibition de p38 MAPK, PKC- α induit l'expression de novo de Nestine et la réentrée dans le cycle cellulaire des CVRNs

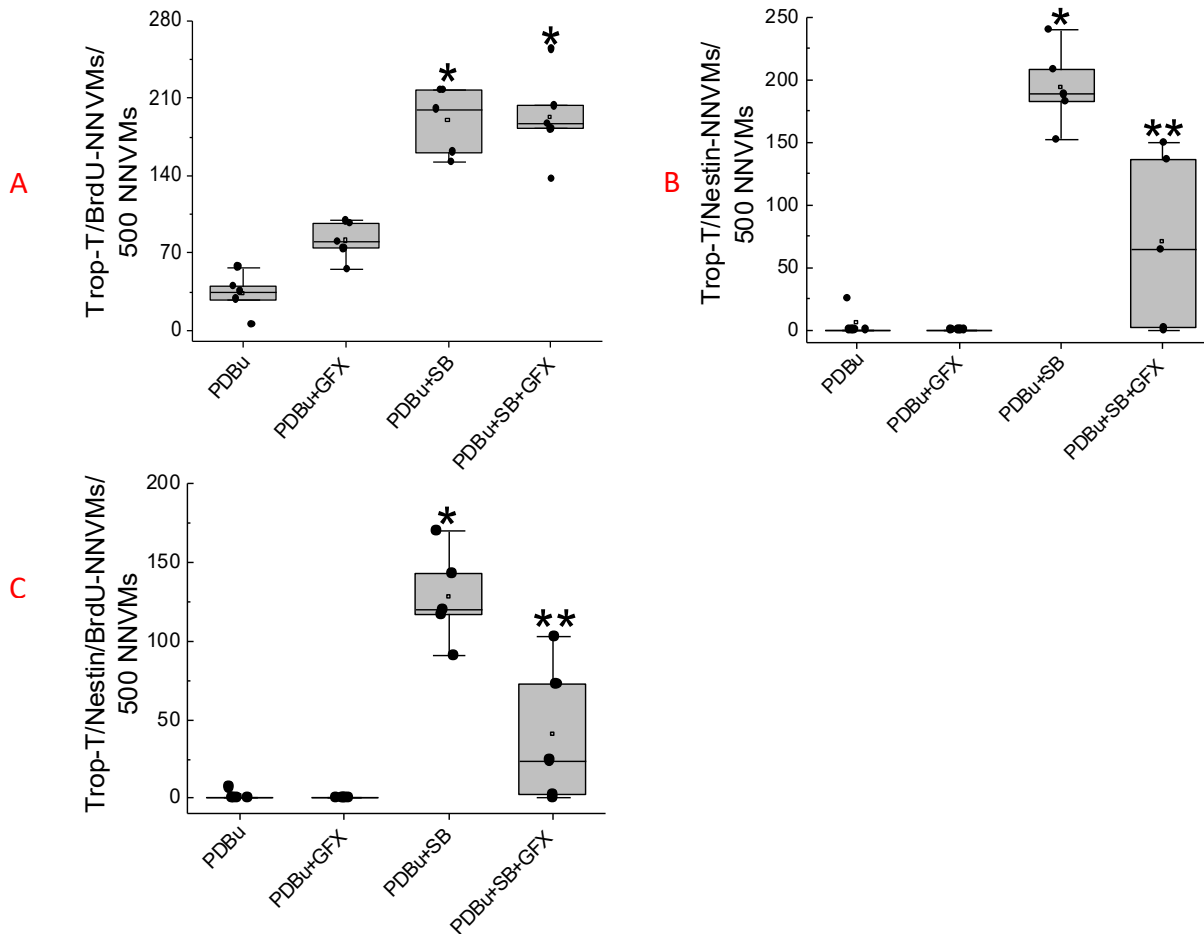


Figure 2626: Analyse semi-quantitative des résultats d'immunofluorescence montrant l'intercalation de BrdU et l'expression de Nestine dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés traités pour 3 jours consécutifs et marqués à la Troponine-T

Traitements : Prorbol 12,13-dibutyrate (PDBu ; 10^{-7} M) ; PDBu+ GF109203X- (GFX ; $1 \mu\text{M}$) ; PDBu+; SB203580 (SB ; $10 \mu\text{M}$) ; PDBu+SB+GFX

Légende : n=5 préparations indépendantes ; (*) signifie $P < 0.01$ par rapport à PDBu et (**) signifie $P < 0.01$ par rapport à PDBu+SB

Malgré l'atténuation de la réponse hypertrophique, le traitement des CVRNs, marqués à la troponine-T, par GFX pendant 3 jours n'a pas influencé de manière significative l'incorporation de BrdU médiée par le PDBu (Figure 26A). Comme précédemment démontré, le co-traitement par PDBu et SB203580 pendant 3 jours a significativement augmenté la densité des CVRNs immunoréactifs à la troponine-T qui ont incorporé le BrdU (Figure 26A). De plus, l'augmentation significative de la densité des CVRNs incorporant le BrdU en réponse au co-traitement PDBu/SB203580 n'a pas été affectée par le GFX (Figure 26A). Cependant, le traitement par GFX a significativement atténué la densité des CVRNs montrant une expression de novo de Nestine (Figure 26 B) et la densité incorporant le BrdU à la suite du co-traitement PDBu/SB203580 (Figure 26 C) par rapport au co-traitement PDBu/SB203580. Ces données révèlent qu'en plus d'induire une réponse hypertrophique, la PKC- α joue un rôle clé dans l'induction de l'expression de novo de Nestine et la réentrée subséquente dans le cycle cellulaire des CVRNs en réponse au co-traitement PDBu/SB203580. De plus, la réentrée soutenue dans le cycle cellulaire des CVRNs à la suite du co-traitement PDBu/SB203580/GFX a été attribuée à l'augmentation de la densité de la sous-population des CVRNs qui n'expriment pas Nestine. Ainsi, il semble que les isoformes nouvelles de PKC, PKC- ϵ et/ou PKC- δ , jouent un rôle clé dans l'induction de la réentrée dans le cycle cellulaire de la sous-population des CVRNs qui ne présente pas une expression de novo de Nestine. De plus, l'augmentation de la densité des CVRNs sans expression de Nestine qui sont réentrées dans le cycle cellulaire à la suite du co-traitement PDBu/SB203580/GFX suggère que la PKC- α pourrait exercer en partie un effet suppressif sur l'action biologique des isoformes nouvelles de PKC.

PKC- α induit, en présence d'inhibition de p38 MAPK, une diminution de l'expression des ARNm des gènes répresseurs du cycle cellulaire et une augmentation de l'expression des ARNm des gènes activateurs du cycle cellulaire dans les CVRNs

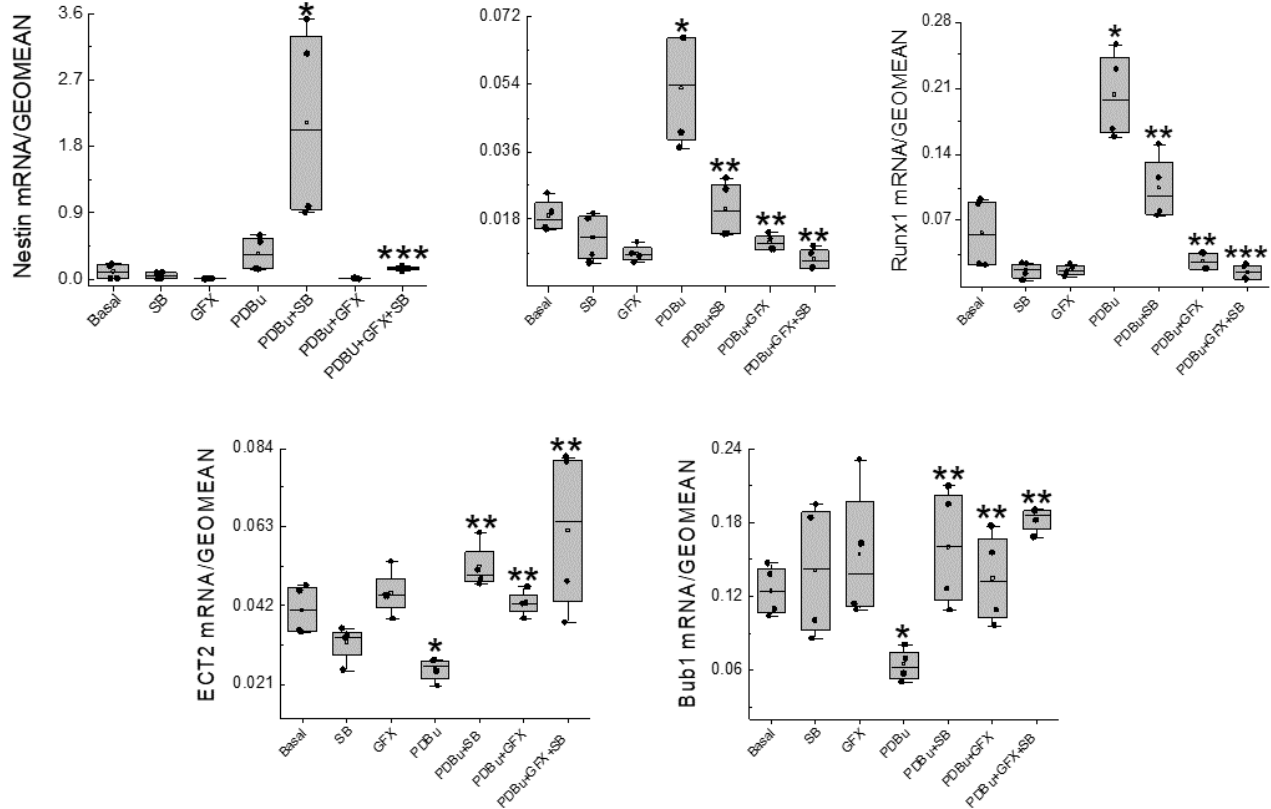


Figure 2727 : Analyse semi-quantitative de l'expression génétique (ARNm) de Nestine, CDKN2a, Runx1, ECT2 et Bub1, gènes impliqués dans la rentrée dans le cycle cellulaire, par rapport à la moyenne géométrique des gènes de référence GAPDH et HPRT1

Traitements : SB203580 (SB ; 10 μ M) ; GF109203X- (GFX ; 1 μ M) ; Prorbol 12,13-dibutyrate (PDBu ; 10⁻⁷ M) ; PDBu+SB ; PDBu+GFX ; PDBu+SB+GFX

Légende : (n=4 préparations indépendantes de CVRNs) (*) signifie P<0.01 versus CVRNs non traités, (**) signifie P<0.01 versus les CVRNs traités par PDBu et (***) signifie P<0.01 versus les CVRNs traités par PDBu/SB.

mRNA : ARN messenger ; GEOMEAN : moyenne géométrique ; CDKN2A : cyclin-dépendent kinase inhibitor 2A ; Runx1 : Runt-related transcription factor 1 ; ECT2 : Epithelial Cell Transforming 2 ; et Bub1 : budding uninhibited by benzimidazoles 1 ; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase ; HPRT1 : Hypoxanthine Phosphoribosyltransférase 1

L'expression de l'ARNm de la protéine filamenteuse Nestine établie à la suite de l'extraction de l'ARN des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés traités pour 3 jours (Figure 27) est conforme à l'expression protéique établie à la suite d'une expérimentation de Western-blot sur la

même population cellulaire dans les mêmes conditions de traitement (figure 27). Ainsi, le niveau d'expression de l'ARNm de Nestine augmente significativement à la suite du traitement pour 3 jours consécutifs par PDBu et SB203580 (Figure 27). Ces résultats sont aussi conformes avec l'expression de novo de Nestine dans les CVRNs et la réentrée dans le cycle cellulaire à la suite d'un co-traitement par PDBu/SB203580 qui dure pour 3 jours.

Il a été démontré que le suppresseur de tumeur CDKN2a est impliqué dans la sénescence cellulaire et inhibe le cycle cellulaire alors que Runx1 inhibe la progression de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire ^{109, 98}. Dans cette étude, le traitement des CVRNs par PDBu seul pour 3 jours consécutifs augmente significativement le niveau d'expression de l'ARNm des gènes CDKN2a et Runx1 (Figure 27). En parallèle, le traitement des CVRNs pour 3 jours consécutifs par PDBu diminue significativement le niveau d'expression de l'ARNm des gènes ECT2 et Bub1 (Figure 27). En effet, le gène ECT2 qui est un facteur échangeur de guanine, induit la mitose cellulaire¹¹⁰. Le Bub1 est impliqué dans l'alignement des chromosomes durant la mitose ¹¹¹.

Ce patron, au niveau de l'expression des ARNm des gènes, est conformément aligné avec l'absence d'une augmentation de la densité des CVRNs qui rentrent dans le cycle cellulaire après trois jours de traitement par PDBu (Figure 22A and 22B).

Par contre, le co-traitement des CVRNs par PDBu et SB203580 pour 3 jours consécutifs, réduit significativement l'augmentation de l'expression de l'ARNm des gènes CDKN2a et Runx1 et réprime la diminution du niveau d'expression de l'ARNm des gènes ECT2 et Bub1 (Figure 27).

Ainsi, la signature moléculaire associée au traitement PDBu/SB203580 est cohérente avec la réentrée dans le cycle cellulaire des CVRNs associée à l'expression de novo de Nestine.

Pour étudier l'effet de l'implication de l'isoforme α de la protéine kinase C dans l'expression des gènes du cycle cellulaire, on utilise le GFX, un inhibiteur de cette isoforme. Le co-traitement des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés par le GFX a diminué l'expression de l'ARNm de Nestine, CDKN2a et Runx1 induite par le PDBu, et a augmenté l'expression de l'ARNm d'ECT2 et Bub1. De plus, le schéma d'expression génique dans les CVRNs à la suite du co-traitement avec le GFX et le SB203580 en présence de PDBu était identique à chaque inhibiteur seul dans l'inversion de l'effet du PDBu seul (Figure 27). Collectivement, le schéma des ARNm observé dans cette série d'expériences réaffirme davantage l'hypothèse selon laquelle l'isoforme α

de la PKC joue un rôle clé dans l'induction de l'expression de Nestine et la réentrée dans le cycle cellulaire des CVRNs associée à l'expression de novo de la protéine filamenteuse intermédiaire. De plus, la réentrée persistante dans le cycle cellulaire des CVRNs qui n'expriment pas Nestine (Figure 22 A-C) et le profil d'expression d'ARNm associé à la suite du co-traitement par PDBu/SB203580/GFX étaient identiques au profil d'expression d'ARNm observé avec PDBu/SB203580 seul (Figure 27). Ainsi, ces données suggèrent que la réentrée du cycle cellulaire des CVRNs qui expriment de novo Nestine ou qui ne présentent pas d'expression de Nestine partagent le même profil d'expression d'ARNm pendant la réentrée du cycle cellulaire.

L'activation de PKC et l'inhibition de la p38 α / β MAPK dans les CVRNs induit l'augmentation de l'expression d'ARNm des cytokines inflammatoires

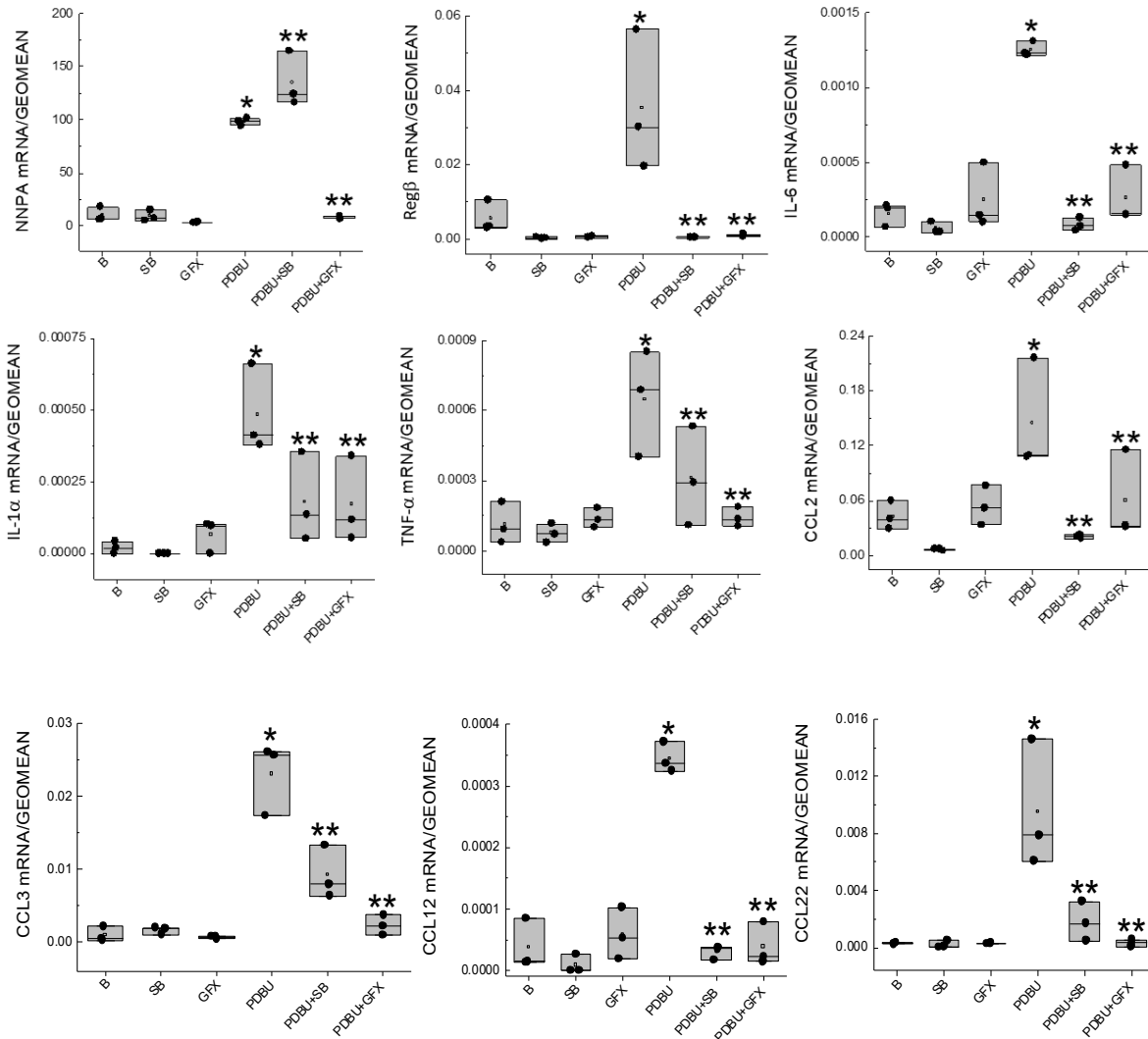


Figure 2828: Expression de l'ARNm normalisée par rapport à la moyenne géométrique de HPRT1 et GAPDH de quelques cytokines inflammatoires dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés soumis à différents traitements pour 3 jours consécutifs

Traitements : SB203580 (SB ; 10 μ M) ; GF109203X- (GFX ; 1 μ M) ; Prorbol 12,13-dibutyrate (PDBu ; 10⁻⁷ M) ; PDBu+SB ; PDBu+GFX ; PDBu+SB+GFX

Légende : n= 3 préparations indépendantes pour chaque ; (*) signifie P<0.01 par rapport à Basal, SB et GFX, et (**) signifie P<0.05 par rapport à PDBu

mRNA : ARN messager ; GEOMEAN : moyenne géométrique ; NPPA : gène qui code pour le ANP (Atrial natriuretic peptide) ; Reg3-b : Regenerating islet-derived protein 3 beta ; IL-6 : interleukin 6 ; IL-1-a : Interleukin 1 alpha ; TNF- α : Tumour necrosis factor ; CCL2 : chemokine (C-C motif) ligand 2 ; CCL3 :

chemokine (C-C motif) ligand 3 ; CCL12 : chemokine (C-C motif) ligand 12 ; CCL22 : chemokine (C-C motif) ligand 22.

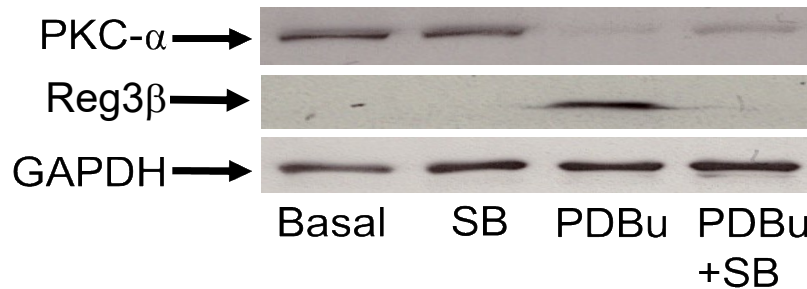


Figure 2929: Figure qui montre les bandes de Reg3-β et PKC-α obtenues par western blot par rapport au gène de référence GAPDH

Traitements : SB203580 (SB ; 10 μ M) ; Prorbol 12,13-dibutyrate (PDBu ; 10⁻⁷ M) ; PDBu+SB

Légende : n=3 préparations indépendantes ; Reg3-β : Regenerating islet-derived protein 3 beta ; GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase ; PKC-α : Protéine kinase C - alpha

Les dommages ischémiques au niveau du cœur des mammifères adultes sont associés à une réponse inflammatoire robuste initiée par l'infiltration de macrophages et de neutrophiles. Les cardiomyocytes nécrotiques/apoptotiques dans le cœur endommagé par l'ischémie représentent également une source supplémentaire de cytokines inflammatoires, tout comme les cardiomyocytes hypertrophiques résidant près de la région endommagée^{20,38,112}. De plus, le recrutement et l'activation de p38 MAPK via la libération locale de cytokines inflammatoires après les dommages ischémiques peut jouer un rôle clé dans la suppression de la réentrée dans le cycle cellulaire de la modeste population de cardiomyocytes mononucléés identifiés dans le cœur des mammifères adultes. Par conséquent, les expériences suivantes ont testé l'hypothèse selon laquelle les CVRNs représentent une source cardiaque importante de cytokines inflammatoires et que leur expression peut dépendre de la signalisation de p38 MAPK.

Comme le montrent les figures 20 et 25, le traitement des CVRNs par PDBu pendant 3 jours a augmenté leur surface cellulaire. Conformément à ces données, l'expression de l'ARNm de NPPA (Natriuretic Peptide A) ; un marqueur d'hypertrophie cardiaque, a été significativement élevée¹¹³ (Figure 28). En parallèle, la réponse hypertrophique médiée par PDBu était associée à l'augmentation significative de l'expression d'ARNm d'un panel de cytokines inflammatoires

(Reg3 β , IL-6, TNF- α , IL-1 α , CCL2, CCL12, CCL3 et CCL22) et l'expression de la protéine Reg3 β était également augmentée (Figure 28 et 29). À la suite du co-traitement des CVRN pendant une période de trois jours par PDBu et SB203580, les niveaux d'expression d'ARNm de NPPA étaient encore augmentés, tandis que le niveau d'expression d'ARNm accrue d'un panel de cytokines inflammatoires était significativement atténué en présence de l'inhibiteur de p38 MAPK (Figure 28). De plus, SB203580 a inhibé l'augmentation d'expression de la protéine Reg3 β médiée par PDBu dans les CVRN (Figure 28 et 29). Enfin, le traitement des CVRN par le GFX a également significativement atténué l'augmentation de l'expression d'un panel de cytokines inflammatoires médiée par PDBu, soutenant ainsi un rôle clé de l'isoforme PKC- α (Figure 28).

Discussion

Le cœur adulte est considéré comme un organe incapable de se régénérer, et la perte de cardiomyocytes ventriculaires à la suite d'un infarctus du myocarde ne peut être remplacée. Cependant, la croissance du cœur embryonnaire est attribuée exclusivement à la réentrée dans le cycle cellulaire et à la division cellulaire subséquente des cardiomyocytes ventriculaires mononucléés préexistants.

En se basant sur des données précédentes, plusieurs études ont révélé que le cœur des mammifères adultes contient également une modeste population de cardiomyocytes ventriculaires mononucléés identifiés exclusivement dans la région péri-infarctée à la suite des dommages ischémiques ¹⁰. De plus, les travaux du laboratoire du Dr Calderone ont également identifié une modeste population de cardiomyocytes ventriculaires mononucléés dans le cœur ischémique du rat, de la souris et de l'homme qui exprimait la protéine filamenteuse intermédiaire Nestine. Cependant, la modeste population de cardiomyocytes ventriculaires mononucléés exprimant Nestine dans le cœur ischémique du rongeur était incapable de réintégrer le cycle cellulaire ¹⁰⁸. Malgré ces données, l'expression de Nestine dans les cellules normales (par exemple, les fibroblastes, les cellules endothéliales) et diverses tumeurs (mélanome et cancer hépatique ^{114,115}) a été suggéré pour favoriser en partie la réentrée dans le cycle cellulaire et la division cellulaire ultérieure. En accord avec un rôle potentiel dans la réentrée dans le cycle cellulaire, l'expression de Nestine a également été identifiée dans les cardiomyocytes ventriculaires mononucléés proliférants du cœur embryonnaire de la souris et dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats embryonnaires en culture ⁸⁶. Dans l'ensemble, ces données soutiennent l'hypothèse selon laquelle la réexpression de Nestine dans les cardiomyocytes ventriculaires mononucléés adultes du cœur mammifère adulte à la suite des dommages ischémiques reproduit un phénotype embryonnaire et peut favoriser la réentrée dans le cycle cellulaire. Cependant, l'isolement d'une modeste population de cardiomyocytes ventriculaires mononucléés exprimant Nestine pour mieux comprendre le rôle biologique et les voies de signalisation impliquées dans l'expression de la protéine filamenteuse intermédiaire n'était pas réalisable. Ainsi, pour contourner ce dernier problème, nous avons utilisé le rat nouveau-né parce que le cœur d'un jour contient principalement des cardiomyocytes ventriculaires mononucléés ayant la capacité de réintégrer le cycle cellulaire. De plus, après la

résection de l'apex du cœur de rat nouveau-né d'un jour, l'apparition de cardiomyocytes ventriculaires réintégrant le cycle cellulaire a été observée, avec une concomitante expression de novo de Nestine. À cet égard, nous pouvons utiliser des cardiomyocytes ventriculaires mononucléés de rats nouveau-nés comme modèle in vitro pour évaluer les voies de signalisation associées à l'expression de Nestine et le rôle biologique ultérieur de la protéine filamenteuse intermédiaire dans la réentrée dans le cycle cellulaire. La raison principale des expériences faites est l'espoir éventuel d'identifier une approche pharmacologique induisant l'expression de Nestine et la réentrée dans le cycle cellulaire des cardiomyocytes ventriculaires mononucléés de rats nouveau-nés. Ensuite, nous pourrions potentiellement exploiter les résultats pour initier la réentrée dans le cycle cellulaire de la modeste population de cardiomyocytes ventriculaires mononucléés exprimant Nestine dans le cœur endommagé par l'ischémie pour initier au moins une réponse régénérative cardiaque partielle.

En résumé, les études antérieures menées par le laboratoire du Dr Calderone ont révélé qu'une faible proportion de cardiomyocytes ventriculaires mononucléés de rats nouveau-nés âgés d'un jour réintègrent le cycle cellulaire en l'absence de stimulus, et que la protéine filamenteuse intermédiaire Nestine n'était pas exprimée. Cependant, l'inhibition pharmacologique de la sérine/thréonine kinase p38 MAPK par SB203580 à la suite du recrutement de la famille de PKC médié par l'ester de phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) dans les cardiomyocytes ventriculaires mononucléés de rat nouveau-né âgés d'un jour, a conduit à la réentrée dans le cycle cellulaire et à l'expression de novo de la protéine filamenteuse intermédiaire Nestine. L'infection des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés par le virus AAV9 contenant un shARN ciblant Nestine a supprimé l'expression de Nestine et a inhibé en même temps la réentrée dans le cycle cellulaire en réponse à PDBu/SB203580. Un paradigme similaire a été observé dans les cardiomyocytes ventriculaires embryonnaires de rats exprimant Nestine, car la déplétion de la protéine filamenteuse intermédiaire par AAV9-shARN a également inhibé la réentrée dans le cycle cellulaire⁸⁹. Ainsi, ces données soutiennent un rôle central Nestine dans la réentrée dans le cycle cellulaire des cardiomyocytes ventriculaires mononucléés nouveau-nés et embryonnaires, bien que les voies de signalisation couplant la protéine filamenteuse intermédiaire à la prolifération restent actuellement indéfinies. Par conséquent, l'objectif principal de ce mémoire était d'approfondir les données mentionnées et d'élucider le profil des transcrits et l'identité de l'isoforme de la protéine

kinase C conduisant à la réentrée dans le cycle cellulaire et à l'expression de novo de Nestine à la suite du co-traitement PDBu/SB203580 des cardiomyocytes ventriculaires mononucléés de rats nouveau-nés. De plus, le rôle biologique de la p38 α/β MAPK n'est pas limité au cycle cellulaire, car la sérine/thréonine kinase est impliquée dans l'expression des cytokines inflammatoires dans de nombreux types de cellules, y compris les cardiomyocytes ventriculaires. Par la suite, des expériences supplémentaires ont examiné si l'inhibition de la réentrée dans le cycle cellulaire des CVRNs médiée par la p38 α/β MAPK induit également l'expression d'ARNm d'un panel de cytokines/chimiokines inflammatoires.

Comme précédemment rapporté, le traitement des CVRNs âgés d'un jour pendant trois jours consécutifs par le PDBu et le SB203580 a conduit à une expression de novo de Nestine et à la réentrée dans les phases S et G2-M du cycle cellulaire, mettant en évidence la division cellulaire. Cependant, une analyse plus avancée des données a révélé qu'une population modeste (36 %) de CVRNs qui sont réentrés à la fois dans les phases S et G2-M du cycle cellulaire en réponse au co-traitement PDBu/SB203580, n'exprime pas de novo la protéine Nestine. À notre connaissance, ces données sont les premières à mettre en évidence la présence de deux sous-populations distinctes (distinguées par l'absence ou l'expression de novo de Nestine) des cardiomyocytes ventriculaires résidant dans le cœur des rats nouveau-nés qui possèdent la capacité inhérente de réentrer dans le cycle cellulaire *in vitro* à la suite d'un co-traitement PDBu/SB203580. En partie conforme avec nos données sur le cœur de rat nouveau-né, l'étude de Cui et de ses collègues ¹¹⁶ a identifié cinq sous-populations distinctes de cardiomyocytes dans le cœur de souris nouveau-nées. Une sous-population de cardiomyocytes ventriculaires désignée par CM4 est entrée de manière préférentielle dans le cycle cellulaire après une lésion cardiaque et a simultanément exprimé Nestine. Une deuxième population de cardiomyocytes ventriculaires désignée par CM2 a exprimé un panel de gènes impliqués dans la prolifération et peut également posséder la capacité de réentrer dans le cycle cellulaire. Dans l'ensemble, le cœur des souris et des rats nouveau-nés contient au moins deux sous-populations distinctes de cardiomyocytes ventriculaires capables de réentrer dans le cycle cellulaire en réponse à des stimuli spécifiques ¹¹⁷.

Les données obtenues à la suite du traitement des cellules avec l'activateur de la protéine Kinase C (le PDBu), ont incité à évaluer l'identité de l'isoforme de PKC qui est impliquée dans la rentrée dans le cycle cellulaire des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés en présence de

SB203580. Trois isoformes de PKC sont prédominantes dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés, PKC- α , PKC- ϵ et PKC- δ .

De plus, des données non publiées (article en cours de préparation, 2024) du laboratoire du Dr Calderone ont révélé que trois isoformes de PKC sont également exprimées chez le rat mâle adulte. En se basant sur des données publiées, la diminution de l'expression des isoformes conventionnelles et nouvelles de PKC après une stimulation chronique par les esters de phorbol indique directement le recrutement biologique et l'activation de chaque isoforme particulière ¹¹⁸. Ainsi, pour confirmer le recrutement de chaque isoforme de PKC dans les CVRNs, l'expression protéique a été déterminée après un traitement de trois jours consécutifs avec le PDBu seul et le PDBu/SB203580. En effet, une diminution de l'expression protéique de PKC- α , PKC- ϵ et PKC- δ a été observée à la suite du traitement par PDBu seul et après le co-traitement par PDBu/SB203580 (FIGURE 23-24) ce qui confirme leur recrutement initial et leur rôle biologique potentiel dans la réentrée des CVRNs dans le cycle cellulaire. De plus, ces données révèlent également que l'incapacité du traitement des CVRNs par SB203580 à inverser la diminution de l'expression protéique de chaque isoforme de PKC médiée par le PDBu (Figure 23) soutient l'hypothèse selon laquelle la p38 MAPK n'influence pas l'expression protéique des isoformes conventionnelles et nouvelles de PKC après une stimulation chronique par les esters de phorbol dans les CVRNs.

Une étude antérieure a rapporté que l'inhibiteur pharmacologique de l'isoforme conventionnelle de PKC, GF109203X, inhibe l'augmentation de l'expression protéique de Nestine médiée par les esters de phorbol dans les fibroblastes ventriculaires de rats nouveau-nés ¹¹⁹. Ces données suggèrent que l'isoforme conventionnelle PKC- α pourrait également jouer un rôle analogue dans la réentrée dans le cycle cellulaire et l'expression de novo de Nestine chez les CVRNs en réponse au co-traitement PDBu/SB203580. Les CVRNs traités avec GF109203X ont significativement atténué la diminution d'expression de PKC- α médiée par PDBu, tandis que les niveaux protéiques de PKC- ϵ et PKC- δ sont restés réduits et identiques à ceux observés avec le traitement par PDBu seul (Figure 23). En parallèle, GF109203X a inhibé l'augmentation de la surface des CVRNs médiée par PDBu, confirmant le rôle hypertrophique de PKC- α (Figure 25). De plus, l'ajout de GF109203X au co-traitement des CVRNs par PDBu/SB203580 a significativement atténué l'augmentation des niveaux protéiques de Nestine. Conformément à ces données, l'ajout de GF109203X au co-traitement des CVRNs par PDBu/SB203580 a atténué la densité de l'expression

de novo de Nestine et la densité concomitante qui réintègre le cycle cellulaire, comme le montre l'incorporation de BrdU (Figure 26).

Malgré la réduction significative des niveaux d'expression protéique de Nestine et la densité réduite des CVRNs Nestine⁽⁺⁾ qui réintègrent le cycle cellulaire, le co-traitement par PDBu/SB203580 et GFX a entraîné une augmentation significative de la densité des CVRNs qui réintègrent le cycle cellulaire, caractérisée par l'absence d'expression de Nestine (Figure 26).

Alors, la rentrée dans le cycle cellulaire de cette population cellulaire peut-être médiée par les deux autres isoformes de PKC, PKC- ϵ et/ou PKC- δ . (Figure 18).

Des études de notre labo ont confirmé ces résultats par utilisation de sotrastaurine qui inhibe PKC- ϵ , et PKC- δ et PKC- α ¹⁰⁸. Alors le traitement des NNVMs avec sotrastaurine et PBU/SB203580 a significativement montré une diminution de la rentrée dans le cycle cellulaire des cellules Nestine⁽⁻⁾ et aussi ceux Nestine⁽⁺⁾ ¹⁰⁸. Ainsi, ces données mettent en évidence la nouvelle découverte selon laquelle le recrutement de l'isoforme conventionnelle PKC-alpha favorise sélectivement l'expression de Nestine et la réentrée dans le cycle cellulaire des CVRNs Nestine⁽⁺⁾. En revanche, les nouvelles PKC- ϵ et/ou PKC- δ jouent un rôle déterminant dans la réentrée dans le cycle cellulaire de la deuxième distincte sous-population de CVRNs dépourvue d'expression de novo de Nestine. De plus, l'amplification de la réentrée dans le cycle cellulaire des CVRNs qui manquent l'expression de Nestine, après un co-traitement des CVRNs avec PDBu/SB203580/GFX, renforce l'hypothèse selon laquelle la signalisation de PKC- α pourrait partiellement atténuer la réentrée dans le cycle cellulaire médiée par la PKC- ϵ et/ou la PKC- δ .

Pour discerner le profil de transcription associé à la réentrée dans le cycle cellulaire des CVRNs, l'expression de deux inhibiteurs du cycle cellulaire, Runx1 et CDKN2a, a été examinée. Ces deux ont été rapportés comme inhibiteurs de la prolifération cellulaire de nombreux types de cellules, y compris les cardiomyocytes ventriculaires ^{98,109}. De plus, Runx1 a également été rapporté comme inhibiteur de la réentrée dans le cycle cellulaire des cardiomyocytes ventriculaires infarcis chez le poisson zèbre ⁹⁸. Les niveaux d'expression d'ARNm d'ECT2 et de Bub1 a également été examinée car ces deux gènes jouent un rôle crucial dans la progression de la phase G2-M dans de nombreux types cellulaires ^{108,110,111}. En réponse au traitement des CVRNs par PDBu seul, une importante

surexpression de l'ARNm de RUNX1 et CDKN2a et la concomitante sous-expression de l'ARNm d'ECT2 et Bub1 étaient cohérentes avec l'absence de réentrée dans le cycle cellulaire (Figure 26-27). En réponse au co-traitement PDBu/SB203580, l'expression de novo de Nestine observée dans les CVRNs par immunofluorescence a été confirmée par une surexpression significative des niveaux d'ARNm de Nestine (Figure 21-27). De plus, la réentrée dans le cycle cellulaire des CVRNs observée avec le co-traitement PDBu/SB203580 a significativement réduit les niveaux surexprimés d'ARNm de Runx1 et CDKN2a et inversé la sous-expression d'ARNm d'Ect2 et Bub1 (Figure 27). Ainsi, le recrutement de la p38 MAPK par PKC joue un rôle intégral dans la régulation d'un ensemble de gènes influençant la réentrée dans le cycle cellulaire et la signature moléculaire observée avec le co-traitement PDBu/SB203580 est cohérente avec la progression dans les phases S et G2-M d'au moins la sous-population de CVRNs caractérisée par l'expression de novo de Nestine. Comme indiqué, la PKC- α joue un rôle crucial dans la réentrée dans le cycle cellulaire et l'expression de novo de Nestine dans une seule sous-population de CVRNs. Pour évaluer le rôle de la PKC- α dans le profil de transcription observé avec la réentrée dans le cycle cellulaire médiée par PDBu/SB203580, les CVRNs ont été ensuite traités par GFX. L'ajout de GFX aux CVRNs traités uniquement avec PDBu a inhibé la surexpression de l'ARNm de Nestine, RUNX1 et CDKN2a (Figure 27) et inversé la sous-expression de l'ARNm de ECT2 et Bub1 (Figure 27). Cependant, comme indiqué dans les Figures 26A, B et C, le traitement des CVRNs par GFX et PDBu n'a pas induit la réentrée dans le cycle cellulaire de la sous-population de CVRNs associée à l'expression de novo Nestine ou à la sous-population qui manquait d'expression de la protéine filamenteuse intermédiaire. Ainsi, malgré la présence d'une signature moléculaire favorisant la réentrée dans le cycle cellulaire, le co-traitement PDBu/GFX n'a pas initié la progression dans la phase S du cycle cellulaire. Cependant, la signature moléculaire identique associée à la réentrée dans le cycle cellulaire des CVRNs Nestine⁽⁺⁾ et des CVRNs Nestine⁽⁻⁾ a été observée à la suite des traitements PDBu/SB203580 ou PDBu/SB203580/GFX. Ainsi, ces dernières données révèlent que l'impact biologique potentiel d'une signature moléculaire favorisant la réentrée dans le cycle cellulaire de ces deux sous-populations distinctes de CVRNs ne peut se produire qu'en présence de l'inhibition de la p38 MAPK.

Ainsi, les données présentées dans ce mémoire ont clairement révélé que le recrutement de p38 MAPK via la stimulation de la PKC supprime la réentrée dans le cycle cellulaire de deux sous-

populations distinctes de CVRNs. Cependant, le rôle biologique de p38 MAPK ne se limite pas à inhiber la réentrée dans le cycle cellulaire, car la sérine/thréonine kinase est également impliquée dans l'expression des cytokines inflammatoires (Figure 18). En effet, des études ont montré que les cytokines inflammatoires TNF- α et IL- β , sécrétées par les macrophages CCR2⁺ qui envahissent le site de l'infarctus cardiaque, inhibent la réentrée dans le cycle cellulaire des cardiomyocytes mononucléés chez la souris ²⁷. En se basant sur ces données, l'inhibition de la réentrée dans le cycle cellulaire des cardiomyocytes mononucléés médiée par p38 MAPK peut induire l'expression d'un panel de cytokines inflammatoires d'origine cardiaque. À cet égard, la synthèse et la libération des cytokines inflammatoires d'origine cardiaque, médiées par p38 MAPK, peuvent à leur tour agir de manière autocrine et représenter un mécanisme supplémentaire limitant la réentrée dans le cycle cellulaire des cardiomyocytes ventriculaires mononucléés (Figure 10). Conformément à cette prémisse, des études ont déjà montré que les cardiomyocytes ventriculaires sont une source d'expression de cytokines et de chimiokines inflammatoires ²¹. De plus, la cytokine inflammatoire TNF- α recrute l'isoforme PKC- α dans les cardiomyocytes auriculaires, entraînant un remodelage électrique anormal et une fibrillation auriculaire secondaire à la dérégulation du courant K ¹²⁰. De plus, le TNF- α et l'IL- β recrutent p38 MAPK dans des cardiomyocytes ventriculaires isolés ^{121,122,123}. Ainsi, ces données suggèrent que la synthèse et la libération de cytokines inflammatoires par les cardiomyocytes ventriculaires mononucléés pourraient agir de manière autocrine pour empêcher davantage la réentrée dans le cycle cellulaire via le recrutement de p38 MAPK, médié par la PKC- α .

En résumé, la série d'expériences suivante a, premièrement, examiné si les cardiomyocytes ventriculaires représentent une source cellulaire dans l'expression de l'ARNm d'un panel de cytokines inflammatoires rapportées pour favoriser le recrutement des macrophages et/ou des neutrophiles vers la région ischémiquement endommagée du cœur mammifère adulte infarci. Deuxièmement, elle a élucidé si l'expression d'une cytokine inflammatoire dérivée des cardiomyocytes est médiée via une voie dépendante de la p38 MAPK ou indépendante de la p38 MAPK à la suite de l'activation de l'isoforme PKC- α .

La cytokine Reg3 β a été détectée dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes bordant la région cicatricielle du cœur endommagé par ischémie. Reg3 β induit le recrutement des macrophages et des neutrophiles amplifiant ainsi la réponse inflammatoire ⁶¹.

Le traitement des CVRNs par PDBu pendant une période de trois jours a significativement augmenté les niveaux de protéines et d'ARNm de Reg3 β (Figure 28) et l'administration conjointe de SB203580 a complètement inhibé l'induction médiée par PDBu (Figure 28). En parallèle, l'administration conjointe de GFX a également inhibé l'augmentation des niveaux d'ARNm de Reg3 β induite par PDBu (Figure 28). Collectivement, ces données révèlent que le recrutement de la voie p38 MAPK dans les CVRNs joue un rôle crucial dans l'induction de l'expression de Reg3 β (protéine/ARNm) médiée par la PKC- α . Pour confirmer l'idée que cette réponse est attribuée aux CVRNs, le traitement des fibroblastes ventriculaires de 1er passage de rats nouveau-nés par PDBu a inhibé l'expression d'ARNm de Reg3 β et l'administration conjointe de SB203580 n'a eu aucun effet (Calderone et al 2024 ; document en préparation).

De même, IL-6, TNF- α et IL-1 α sont exprimés dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes. De plus, la perte de cardiomyocytes à la suite de l'injection de particules immunogènes de zymosan A dans le cœur de souris néonatales a entraîné une surexpression de l'IL-6. Cette cytokine jouait un rôle essentiel dans la réponse régénérative cardiaque ultérieure en recrutant le transducteur de signal et activateur de transcription 3 (STAT3) ¹²⁴. Dans le cœur adulte endommagé par ischémie, le TNF- α favorise la fibrose réparatrice et réactive tout en entravant la contractilité cardiaque ¹²⁵. Aussi, la cytokine inflammatoire IL- β implique le recrutement des macrophages au cœur infarci et favorise la fibrose réparatrice et réactive ⁵⁹.

Analogiquement à Reg3 β , le traitement des CVRNs par le PDBu pendant une période de trois jours a significativement augmenté les niveaux d'expression d'ARNm de TNF- α , IL-1 α , IL-1 β et IL-6, et l'administration conjointe de SB203580 a inhibé l'induction médiée par le PDBu de chaque cytokine inflammatoire (Figure 28). De plus, l'administration conjointe de GFX a également inhibé l'augmentation des niveaux d'expression d'ARNm de TNF- α , IL-1 α , IL-1 β et IL-6 induite par le PDBu. En parallèle, le traitement des fibroblastes ventriculaires de 1er passage des rats nouveau-nés par PDBu a augmenté les niveaux d'ARNm d'IL-6 et de TNF- α (Figure 28), tandis que l'expression d'IL-1 α et d'IL-1 β est restée inchangée (Figure 28). De plus, l'administration conjointe

de SB203580 n'a pas influencé l'augmentation des niveaux d'ARNm d'IL-6 et de TNF- α induite par PDBu dans les fibroblastes ventriculaires de rats nouveau-nés (résultats non montrés du labo de Dr Calderone). Ainsi, l'inhibition de l'induction de l'expression des ARNm de TNF- α , IL-1 α , IL-1 β et IL-6 par SB203580 représente principalement une réponse attribuée aux CVRNs et souligne davantage le rôle crucial de la PKC- α . De plus, contrairement au rôle régénératif majeur induit par l'IL-6 dans le cœur de souris néonatales endommagé, la réentrée dans le cycle cellulaire des CVRNs Nestine⁽⁺⁾ et Nestine⁽⁻⁾ en réponse à l'administration conjointe de PDBu/SB203580 a conduit à la suppression de l'expression d'ARNm de l'IL-6 (Figure 28). Ainsi, ces données suggèrent que l'augmentation de l'IL-6 n'était apparemment pas nécessaire pour initier la réentrée dans le cycle cellulaire des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés, mettant ainsi en évidence des différences entre les espèces dans la réponse régénérative cardiaque des souris par rapport aux rats.

L'expression des chimiokines CCL2 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) et CCL3 (Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha) était significativement augmentée dans la population de cardiomyocytes du cœur de souris soumis à une surcharge de pression³⁸. Cette augmentation facilitait le recrutement des macrophages vers le cœur de souris soumis à une surcharge de pression et une augmentation de la CCL3 était impliquée dans la migration des leucocytes CD45⁽⁺⁾ vers le cœur de souris endommagé par l'ischémie^{38,126}.

CCL12 représente une cytokine supplémentaire induite dans les cardiomyocytes ventriculaires à la suite d'une lésion ischémique/reperfusion du cœur de rat adulte. De plus, la production locale de CCL12 a conduit à l'apoptose des cardiomyocytes et a contribué à la réponse fibrotique réparatrice (la formation de cicatrices)⁴⁸. Par ailleurs, les macrophages représentent également une source supplémentaire de CCL12 et l'inhibition de son récepteur cognitif CCR2 dans le cœur des souris adultes infarctées a significativement réduit la réponse inflammatoire globale^{29,27}. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs du récepteur CCR2 peut supprimer à la fois l'expression et la libération de CCL12 d'origine cardiaque et macrophagique dans le cœur lésé par l'ischémie. Enfin, la cytokine CCL22 est élevée chez les patients caractérisés par un infarctus du myocarde, et la littérature soutient l'idée que les macrophages peuvent représenter la source cellulaire principale de cette cytokine lors de lésions ischémiques^{50,127}.

Dans les CVRNs, le traitement par PDBu pendant une période de trois jours a significativement augmenté les niveaux d'ARNm de CCL2, CCL3, CCL12 et CCL22, (Figure 28) et l'administration conjointe de SB203580 a supprimé l'induction médiée par le PDBu de chaque cytokine inflammatoire (Figure 28). De plus, l'administration conjointe de GFX a également inhibé l'augmentation des niveaux d'ARNm de CCL2, CCL3, CCL12 et CCL22 induite par PDBu. L'expression d'ARNm de CCL2, CCL3, CCL12 et CCL22 n'a pas été examinée dans les fibroblastes ventriculaires des rats nouveau-nés. Néanmoins, cela confirme et met en évidence davantage la nouvelle hypothèse selon laquelle les ARNm de CCL2, CCL3, CCL12 et CCL22 sont au moins en partie exprimés dans les CVRNs via le recrutement de la p38 MAPK médié par la PKC- α . Malgré l'observation que l'expression d'ARNm d'un panel de cytokines inflammatoires s'est produite au moins en partie dans les CVRNs, les données obtenues dans ces expériences ne nous permettent pas d'évaluer si l'expression était exclusive aux CVRNs Nestine⁽⁺⁾ ou si elle représente une réponse générale impliquant à la fois les CVRNs qui réintègrent le cycle cellulaire et ceux qui ne réintègrent pas le cycle cellulaire en réponse au co-traitement PDBu/SB203580. De plus, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si l'une ou toutes les cytokines inflammatoires examinées peuvent directement inhiber et/ou potentialiser la réentrée dans le cycle cellulaire des CVRNs Nestine⁽⁺⁾ et Nestine⁽⁻⁾ et/ou influencer la réponse hypertrophique au traitement par PDBU seul. Cependant, les données observées dans les cardiomyocytes ventriculaires des rats nouveau-nés soutiennent l'hypothèse selon laquelle, après un infarctus du myocarde du cœur mammifère adulte, les cardiomyocytes ventriculaires qui subissent une hypertrophie peuvent représenter en partie une source cellulaire importante d'un panel de cytokines inflammatoires.

Conclusion, limitations de l'étude et futures perspectives

La découverte la plus importante de notre étude était l'identification de deux sous-populations distinctes de cardiomyocytes ventriculaires isolés du cœur de rat nouveau-né, qui possèdent la capacité inhérente de rentrer dans le cycle cellulaire *in vitro* en réponse à l'activation de la PKC et en présence d'un inhibiteur de la p38 MAPK (figure 27). La distinction principale entre ces deux sous-populations était que la sous-population prédominante qui réintérait le cycle cellulaire exprimait de novo la protéine filamenteuse Nestine (Fig 27). Aussi, nos études ont révélé que l'isoforme PKC- α favorisait sélectivement la rentrée dans le cycle cellulaire des CVRNs Nestine⁽⁺⁾, tandis que les isoformes nouvelles PKC- ϵ et/ou PKC- δ étaient préférentiellement impliquées dans la rentrée dans le cycle cellulaire des CVRNs Nestine⁽⁻⁾. De manière inattendue, l'inhibition pharmacologique de PKC- α a potentialisé la densité des CVRNs Nestine⁽⁻⁾ qui réintégraient le cycle cellulaire, suggérant une importante interaction entre les isoformes classiques et nouvelles de la PKC qui influencent apparemment de manière significative la réponse d'une seule sous-population. Malheureusement, les événements cellulaires impliqués dans la communication croisée entre les isoformes classiques et nouvelles de la PKC limitant le nombre de CVRNs Nestine⁽⁻⁾ à réintégrer le cycle cellulaire restent actuellement inconnus. Une analyse du profil d'expression des ARNm a révélé que la diminution de l'expression des ARNm de RUNx1 et CDKN2a et la normalisation des ARNm de ECT2 et Bub1 pendant la rentrée dans le cycle cellulaire représentaient apparemment un profil conservé des deux sous-populations de CVRNs, comme observé en réponse à PDBu/SB203580 et à la suite de l'administration de GFX à PDBu/SB203580. Enfin, le rôle biologique de la p38 MAPK ne se limite pas à l'inhibition de la rentrée dans le cycle cellulaire car la kinase sérine/thréonine représente un événement de signalisation important lié à l'expression de cytokines inflammatoires. En effet, l'étude présente a révélé que la stimulation des CVRNs par PDBu induit l'expression d'ARNm d'un panel de cytokines inflammatoires et que le traitement concomitant avec SB203580 inhibe la réponse. De plus, l'administration de GFX aux cellules traitées par PDBu inhibe également l'augmentation de l'expression des ARNm d'un panel de cytokines inflammatoires, soutenant un rôle de la PKC- α . Cependant, une limitation importante de ces dernières expériences est que nous ne savons pas si

le profil d'expression d'ARNm inflammatoires observé en réponse à PDBu/SB203580 reflète exclusivement les CVRNs qui réintègrent le cycle cellulaire ou représente une réponse générale de tous les CVRNs, indépendamment de leur capacité à réintégrer ou non le cycle cellulaire.

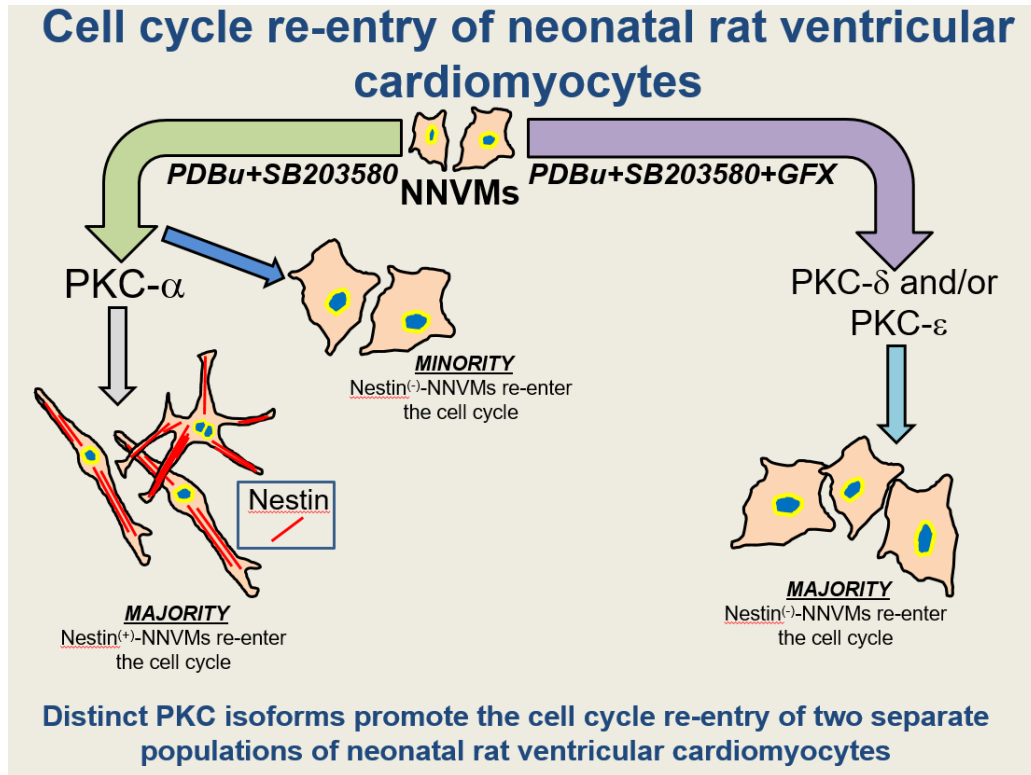


Figure 3030: schéma qui résume les voies de signalisation qui induisent la rentrée dans le cycle cellulaire de deux populations distinctes de cardiomyocytes

Source : Angelo Calderone

Légende : → active

La raison sous-jacente de la réalisation des expériences in vitro dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés était d'établir un profil cellulaire et moléculaire associé à la rentrée dans le cycle cellulaire des cardiomyocytes mononucléés. Comme indiqué dans l'introduction, une modeste population de cardiomyocytes ventriculaires mononucléés a été identifiée en bordure de la cicatrice du cœur mammifère adulte endommagé par l'ischémie. De plus, le travail du laboratoire du Dr Calderone a également identifié une population de cardiomyocytes mononucléés à la frontière de la cicatrice de l'infarctus myocardique du rat et du cœur humain, qui exprimaient la protéine filamenteuse intermédiaire Nestine. Ainsi, nous espérons que le phénotype moléculaire et cellulaire identifié lors de l'apparition et de la rentrée dans le

cycle cellulaire des CVRNs Nestine⁽⁺⁾ en réponse à PDBu et SB203580 pourrait fournir un aperçu pour stimuler la rentrée dans le cycle cellulaire des cardiomyocytes ventriculaires Nestine⁽⁺⁾ du cœur des mammifère adulte endommagé par l'ischémie pour initier ultimement une réponse régénérative cardiaque partielle. En effet, les données obtenues dans les études in vitro suggèrent que le ciblage sélectif de l'isoforme PKC- α en présence d'une inhibition de la p38 MAPK pourrait représenter une approche potentielle pour augmenter la densité de la sous-population Nestine⁽⁺⁾ des cardiomyocytes ventriculaires adultes et sa rentrée dans le cycle cellulaire au niveau du cœur adulte endommagé par l'ischémie. Cependant, ces approches présentent des limitations importantes. Premièrement, nous n'avons pas de moyen pour cibler sélectivement l'isoforme PKC- α dans les cardiomyocytes ventriculaires adultes Nestine⁽⁺⁾ en bordure de la cicatrice du cœur adulte endommagé par l'ischémie. Deuxièmement, en ce qui concerne la p38 MAPK, une limitation importante de la proposition est que l'inhibition de la sérine/thréonine kinase réduira significativement la réponse inflammatoire du cœur adulte endommagé par l'ischémie, ce qui pourrait se traduire par une formation d'infarctus inadéquate et potentiellement une rupture de cicatrice. En effet, ce paradigme a été confirmé dans nos études car en plus des cellules inflammatoires envahissantes, les cardiomyocytes ventriculaires peuvent également représenter une source cellulaire importante d'un panel de cytokines inflammatoires dans le cœur adulte endommagé par l'ischémie. En effet, des données préliminaires du laboratoire du Dr Calderone ont révélé que les cytokines inflammatoires induites dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés en réponse à PDBu via une voie p38 MAPK étaient également exprimés significativement dans la région péri-infarctée du cœur de rats mâles adultes, 1 semaine après un infarctus myocardique (article en préparation, 2024). À cet égard, la libération locale de cytokines inflammatoires par les cardiomyocytes ventriculaires en bordure de la région d'infarctus peut contribuer en partie à la réponse fibrotique réparatrice continue conduisant à une formation de cicatrice adéquate en l'absence d'une réponse régénérative cardiaque. De plus, cette dernière question est compliquée par l'observation selon laquelle les cytokines inflammatoires libérées par les macrophages envahissants lors de la lésion ischémique du cœur adulte inhibent la rentrée dans le cycle cellulaire des cardiomyocytes ventriculaires mononucléés de souris nouveau-nés. Ainsi, la suppression de l'activité de la p38 MAPK dans le cœur adulte endommagé par l'ischémie pourrait conduire à la rentrée potentielle dans le cycle cellulaire des cardiomyocytes ventriculaires mononucléés. Cependant, la possibilité d'une formation de cicatrice inadéquate et d'une rupture

subséquente du cœur adulte endommagé par l'ischémie à la suite de l'inhibition pharmacologique de la p38MAPK souligne un problème clinique sérieux qui doit être évité.

References

1. DeSilva R. *Heart Disease*. Greenwood; 2013.
2. Sethna DH, Moffitt EA. An appreciation of the coronary circulation. *Anesth Analg*. 1986;65(3):294-305.
3. Saxton A, Tariq MA, Bordoni B. Anatomy, Thorax, Cardiac Muscle. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2024. Accessed March 7, 2024. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535355/>
4. Liaquat MT, Ahmed I, Alzahrani T. Pacemaker Malfunction. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2024. Accessed March 7, 2024. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553149/>
5. Arackal A, Alsayouri K. Histology, Heart. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2023. Accessed December 30, 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545143/>
6. Hertig V, Brezai A, Bergeron A, Villeneuve L, Gillis MA, Calderone A. p38 α MAPK inhibition translates to cell cycle re-entry of neonatal rat ventricular cardiomyocytes and de novo nestin expression in response to thrombin and after apex resection. *Sci Rep*. 2019;9(1):8203. doi:10.1038/s41598-019-44712-3
7. Li F, Wang X, Capasso JM, Gerdes AM. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28(8):1737-1746. doi:10.1006/jmcc.1996.0163
8. Steinhauser ML, Lee RT. Regeneration of the heart. *EMBO Mol Med*. 2011;3(12):701-712. doi:10.1002/emmm.201100175
9. Haubner BJ, Schneider J, Schweigmann U, et al. Functional Recovery of a Human Neonatal Heart After Severe Myocardial Infarction. *Circ Res*. 2016;118(2):216-221. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307017
10. p38 MAPK and the compromised regenerative response of the infarcted adult heart. *Cardiovasc Regen Med*. 2018;3. doi:10.14800/crm.1508
11. Matz DG, Oberpriller JO, Oberpriller JC. Comparison of mitosis in binucleated and mononucleated newt cardiac myocytes. *Anat Rec*. 1998;251(2):245-255. doi:10.1002/(SICI)1097-0185(199806)251:2<245::AID-AR14>3.0.CO;2-O
12. Honold L, Nahrendorf M. Resident and Monocyte-Derived Macrophages in Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 2018;122(1):113-127. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311071
13. Velayutham N, Agnew EJ, Yutzey KE. Postnatal Cardiac Development and Regenerative Potential in Large Mammals. *Pediatr Cardiol*. 2019;40(7):1345-1358. doi:10.1007/s00246-019-02163-7
14. Padula SL, Velayutham N, Yutzey KE. Transcriptional Regulation of Postnatal Cardiomyocyte Maturation and Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6):3288. doi:10.3390/ijms22063288
15. Juneau M. *Un Coeur Pour La Vie : Prévention Cardiovasculaire Globale.*; 2017.
16. Frangogiannis NG. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Compr Physiol*. 2015;5(4):1841-1875. doi:10.1002/cphy.c150006
17. Xia P, Liu Y, Cheng Z. Signaling Pathways in Cardiac Myocyte Apoptosis. *BioMed Res Int*. 2016;2016:9583268. doi:10.1155/2016/9583268

18. Weinberger F, Eschenhagen T. Cardiac Regeneration: New Hope for an Old Dream. *Annu Rev Physiol.* 2021;83:59-81. doi:10.1146/annurev-physiol-031120-103629
19. Saito Y, Oyama K, Tsujita K, Yasuda S, Kobayashi Y. Treatment strategies of acute myocardial infarction: updates on revascularization, pharmacological therapy, and beyond. *J Cardiol.* 2023;81(2):168-178. doi:10.1016/j.jjcc.2022.07.003
20. Frangogiannis NG. Inflammation in cardiac injury, repair and regeneration. *Curr Opin Cardiol.* 2015;30(3):240-245. doi:10.1097/HCO.000000000000158
21. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res.* 2016;119(1):91-112. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303577
22. Anzai T. Post-infarction inflammation and left ventricular remodeling: a double-edged sword. *Circ J Off J Jpn Circ Soc.* 2013;77(3):580-587. doi:10.1253/circj.cj-13-0013
23. Khalil H, Kanisicak O, Prasad V, et al. Fibroblast-specific TGF- β -Smad2/3 signaling underlies cardiac fibrosis. *J Clin Invest.* 2017;127(10):3770-3783. doi:10.1172/JCI94753
24. Yokoyama T, Nakano M, Bednarczyk JL, McIntyre BW, Entman M, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. *Circulation.* 1997;95(5):1247-1252. doi:10.1161/01.cir.95.5.1247
25. Bai Y, Li Z, Liu W, Gao D, Liu M, Zhang P. Biochanin A attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway. *Acta Cir Bras.* 2019;34(11):e201901104. doi:10.1590/s0102-865020190110000004
26. Chen W, Frangogiannis NG. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(4):945-953. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.08.023
27. Bajpai G, Bredemeyer A, Li W, et al. Tissue Resident CCR2- and CCR2+ Cardiac Macrophages Differentially Orchestrate Monocyte Recruitment and Fate Specification Following Myocardial Injury. *Circ Res.* 2019;124(2):263-278. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.314028
28. Aurora AB, Porrello ER, Tan W, et al. Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *J Clin Invest.* 2014;124(3):1382-1392. doi:10.1172/JCI72181
29. Frantz S, Nahrendorf M. Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res.* 2014;102(2):240-248. doi:10.1093/cvr/cvu025
30. Epelman S, Lavine KJ, Beaudin AE, et al. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity.* 2014;40(1):91-104. doi:10.1016/j.immuni.2013.11.019
31. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science.* 2011;331(6020):1078-1080. doi:10.1126/science.1200708
32. Oliveira JB, Soares AASM, Sposito AC. Inflammatory Response During Myocardial Infarction. *Adv Clin Chem.* 2018;84:39-79. doi:10.1016/bs.acc.2017.12.002
33. Frangogiannis NG. Interleukin-1 in cardiac injury, repair, and remodeling: pathophysiological and translational concepts. *Discov Craiova Rom.* 2015;3(1):e41. doi:10.15190/d.2015.33
34. Gibb AA, Lazaropoulos MP, Elrod JW. Myofibroblasts and Fibrosis: Mitochondrial and Metabolic Control of Cellular Differentiation. *Circ Res.* 2020;127(3):427-447. doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.316958
35. Lugin J, Parapanov R, Rosenblatt-Velin N, et al. Cutting edge: IL-1 α is a crucial danger signal triggering acute myocardial inflammation during myocardial infarction. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2015;194(2):499-503. doi:10.4049/jimmunol.1401948

36. Gula G, Ratajska A. Novel insights into embryonic cardiac macrophages. *Dev Biol.* 2022;488:1-10. doi:10.1016/j.ydbio.2022.05.003
37. Yamauchi-Takahara K, Ihara Y, Ogata A, Yoshizaki K, Azuma J, Kishimoto T. Hypoxic stress induces cardiac myocyte-derived interleukin-6. *Circulation.* 1995;91(5):1520-1524. doi:10.1161/01.cir.91.5.1520
38. Suetomi T, Willeford A, Brand CS, et al. Inflammation and NLRP3 Inflammasome Activation Initiated in Response to Pressure Overload by Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II δ Signaling in Cardiomyocytes Are Essential for Adverse Cardiac Remodeling. *Circulation.* 2018;138(22):2530-2544. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034621
39. Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y, Takayanagi H, Schett G, eds. *Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems.* Second edition. Academic Press is an imprint of Elsevier; 2016.
40. Attal N. Spinal cord injury pain. *Rev Neurol (Paris).* 2021;177(5):606-612. doi:10.1016/j.neurol.2020.07.003
41. Singh S, Anshita D, Ravichandiran V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int Immunopharmacol.* 2021;101(Pt B):107598. doi:10.1016/j.intimp.2021.107598
42. Makowski G. *Advances in Clinical Chemistry.* Vol 82. 2017th ed.
43. Fisher P, Welch D. *Molecular and Cellular Basis of Metastasis: Road to Therapy.* Vol 132. 2016th ed.
44. Al-Amran FG, Manson MZ, Hanley TK, Hainz DL. Blockade of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor pathway ameliorates myocardial injury in animal models of ischemia and reperfusion. *Pharmacology.* 2014;93(5-6):296-302. doi:10.1159/000363657
45. Frangogiannis NG. Chemokines in the ischemic myocardium: from inflammation to fibrosis. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al.* 2004;53(11):585-595. doi:10.1007/s00011-004-1298-5
46. de Jager SCA, Kraaijeveld AO, Grauss RW, et al. CCL3 (MIP-1 alpha) levels are elevated during acute coronary syndromes and show strong prognostic power for future ischemic events. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;45(3):446-452. doi:10.1016/j.yjmcc.2008.06.003
47. DeLeon-Pennell KY, Iyer RP, Ero OK, et al. Periodontal-induced chronic inflammation triggers macrophage secretion of Ccl12 to inhibit fibroblast-mediated cardiac wound healing. *JCI Insight.* 2017;2(18):e94207, 94207. doi:10.1172/jci.insight.94207
48. Chen JY, Ruan HJ, Chen SY, Wang XQ, Wen JM, Wang ZX. MiR-144-5p/CCL12 Signaling Axis Modulates Ischemic Preconditioning-Mediated Cardio-protection by Reducing Cell Viability, Enhancing Cell Apoptosis, Fibrosis, and Pyroptosis. *Appl Biochem Biotechnol.* 2023;195(3):1999-2014. doi:10.1007/s12010-022-04208-9
49. Moore BB, Murray L, Das A, Wilke CA, Herrygers AB, Toews GB. The role of CCL12 in the recruitment of fibrocytes and lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;35(2):175-181. doi:10.1165/rcmb.2005-0239OC
50. Safa A, Rashidinejad HR, Khalili M, et al. Higher circulating levels of chemokines CXCL10, CCL20 and CCL22 in patients with ischemic heart disease. *Cytokine.* 2016;83:147-157. doi:10.1016/j.cyto.2016.04.006
51. Noori F, Naeimi S, Zibaenezhad MJ, Gharemirshamlu FR. CCL22 and CCR4 Gene Polymorphisms in Myocardial Infarction: Risk Assessment of rs4359426 and rs2228428 in Iranian Population. *Clin Lab.* 2018;64(6):907-913. doi:10.7754/Clin.Lab.2018.171106

52. Viney JM, Andrew DP, Phillips RM, et al. Distinct conformations of the chemokine receptor CCR4 with implications for its targeting in allergy. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2014;192(7):3419-3427. doi:10.4049/jimmunol.1300232
53. Anderson CA, Patel P, Viney JM, Phillips RM, Solari R, Pease JE. A degradatory fate for CCR4 suggests a primary role in Th2 inflammation. *J Leukoc Biol*. 2020;107(3):455-466. doi:10.1002/JLB.2A0120-089RR
54. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*. 2000;50(3):184-195. doi:10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H
55. Mukai Y, Shibata H, Nakamura T, et al. Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant. *J Mol Biol*. 2009;385(4):1221-1229. doi:10.1016/j.jmb.2008.11.053
56. Jude B, Vetel S, Giroux-Metges MA, Pennec JP. Rapid negative inotropic effect induced by TNF- α in rat heart perfused related to PKC activation. *Cytokine*. 2018;107:65-69. doi:10.1016/j.cyto.2017.11.015
57. Hanna A, Frangogiannis NG. Inflammatory Cytokines and Chemokines as Therapeutic Targets in Heart Failure. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2020;34(6):849-863. doi:10.1007/s10557-020-07071-0
58. Turner NA, Mughal RS, Warburton P, O'Regan DJ, Ball SG, Porter KE. Mechanism of TNF α -induced IL-1 α , IL-1 β and IL-6 expression in human cardiac fibroblasts: effects of statins and thiazolidinediones. *Cardiovasc Res*. 2007;76(1):81-90. doi:10.1016/j.cardiores.2007.06.003
59. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2009;57(3):165-176. doi:10.1007/s00005-009-0024-y
60. Rose-John S. Interleukin-6 signalling in health and disease. *F1000Research*. 2020;9:F1000 Faculty Rev-1013. doi:10.12688/f1000research.26058.1
61. Lörchner H, Pöling J, Gajawada P, et al. Myocardial healing requires Reg3 β -dependent accumulation of macrophages in the ischemic heart. *Nat Med*. 2015;21(4):353-362. doi:10.1038/nm.3816
62. Lörchner H, Hou Y, Adrian-Segarra JM, et al. Reg proteins direct accumulation of functionally distinct macrophage subsets after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2018;114(12):1667-1679. doi:10.1093/cvr/cvy126
63. Kloner RA, Fishbein MC, Lew H, Maroko PR, Braunwald E. Mummification of the infarcted myocardium by high dose corticosteroids. *Circulation*. 1978;57(1):56-63. doi:10.1161/01.cir.57.1.56
64. Hammerman H, Kloner RA, Schoen FJ, Brown EJ, Hale S, Braunwald E. Indomethacin-induced scar thinning after experimental myocardial infarction. *Circulation*. 1983;67(6):1290-1295. doi:10.1161/01.cir.67.6.1290
65. Saxena A, Russo I, Frangogiannis NG. Inflammation as a therapeutic target in myocardial infarction: learning from past failures to meet future challenges. *Transl Res J Lab Clin Med*. 2016;167(1):152-166. doi:10.1016/j.trsl.2015.07.002
66. Frangogiannis NG. The reparative function of cardiomyocytes in the infarcted myocardium. *Cell Metab*. 2015;21(6):797-798. doi:10.1016/j.cmet.2015.05.015
67. Alex L, Frangogiannis NG. Pericytes in the infarcted heart. *Vasc Biol Bristol Engl*. 2019;1(1):H23-H31. doi:10.1530/VB-19-0007

68. Anzai T. Inflammatory Mechanisms of Cardiovascular Remodeling. *Circ J Off J Jpn Circ Soc.* 2018;82(3):629-635. doi:10.1253/circj.CJ-18-0063
69. Frangogiannis NG, Michael LH, Entman ML. Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb). *Cardiovasc Res.* 2000;48(1):89-100. doi:10.1016/s0008-6363(00)00158-9
70. Willems IE, Havenith MG, De Mey JG, Daemen MJ. The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars. *Am J Pathol.* 1994;145(4):868-875.
71. van den Borne SWM, Diez J, Blankesteyn WM, Verjans J, Hofstra L, Narula J. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nat Rev Cardiol.* 2010;7(1):30-37. doi:10.1038/nrcardio.2009.199
72. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* 2002;12(1):9-18. doi:10.1038/sj.cr.7290105
73. Martínez-Limón A, Joaquin M, Caballero M, Posas F, de Nadal E. The p38 Pathway: From Biology to Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2020;21(6):1913. doi:10.3390/ijms21061913
74. Ambrosino C, Nebreda AR. Cell cycle regulation by p38 MAP kinases. *Biol Cell.* 2001;93(1-2):47-51. doi:10.1016/s0248-4900(01)01124-8
75. Whitaker RH, Cook JG. Stress Relief Techniques: p38 MAPK Determines the Balance of Cell Cycle and Apoptosis Pathways. *Biomolecules.* 2021;11(10):1444. doi:10.3390/biom11101444
76. Engel FB, Schebesta M, Duong MT, et al. p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev.* 2005;19(10):1175-1187. doi:10.1101/gad.1306705
77. Henklova P, Vrzal R, Papouskova B, et al. SB203580, a pharmacological inhibitor of p38 MAP kinase transduction pathway activates ERK and JNK MAP kinases in primary cultures of human hepatocytes. *Eur J Pharmacol.* 2008;593(1):16-23. doi:10.1016/j.ejphar.2008.07.007
78. Romero-Becerra R, Santamans AM, Folgueira C, Sabio G. p38 MAPK Pathway in the Heart: New Insights in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2020;21(19):7412. doi:10.3390/ijms21197412
79. Heallen T, Morikawa Y, Leach J, et al. Hippo signaling impedes adult heart regeneration. *Dev Camb Engl.* 2013;140(23):4683-4690. doi:10.1242/dev.102798
80. Johnson R, Halder G. The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(1):63-79. doi:10.1038/nrd4161
81. Hertig V, Matos-Nieves A, Garg V, et al. Nestin expression is dynamically regulated in cardiomyocytes during embryogenesis. *J Cell Physiol.* 2018;233(4):3218-3229. doi:10.1002/jcp.26165
82. Moya IM, Halder G. Hippo-YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(4):211-226. doi:10.1038/s41580-018-0086-y
83. Lin Z, Pu WT. Harnessing Hippo in the heart: Hippo/Yap signaling and applications to heart regeneration and rejuvenation. *Stem Cell Res.* 2014;13(3):571-581. doi:10.1016/j.scr.2014.04.010
84. Schieven GL. The biology of p38 kinase: a central role in inflammation. *Curr Top Med Chem.* 2005;5(10):921-928. doi:10.2174/1568026054985902
85. Bassi R, Heads R, Marber MS, Clark JE. Targeting p38-MAPK in the ischaemic heart: kill or cure? *Curr Opin Pharmacol.* 2008;8(2):141-146. doi:10.1016/j.coph.2008.01.002

86. Calderone A. The Biological Role of Nestin(+)-Cells in Physiological and Pathological Cardiovascular Remodeling. *Front Cell Dev Biol.* 2018;6:15. doi:10.3389/fcell.2018.00015
87. Tahara N, Brush M, Kawakami Y. Cell migration during heart regeneration in zebrafish. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* 2016;245(7):774-787. doi:10.1002/dvdy.24411
88. Ingason AB, Goldstone AB, Paulsen MJ, et al. Angiogenesis precedes cardiomyocyte migration in regenerating mammalian hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2018;155(3):1118-1127.e1. doi:10.1016/j.jtcvs.2017.08.127
89. Meus MA, Hertig V, Villeneuve L, Jasmin JF, Calderone A. Nestin Expressed by Pre-Existing Cardiomyocytes Recapitulated in Part an Embryonic Phenotype; Suppressive Role of p38 MAPK. *J Cell Physiol.* 2017;232(7):1717-1727. doi:10.1002/jcp.25496
90. Bergeron A, Brezai A, Shukr R, et al. Filamentous nestin and nonmuscle myosin IIB are associated with a migratory phenotype in neonatal rat cardiomyocytes. *J Cell Physiol.* 2021;236(2):1281-1294. doi:10.1002/jcp.29934
91. El-Helou V, Proulx C, Béguin P, et al. The cardiac neural stem cell phenotype is compromised in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *J Cell Physiol.* 2009;220(2):440-449. doi:10.1002/jcp.21785
92. Maruyama K, Imanaka-Yoshida K. The Pathogenesis of Cardiac Fibrosis: A Review of Recent Progress. *Int J Mol Sci.* 2022;23(5):2617. doi:10.3390/ijms23052617
93. Morfino P, Aimo A, Castiglione V, Gálvez-Montón C, Emdin M, Bayes-Genis A. Treatment of cardiac fibrosis: from neuro-hormonal inhibitors to CAR-T cell therapy. *Heart Fail Rev.* 2023;28(2):555-569. doi:10.1007/s10741-022-10279-x
94. Liang Y, Sahoo S. Exosomes Explosion for Cardiac Resuscitation. *J Am Coll Cardiol.* 2015;66(6):612-615. doi:10.1016/j.jacc.2015.06.1302
95. Roubille F, Busseuil D, Merlet N, Kritikou EA, Rhéaume E, Tardif JC. Investigational drugs targeting cardiac fibrosis. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2014;12(1):111-125. doi:10.1586/14779072.2013.839942
96. Hertig V, Villeneuve L, Calderone A. Nestin identifies a subpopulation of rat ventricular fibroblasts and participates in cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2023;325(2):C496-C508. doi:10.1152/ajpcell.00161.2023
97. Béguin PC, Gosselin H, Mamarbachi M, Calderone A. Nestin expression is lost in ventricular fibroblasts during postnatal development of the rat heart and re-expressed in scar myofibroblasts. *J Cell Physiol.* 2012;227(2):813-820. doi:10.1002/jcp.22794
98. Koth J, Wang X, Killen AC, et al. Runx1 promotes scar deposition and inhibits myocardial proliferation and survival during zebrafish heart regeneration. *Dev Camb Engl.* 2020;147(8):dev186569. doi:10.1242/dev.186569
99. Mehdizadeh M, Aguilar M, Thorin E, Ferbeyre G, Nattel S. The role of cellular senescence in cardiac disease: basic biology and clinical relevance. *Nat Rev Cardiol.* 2022;19(4):250-264. doi:10.1038/s41569-021-00624-2
100. Windmueller R, Leach JP, Babu A, et al. Direct Comparison of Mononucleated and Binucleated Cardiomyocytes Reveals Molecular Mechanisms Underlying Distinct Proliferative Competencies. *Cell Rep.* 2020;30(9):3105-3116.e4. doi:10.1016/j.celrep.2020.02.034
101. Bolanos-Garcia VM, Blundell TL. BUB1 and BUBR1: multifaceted kinases of the cell cycle. *Trends Biochem Sci.* 2011;36(3):141-150. doi:10.1016/j.tibs.2010.08.004
102. Pucéat M, Vassort G. Signalling by protein kinase C isoforms in the heart. *Mol Cell Biochem.* 1996;157(1-2):65-72. doi:10.1007/BF00227882

103. Azzi A, Boscoboinik D, Hensey C. The protein kinase C family. *Eur J Biochem.* 1992;208(3):547-557. doi:10.1111/j.1432-1033.1992.tb17219.x
104. Palaniyandi SS, Sun L, Ferreira JCB, Mochly-Rosen D. Protein kinase C in heart failure: a therapeutic target? *Cardiovasc Res.* 2009;82(2):229-239. doi:10.1093/cvr/cvp001
105. Braz JC, Bueno OF, De Windt LJ, Molkentin JD. PKC alpha regulates the hypertrophic growth of cardiomyocytes through extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2). *J Cell Biol.* 2002;156(5):905-919. doi:10.1083/jcb.200108062
106. Pan J, Singh US, Takahashi T, et al. PKC mediates cyclic stretch-induced cardiac hypertrophy through Rho family GTPases and mitogen-activated protein kinases in cardiomyocytes. *J Cell Physiol.* 2005;202(2):536-553. doi:10.1002/jcp.20151
107. Mullin JM, Snock KV, Shurina RD, et al. Effects of acute vs. chronic phorbol ester exposure on transepithelial permeability and epithelial morphology. *J Cell Physiol.* 1992;152(1):35-47. doi:10.1002/jcp.1041520106
108. Kebbe M, Naud P, Assous I, et al. Distinct protein kinase C isoforms drive the cell cycle re-entry of two separate populations of neonatal rat ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2023;325(2):C406-C419. doi:10.1152/ajpcell.00506.2022
109. Hatzistergos KE, Williams AR, Dykxhoorn D, Bellio MA, Yu W, Hare JM. Tumor Suppressors RB1 and CDKN2a Cooperatively Regulate Cell-Cycle Progression and Differentiation During Cardiomyocyte Development and Repair: Implications for Stimulating Neomyogenesis With Cell-Based Therapy. *Circ Res.* 2019;124(8):1184-1197. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.314063
110. Jiang YH, Zhu Y, Chen S, et al. Re-enforcing hypoxia-induced polyploid cardiomyocytes enter cytokinesis through activation of β -catenin. *Sci Rep.* 2019;9(1):17865. doi:10.1038/s41598-019-54334-4
111. Kim T, Gartner A. Bub1 kinase in the regulation of mitosis. *Anim Cells Syst.* 2021;25(1):1-10. doi:10.1080/19768354.2021.1884599
112. Suetomi T, Miyamoto S, Brown JH. Inflammation in nonischemic heart disease: initiation by cardiomyocyte CaMKII and NLRP3 inflammasome signaling. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 2019;317(5):H877-H890. doi:10.1152/ajpheart.00223.2019
113. Bloch L, Ndongson-Dongmo B, Kusch A, Dragun D, Heller R, Huber O. Real-time monitoring of hypertrophy in HL-1 cardiomyocytes by impedance measurements reveals different modes of growth. *Cytotechnology.* 2016;68(5):1897-1907. doi:10.1007/s10616-016-0001-3
114. Akiyama M, Matsuda Y, Ishiwata T, Naito Z, Kawana S. Nestin is highly expressed in advanced-stage melanomas and neurotized nevi. *Oncol Rep.* 2013;29(4):1595-1599. doi:10.3892/or.2013.2287
115. Zhang Y, Zeng S, Ma J, et al. Nestin overexpression in hepatocellular carcinoma associates with epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance. *J Exp Clin Cancer Res CR.* 2016;35(1):111. doi:10.1186/s13046-016-0387-y
116. Cui M, Wang Z, Chen K, et al. Dynamic Transcriptional Responses to Injury of Regenerative and Non-regenerative Cardiomyocytes Revealed by Single-Nucleus RNA Sequencing. *Dev Cell.* 2020;53(1):102-116.e8. doi:10.1016/j.devcel.2020.02.019
117. Zhu M, Liang H, Zhang Z, et al. Distinct mononuclear diploid cardiac subpopulation with minimal cell-cell communications persists in embryonic and adult mammalian heart. *Front Med.* 2023;17(5):939-956. doi:10.1007/s11684-023-0987-9

118. Dissanayake SK, Weeraratna AT. Detecting PKC phosphorylation as part of the Wnt/calcium pathway in cutaneous melanoma. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2008;468:157-172. doi:10.1007/978-1-59745-249-6_12
119. Hertig V, Tardif K, Meus MA, et al. Nestin expression is upregulated in the fibrotic rat heart and is localized in collagen-expressing mesenchymal cells and interstitial CD31(+)- cells. *PLoS One*. 2017;12(4):e0176147. doi:10.1371/journal.pone.0176147
120. Zhou H, Peng D, Lai Y, et al. Activation of PKC α participates in the reduction of Ikur in atrial myocytes induced by tumour necrosis factor- α . *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2021;48(3):435-442. doi:10.1111/1440-1681.13407
121. Degousee N, Martindale J, Stefanski E, et al. MAP Kinase Kinase 6–p38 MAP Kinase Signaling Cascade Regulates Cyclooxygenase-2 Expression in Cardiac Myocytes In Vitro and In Vivo. *Circ Res*. 2003;92(7):757-764. doi:10.1161/01.RES.0000067929.01404.03
122. He Q, LaPointe MC. Interleukin-1 β Regulation of the Human Brain Natriuretic Peptide Promoter Involves Ras-, Rac-, and p38 Kinase–Dependent Pathways in Cardiac Myocytes. *Hypertension*. 1999;33(1):283-289. doi:10.1161/01.HYP.33.1.283
123. Wu H, Wang G, Li S, Zhang M, Li H, Wang K. TNF- α - Mediated-p38-Dependent Signaling Pathway Contributes to Myocyte Apoptosis in Rats Subjected to Surgical Trauma. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(4):1454-1466. doi:10.1159/000373965
124. Han C, Nie Y, Lian H, et al. Acute inflammation stimulates a regenerative response in the neonatal mouse heart. *Cell Res*. 2015;25(10):1137-1151. doi:10.1038/cr.2015.110
125. Thomas TP, Grisanti LA. The Dynamic Interplay Between Cardiac Inflammation and Fibrosis. *Front Physiol*. 2020;11:529075. doi:10.3389/fphys.2020.529075
126. Weinreuter M, Kreusser MM, Beckendorf J, et al. Ca M Kinase II mediates maladaptive post-infarct remodeling and pro-inflammatory chemoattractant signaling but not acute myocardial ischemia/reperfusion injury. *EMBO Mol Med*. 2014;6(10):1231-1245. doi:10.15252/emmm.201403848
127. Kimura S, Tanimoto A, Wang K, et al. Expression of macrophage-derived chemokine (CCL22) in atherosclerosis and regulation by histamine via the H2 receptor. *Pathol Int*. 2012;62(10):675-683. doi:10.1111/j.1440-1827.2012.02854.x