

Université de Montréal

**Implications physiopathologiques de la Nestine lors du remodelage pulmonaire et cardiaque à la suite de l'infarctus du myocarde, du diabète et de l'hypertension pulmonaire**

par

**Andréanne Chabot**

Département de Physiologie Moléculaire et Intégrative, Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de PhD en Physiologie Moléculaire, Cellulaire et  
Intégrative

Juillet, 2015

©, Andréanne Chabot, 2015

Université de Montréal  
Faculté de médecine

Cette thèse intitulée :

**Implications physiopathologiques de la Nestine lors du remodelage pulmonaire et cardiaque à la suite de l'infarctus du myocarde, du diabète et de l'hypertension pulmonaire**

Présentée par :

**Andréanne Chabot**

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

**Réjean Couture, PhD**

---

Président-rapporteur

**Angelo Calderone, PhD**

---

Directeur de recherche

**Yves Berthiaume, MD**

---

Membre du jury

**Pedro Miguel Geraldès, PhD**

---

Examineur externe

**Marc Servant, PhD**

---

Représentant de la Doyenne

## RÉSUMÉ

Il est reconnu que la protéine filamenteuse intermédiaire Nestine est exprimée lors du processus de cicatrisation et du remodelage fibrotique. De plus, nous avons identifié l'expression de la Nestine au sein de deux populations distinctes qui sont directement impliquées dans les réponses de fibrose réparative et réactive. Ainsi, une population de cellules souches neurales progénitrices résidentes du cœur de rat adulte exprime la Nestine et a été identifiée à titre de substrat de l'angiogenèse et de la neurogenèse cardiaque. Également, la Nestine est exprimée par les myofibroblastes cicatriciels cardiaques et il a été établi que la protéine filamenteuse intermédiaire joue un rôle dans la prolifération de ces cellules. Ainsi, l'objectif général de cette thèse était de mieux comprendre les événements cellulaires impliqués dans la réponse neurogénique des cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> (CSNPRCN<sup>(+)</sup>) lors de la fibrose réparative cardiaque et d'explorer si l'apparition de fibroblastes Nestine<sup>(+)</sup> est associée avec la réponse de fibrose réactive secondaire du remodelage pulmonaire. Une première publication nous a permis d'établir qu'il existe une régulation à la hausse de l'expression de la GAP43 (*growth associated protein 43*) et que cet événement transitoire précède l'acquisition d'un phénotype neuronal par les CSNPRCN<sup>(+)</sup> lors du processus de cicatrisation cardiaque chez le rat ayant subi un infarctus du myocarde. De plus, la surimposition de la condition diabétique de type 1, via l'injection unique de Streptozotocine chez le rat, abolit la réponse neurogénique des CSNPRCN<sup>(+)</sup>, qui est normalement induite à la suite de l'ischémie cardiaque ou de l'administration de 6-hydroxydopamine. Le second article a démontré que le développement aigu de la fibrose pulmonaire secondaire de l'infarctus du myocarde chez le rat est associé avec une augmentation de l'expression protéique de la Nestine et de l'apparition de myofibroblastes pulmonaires Nestine<sup>(+)</sup>. Également, le traitement de fibroblastes pulmonaires avec des facteurs de croissances peptidiques pro-fibrotiques a augmenté l'expression de la Nestine par ces cellules. Enfin, le développement initial de la condition diabétique de type 1 chez le rat est associé avec une absence de fibrose réactive pulmonaire et à une réduction significative des niveaux protéiques et d'ARN messenger de la Nestine pulmonaire. Finalement, la troisième étude représentait quant à elle un prolongement de la deuxième étude et a alors examiné le remodelage pulmonaire chronique chez un modèle établi d'hypertension pulmonaire. Ainsi,

les poumons de rats adultes mâles soumis à l'hypoxie hypobarique durant 3 semaines présentent un remodelage vasculaire, une fibrose réactive et une augmentation des niveaux d'ARN messager et de la protéine Nestine. De plus, nos résultats ont démontré que la Nestine, plutôt que l' $\alpha$ -actine du muscle lisse, est un marqueur plus approprié des diverses populations de fibroblastes pulmonaires activés. Également, nos données suggèrent que les fibroblastes pulmonaires activés proviendraient en partie de fibroblastes résidents, ainsi que des processus de transition épithélio-mésenchymateuse et de transition endothélio-mésenchymateuse. Collectivement, ces études ont démontré que des populations distinctes de cellules Nestine<sup>(+)</sup> jouent un rôle majeur dans la fibrose réparative cardiaque et la fibrose réactive pulmonaire.

### **Mots clés**

Nestine

Infarctus du myocarde

Cellules souches neurales progénitrices

Neurogenèse

Diabète

Hypertension pulmonaire

Fibrose réparative et réactive

Fibroblastes

Transition endothélio-mésenchymateuse

Transition épithélio-mésenchymateuse



# ABSTRACT

It is well established that the intermediate filamentous protein Nestin is expressed during wound healing and fibrotic remodeling. Furthermore, we have identified Nestin expression in two distinct populations directly implicated in reparative and reactive fibrosis. The adult rodent heart contains a resident population of neural progenitor/stem cells that express Nestin and identified as a cellular substrate of cardiac angiogenesis and neurogenesis. Moreover, Nestin is also expressed in cardiac scar myofibroblasts and the intermediate filament protein plays a direct role in proliferation. Thus, the general aim of the present thesis was to better understand the cellular events implicated in the neurogenic response of neural progenitor/stem cells during cardiac reparative fibrosis and to explore whether the appearance of Nestin<sup>(+)</sup>-fibroblasts was associated with reactive fibrotic response secondary to pulmonary remodeling. The first study revealed that the transient upregulation of growth associated protein 43 (GAP43) represents a transition event during the acquisition of a neuronal-like phenotype by cardiac resident neural progenitor/stem cells in the scar of the infarcted rat heart. Furthermore, the superimposition of a type 1 diabetic environment, via the single injection of streptozotocin in rats, abrogated the neurogenic response of cardiac resident neural progenitor/stem cells to ischemia and 6-hydroxydopamine, respectively. The second study has demonstrated that the development of acute pulmonary fibrosis secondary to myocardial infarction of the adult rat heart was associated with the increased expression of Nestin protein levels and appearance of Nestin<sup>(+)</sup>-myofibroblasts. Furthermore, the treatment of pulmonary fibroblasts with putative pro-fibrotic peptide growth factors increased Nestin protein levels. Lastly, in the lungs of type 1 diabetic rats, the absence of a reactive fibrotic response was associated with a significant downregulation of Nestin protein/mRNA levels. Finally, the third study represented an extension of the second study and examined chronic lung remodeling in an established model of pulmonary hypertension. The lungs of adult male rats subjected to 3 weeks of hypobaric hypoxia were associated with vascular remodeling, reactive fibrosis and increased Nestin protein and mRNA levels. Moreover, Nestin, rather than smooth muscle  $\alpha$ -actin expression was identified as a more relevant marker of activated pulmonary fibroblasts. Furthermore, the appearance of activated pulmonary fibroblasts may be derived in part from resident fibroblasts and secondary to endothelial-mesenchymal transition and epithelial-

mesenchymal transition. Collectively, these studies have demonstrated that distinct populations of Nestin-expressing cells play a seminal role in cardiac reparative fibrosis and pulmonary reactive fibrosis.

**Key words**

Nestin

Myocardial infarction

Neural progenitor/stem cell

Neurogenesis

Diabetes

Pulmonary hypertension

Reparative and reactive fibrosis

Fibroblasts

Endothelial-mesenchymal transition

Epithelial-mesenchymal transition



1.1.3.3 La physiopathologie de l'infarctus du myocarde.....	28
1.1.3.3.1 La région ischémique.....	30
1.1.3.3.1.1 La mort des cardiomyocytes via nécrose et apoptose cellulaire.....	30
1.1.3.3.1.2 La phase inflammatoire.....	34
1.1.3.3.1.3 La phase proliférative associée à la fibrose réparative permet la formation de la cicatrice cardiaque.....	38
1.1.3.3.1.3.1 Les myofibroblastes cardiaques dans la phase proliférative.....	39
1.1.3.3.1.3.2 L'angiogenèse contribue à la fibrose réparative.....	45
1.1.3.3.1.3.2.1 L'angiogenèse et la Nestine.....	46
1.1.3.3.1.3.3 La neurogenèse contribue à la fibrose réparative.....	54
1.1.3.3.1.3.3.1 La neurogenèse et la Nestine.....	57
1.1.3.3.1.3.3.2 La protéine GAP43.....	61
1.1.3.3.2 La région non ischémisée.....	62
1.1.3.3.2.1 La fibrose réactive.....	62
1.1.3.4 Le diagnostic de l'infarctus du myocarde.....	65
1.1.3.5 Les traitements actuels de l'infarctus du myocarde.....	71
1.1.3.5.1 La reperfusion est instaurée le plus rapidement possible lors d'un infarctus STEMI.....	71
1.1.3.5.2 Les traitements à long terme de l'infarctus du myocarde.....	75
1.1.3.5.2.1 Les bêta-bloqueurs.....	75
1.1.3.5.2.2 Les vasodilatateurs.....	76
1.1.3.5.2.3 Les inhibiteurs du système Rénine-Angiotensine-Aldostérone.....	77
1.1.3.5.2.4 Les agents antithrombotiques.....	79
1.1.3.5.2.5 Les thérapies émergentes favorisant la régénération des cardiomyocytes.....	81
1.1.4 L'hypertrophie cardiaque.....	87
1.1.4.1 L'hypertrophie cardiaque physiologique.....	87
1.1.4.2 L'hypertrophie cardiaque pathologique.....	89
1.1.4.2.1 L'hypertrophie cardiaque pathologique excentrique.....	89
1.1.4.2.2 L'hypertrophie cardiaque pathologique concentrique.....	90
1.2 LES POUMONS.....	92

<i>1.2.1 Physiologie pulmonaire</i> .....	92
1.2.1.1 Les zones de conduction et respiratoire du système respiratoire .....	92
1.2.1.1.1 L'arbre bronchique de la zone de conduction du système respiratoire.....	94
1.2.1.1.2 Les lobules et les alvéoles pulmonaires de la zone respiratoire du système respiratoire .....	95
1.2.1.1.3 Les échanges gazeux pulmonaires se font au niveau de la membrane alvéolocapillaire en fonction de la pression partielle de chacun des gaz.....	97
1.2.1.2 La ventilation pulmonaire .....	101
1.2.1.2.1 La tension superficielle du liquide alvéolaire affecte la ventilation pulmonaire .....	103
1.2.1.2.2 La compliance pulmonaire influence la ventilation pulmonaire.....	103
1.2.1.2.3 La résistance des conduits aériens a un impact sur la ventilation pulmonaire .....	104
<i>1.2.2 Types cellulaires présents au niveau des alvéoles pulmonaires</i> .....	105
1.2.2.1 Les cellules alvéolaires épithéliales .....	105
1.2.2.1.1 Les cellules alvéolaires épithéliales de type I .....	105
1.2.2.1.2 Les cellules alvéolaires épithéliales de type II.....	106
1.2.2.1.2.1 Le surfactant.....	107
1.2.2.1.3 Les fonctions supplémentaires des CAE.....	108
1.2.2.1.3.1 Le transport d'ions et de fluides pour assurer le maintien de l'homéostasie du liquide alvéolaire .....	108
1.2.2.1.3.2 Les mécanismes de défense de l'organisme par les CAE.....	112
1.2.2.2 Les myofibroblastes pulmonaires .....	113
1.2.2.2.1 Les myofibroblastes à travers l'organisme .....	113
1.2.2.2.2 L'origine des myofibroblastes pulmonaires.....	117
1.2.2.2.3 La fonction des fibroblastes pulmonaires en situation physiologique et des myofibroblastes pulmonaires lors de la fibrose pulmonaire .....	121
<i>1.2.3 L'hypertension pulmonaire</i> .....	123
1.2.3.1 Définition, diagnostic et classification de l'hypertension pulmonaire.....	123
1.2.3.2 Les thérapies actuelles de l'hypertension pulmonaire .....	128
1.2.3.2.1 Les thérapies actuelles de l'hypertension artérielle pulmonaire .....	128

1.2.3.2.2 Les thérapies actuelles de l'hypertension pulmonaire associée aux maladies du cœur gauche .....	131
1.3 LE DIABÈTE .....	134
1.3.1 Le métabolisme du glucose .....	135
1.3.2 Les types de diabète .....	138
1.3.2.1 Le diabète de type 1 .....	138
1.3.2.1.1 Les thérapies du diabète de type 1 .....	140
1.3.2.2 Le diabète de type 2 .....	141
1.3.2.2.1 Les thérapies du diabète de type 2 .....	143
1.3.3 Les complications du diabète .....	147
1.3.3.1 Les complications microvasculaires du diabète .....	148
1.3.3.1.1 Les neuropathies diabétiques .....	149
1.3.3.1.2 La néphropathie diabétique .....	150
1.3.3.1.3 La rétinopathie diabétique .....	151
1.3.3.2 Les complications macrovasculaires du diabète .....	152
1.3.3.2.1 Les maladies cardiovasculaires .....	153
1.3.3.2.1.1 L'infarctus du myocarde .....	154
1.3.3.2.1.2 L'insuffisance cardiaque et la cardiomyopathie diabétique .....	154
1.3.3.2.1.3 L'accident vasculaire cérébral .....	155
1.3.3.2.2 La maladie des artères périphériques .....	156
1.3.4 Les impacts du diabète sur le remodelage cardiaque et pulmonaire .....	157
1.3.4.1 Le diabète induit des effets délétères au niveau de la région non-ischémisée du myocarde et sur la fonction cardiaque .....	157
1.3.4.2 Le diabète altère la fibrose réparative permettant la formation de la cicatrice cardiaque .....	158
1.3.4.2.1 Le diabète altère la réponse angiogénique .....	158
1.3.4.2.2 Le diabète altère la réponse neurogénique .....	160
1.3.4.3 Le diabète entraîne un remodelage pulmonaire dysfonctionnel .....	162
1.3.5 Le diabète et la Nestine .....	165
1.4 LA NESTINE .....	167
1.4.1 Les filaments intermédiaires .....	167

1.4.2	<i>La protéine filamenteuse intermédiaire Nestine et son gène</i> .....	171
1.4.3	<i>L'expression de la Nestine dans l'organisme</i> .....	176
1.4.3.1	Les cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine <sup>(+)</sup> (CSNPRCN <sup>(+)</sup> ) .....	178
1.4.3.2	Les cellules Nestine <sup>(+)</sup> ressemblant à des cardiomyocytes .....	183
1.4.4	<i>Les rôles de la Nestine</i> .....	186
1.4.4.1	Le rôle de la Nestine dans la neurogenèse à travers l'organisme .....	186
1.4.4.2	Le rôle de la Nestine dans l'angiogenèse à travers l'organisme.....	186
1.4.4.3	Le rôle de la Nestine dans la différenciation, la survie et la prolifération cellulaire.....	187
1.5	<b>L'EMT ET L'ENDMT</b> .....	193
1.5.1	<i>La transition épithélio-mésenchymateuse</i> .....	193
1.5.1.1	Les trois sous-types d'EMT .....	196
1.5.1.1.1	L'EMT de type 1 est associée à la croissance physiologique .....	196
1.5.1.1.2	L'EMT de type 2 est associée à la réparation et à la fibrose tissulaire ....	197
1.5.1.1.3	L'EMT de type 3 contribue à la progression des cancers via la formation de métastases .....	201
1.5.1.2	La Nestine et l'EMT .....	203
1.5.2	<i>La transition endothélio-mésenchymateuse</i> .....	205
1.6	<b>JUSTIFICATION DES ÉTUDES</b> .....	209
1.6.1	<i>Justification du premier article</i> .....	209
1.6.2	<i>Justification du second article</i> .....	211
1.6.3	<i>Justification du troisième article</i> .....	212
<b>CHAPITRE 2 : LA RÉPONSE NEUROGÉNIQUE DES CELLULES RÉSIDENTES CARDIAQUES NESTINE<sup>(+)</sup> EST ASSOCIÉE AVEC UNE RÉGULATION À LA HAUSSE DE GAP43 QUI EST ABOLIE EN SITUATION DE DIABÈTE DE TYPE 1</b> .....		<b>214</b>
2.1	ABSTRACT .....	216
2.2	BACKGROUND.....	217
2.3	METHODS .....	218
2.4	RESULTS .....	221
2.5	DISCUSSION .....	233

2.6 CONCLUSION .....	238
2.7 REFERENCES.....	239
<b>CHAPITRE 3 : LA NESTINE EST UN MARQUEUR PRÉCOCE DE REMODELAGE PULMONAIRE SECONDAIRE À L'INFARCTUS DU MYOCARDE ET AU DIABÈTE DE TYPE 1 .....</b>	<b>242</b>
3.1 ABSTRACT .....	244
3.2 BACKGROUND.....	245
3.3 METHODS .....	246
3.4 RESULTS .....	250
3.5 DISCUSSION .....	274
3.6 CONCLUSION .....	278
3.7 REFERENCES.....	278
<b>CHAPITRE 4 : LA TRANSITION DES CELLULES ENDOTHÉLIALES ET ÉPITHÉLIALES À UN PHÉNOTYPE MÉSENCHYMATEUX A ÉTÉ DÉLIMITÉE PAR L'EXPRESSION DE LA NESTINE .....</b>	<b>282</b>
4.1 ABSTRACT .....	284
4.2 BACKGROUND.....	284
4.3 MATERIALS AND METHODS .....	286
4.4 RESULTS .....	291
4.5 DISCUSSION .....	316
4.6 CONCLUSION .....	320
4.7 LITERATURE CITED.....	320
<b>CHAPITRE 5 : DISCUSSION.....</b>	<b>324</b>
5.1 SOMMAIRE DES NOUVELLES DÉCOUVERTES .....	325
5.1.1 <i>Nouvelles découvertes via l'article 1 (Chapitre 2)</i> .....	325
5.1.2 <i>Nouvelles découvertes via l'article 2 (Chapitre 3)</i> .....	326
5.1.3 <i>Nouvelles découvertes via l'article 3 (Chapitre 4)</i> .....	328
5.2 IMPLICATION DE LA NESTINE DANS LE REMODELAGE CARDIAQUE .....	330
5.2.1 <i>L'expression pléiotropique de la Nestine au niveau de divers types cellulaires cardiaques à la suite d'un infarctus du myocarde.....</i>	330
5.2.1.1 La Nestine et les fibroblastes cardiaques activés .....	331
5.2.1.2 La Nestine et les CSNPRCN <sup>(+)</sup> .....	332



5.2.1.2.1 La Nestine et la différenciation des CSNPRCN <sup>(+)</sup> .....	332
5.2.1.2.1.1 La GAP43 et la différenciation des CSNPRCN <sup>(+)</sup> .....	333
5.2.1.2.1.2 Implication de l'inflammation dans la différenciation des CSNPRCN <sup>(+)</sup> .....	336
5.2.2 <i>L'impact du diabète sur l'expression de la Nestine par les CSNPRCN<sup>(+)</sup> dans la réponse de fibrose réparative cardiaque</i> .....	339
5.2.2.1 Le modèle chimique de DT1 chez le rat via la STZ .....	339
5.2.2.2 L'induction de l'infarctus du myocarde chez des rats DT1 .....	341
5.2.2.3 La surimposition du DT1 chez des rats ayant subi un infarctus du myocarde atténue la réponse neurogénique des CSNPRCN <sup>(+)</sup> .....	342
5.2.2.4 Le DT1 instauré chez des rats atténue la réponse neurogénique des CSNPRCN <sup>(+)</sup> provoquée par l'administration de 6-HD .....	344
5.2.2.5 L'hyperglycémie plasmatique est-elle responsable de la réponse neurogénique altérée des CSNPRCN <sup>(+)</sup> ? .....	345
5.2.2.6 Quels sont les impacts de la surimposition du DT1 chez des rats ayant subi un infarctus du myocarde sur la réponse angiogénique des CSNPRCN <sup>(+)</sup> ? .....	347
5.2.2.7 Application des résultats de l'article 1 aux patients diabétiques .....	348
5.2.2.8 L'environnement affecte significativement la plasticité des CSNPN <sup>(+)</sup> .....	349
5.3 IMPLICATION DE LA NESTINE DANS LE REMODELAGE PULMONAIRE .....	352
5.3.1 <i>L'expression de la Nestine lors du développement post-natal et à l'âge adulte au niveau du tissu pulmonaire</i> .....	352
5.3.2 <i>L'expression de la Nestine lors d'une pathologie fibrotique pulmonaire aiguë secondaire à l'infarctus du myocarde chez le rat</i> .....	353
5.3.2.1 Application des observations chez les rats MI 1 semaine aux patients ayant succombé à l'insuffisance cardiaque .....	358
5.3.3 <i>L'expression de la Nestine lors du remodelage pulmonaire secondaire au DT1 chez le rat</i> .....	359
5.3.4 <i>L'expression de la Nestine lors d'une pathologie fibrotique pulmonaire chronique chez le modèle de rat hypoxique</i> .....	361
5.3.4.1 Caractérisation du modèle de rat hypoxique hypobarique d'hypertension pulmonaire .....	361

5.3.4.2 La Nestine en tant que marqueur spécifique des fibroblastes pulmonaires activés .....	364
5.3.4.3 La transition des cellules épithéliales pulmonaires à un phénotype mésenchymateux est associée avec l'expression de la Nestine .....	365
5.3.4.4 La transition des cellules endothéliales pulmonaires à un phénotype mésenchymateux est associée avec l'expression de la Nestine .....	369
5.3.5 <i>Les mécanismes potentiels régulant l'expression de la Nestine dans les processus de remodelage pulmonaire</i> .....	371
5.3.5.1 Les facteurs pro-fibrotiques stimulent l'expression de la Nestine dans les processus de remodelage pulmonaire .....	371
5.3.5.2 Les membres de la famille des miR125b ne sont pas des facteurs déterminants dans les processus de remodelage pulmonaire.....	373
5.3.5.3 La voie TGF- $\beta_1$ /Smad3 est impliquée dans l'expression de la Nestine lors des processus de fibrose réactive pulmonaire .....	374
<b>CHAPITRE 6 : CONCLUSION</b> .....	<b>377</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>380</b>

# LISTE DES TABLEAUX

## Chapitre 1 : Introduction

### Section 1.1 : Le cœur

Tableau 1 : Marqueurs communs des fibroblastes..... 17

Tableau 2 : Définition actuelle d'un infarctus du myocarde récent, aigu ou évoluant.....65

### Section 1.2 : Les poumons

Tableau 3 : Les myofibroblastes expriment de nombreux récepteurs de médiateurs solubles ainsi que des protéines d'adhésion.....116

Tableau 4 : Les médiateurs solubles sécrétés par les myofibroblastes..... 116

Tableau 5 : Classification actualisée en 2013 de l'hypertension pulmonaire..... 125

### Section 1.3 : Le diabète

Tableau 6 : Les critères diagnostiques du diabète.....134

### Section 1.4 : La Nestine

Tableau 7 : Les 6 grands types de filaments intermédiaires.....168

## Chapitre 2 : Premier article

Table 1 : Body weight, heart weight and hemodynamic parameters of sham, streptozotocin-treated (STZ), myocardial infarcted (MI) and streptozotocin-treated myocardial infarcted (MI +STZ) rats..... 226

## Chapitre 3 : Second Article

Table 1 : Body, heart and lung weights of sham and myocardial infarcted rats..... 255

Table 2 : Left and right ventricular contractile function of sham and 1-week post myocardial infarcted rats..... 255

Table 3 : Body, heart and lung weights of non-diabetic and streptozotocin (STZ)-injected rats.....	263
Table 4 : Left and right ventricular contractile function of non-diabetic and streptozotocin (STZ)-injected rats.....	263
Table 5 : Regulation of the miR-125b family in neonatal rat pulmonary fibroblasts following exposure to pro-fibrotic stimuli.....	271

**Chapitre 4 : Troisième article**

Suppl Table 1 S1: Primers for real-time PCR analysis of mRNA expression in rat tissues and cells.....	290
Table 1 : Body, heart and lung weights, hematocrit and Fulton’s index of sham and hypobaric hypoxic rats.....	296
Table 2 : MAP, left and right ventricular contractile function of sham and hypobaric hypoxic rats.....	296

# LISTE DES FIGURES

## Chapitre 1 : Introduction

### Section 1.1 : Le cœur

Figure 1 : Le péricarde, les parois du cœur et l'anatomie interne du cœur.....	3
Figure 2 : Le système de conduction cardiaque.....	5
Figure 3 : Histologie des cardiomyocytes.....	8
Figure 4 : Schématisation d'un sarcomère et d'un filament fin.....	9
Figure 5 : Les marqueurs des cardiomyocytes.....	10
Figure 6 : La régénération et l'hypertrophie cardiaque lors de la phase embryonnaire, suite à la naissance et lors d'un stress pathologique .....	13
Figure 7 : L'origine des fibroblastes cardiaques.....	19
Figure 8 : Fonctions des fibroblastes cardiaques .....	19
Figure 9 : Taux annuel des premières crises cardiaques selon l'âge, le sexe et la race .....	24
Figure 10: Le développement de la plaque d'athérosclérose.....	27
Figure 11 : Schématisation de la phase Nécrotique/Inflammatoire et de la phase Réparative/Proliférative qui sont induites à la suite d'un infarctus du myocarde .....	31
Figure 12 : Les lésions irréversibles des cardiomyocytes surviennent à environ 20 à 40 minutes suivant l'occlusion de l'artère coronaire.....	31
Figure 13 : Représentation de la progression de la nécrose myocardique à la suite de l'occlusion d'une artère coronaire .....	33
Figure 14 : Les fibroblastes cardiaques résidents du myocarde ischémié contribuent à la réponse inflammatoire .....	36
Figure 15 : Les marqueurs des myofibroblastes isolés de la cicatrice cardiaque .....	40
Figure 16 : La transdifférenciation des fibroblastes ventriculaires en myofibroblastes cicatriciels .....	44
Figure 17 : Les cardiosphères CM-Dil <sup>(+)</sup> transplantées contribuent à la formation <i>de novo</i> vaisseaux sanguins Nestine <sup>(+)</sup> dans la région ischémiée .....	47
Figure 18 : Les cardiosphères CM-Dil <sup>(+)</sup> transplantées acquièrent un phénotype de CML Desmine <sup>(+)</sup> et contribuent à l'angiogenèse de la région ischémiée .....	48

Figure 19 : Les cardiosphères CM-Dil <sup>(+)</sup> transplantées acquièrent un phénotype de cellule endothéliale eNOS <sup>(+)</sup> et contribuent à l'angiogenèse de la région ischémisée .....	48
Figure 20 : Schématisation de la construction du plasmide Nestine-GFP .....	51
Figure 21 : Les cellules Nestine <sup>(+)</sup> /GFP <sup>(+)</sup> sont présentes au niveau du myocarde de souris transgéniques Nestine-GFP adultes .....	51
Figure 22 : Suite à l'infarctus du myocarde, la vascularisation réparative est associée avec la formation <i>de novo</i> vaisseaux GFP <sup>(+)</sup> /Nestine <sup>(+)</sup> /CD31 <sup>(+)</sup> .....	52
Figure 23 : La signalisation associée à l'hyperinnervation sympathique à la suite de l'infarctus du myocarde.....	55
Figure 24 : Suite à un infarctus du myocarde chez le rat, la région cicatricielle et entourant la cicatrice présente des fibres Neurofilament-M <sup>(+)</sup> /Nestine <sup>(+)</sup> .....	58
Figure 25 : La neurogenèse de la région cicatricielle via les cellules résidentes cardiaques Nestine <sup>(+)</sup> ayant un phénotype de cellule souche neurale progénitrice est indépendant de la neurogenèse via le ganglion stellaire gauche.....	60
Figure 26 : La fibrose réactive et réparative cardiaque à la suite de l'infarctus du myocarde .	64
Figure 27 : Une élévation du segment ST sur l'électrocardiogramme est souvent associée à un infarctus STEMI.....	66
Figure 28 : Schématisation temporelle de la relâche de biomarqueurs cardiaques à la suite d'un infarctus du myocarde aigu (STEMI ou NSTEMI) .....	70
Figure 29 : Impact des délais de reperfusion à la suite de l'ischémie myocardique.....	74
Figure 30 : La reperfusion entraîne des lésions de reperfusion en bandes de contraction.....	74
Figure 31: Les avenues thérapeutiques émergentes étudiées afin d'améliorer la survie à la suite d'un infarctus du myocarde .....	83
Figure 32 : Schématisation de l'hypertrophie cardiaque pathologique excentrique et concentrique, ainsi que de l'hypertrophie cardiaque physiologique excentrique .....	88

## **Section 1.2 : Les poumons**

Figure 33 : La zone de conduction du système respiratoire.....	93
Figure 34 : L'arbre bronchique de la zone de conduction du système respiratoire .....	94
Figure 35 : La zone respiratoire du système respiratoire.....	96

Figure 36 : Constituants d'une alvéole et de la membrane alvéolocapillaire .....	97
Figure 37 : L'oxygène et le dioxyde de carbone suivent leurs variations de pressions partielles lors de la respiration externe et interne .....	99
Figure 38 : Schématisation de la ventilation pulmonaire.....	102
Figure 39 : Les canaux exprimés par les CAEI et CAEII.....	111
Figure 40 : Phénotype prénatal et périnatal de l'épithélium alvéolaire .....	111
Figure 41 : Les myofibroblastes produisent de nombreuses molécules de la matrice extracellulaire.....	115
Figure 42 : La formation des myofibroblastes différenciés .....	117
Figure 43 : Interactions entre le TGF- $\beta$ 1 et l'ECM chez les myofibroblastes pulmonaires...	119
Figure 44 : Les myofibroblastes pulmonaires en culture expriment l' $\alpha$ -SMA, la $\beta$ -actine cytoplasmique et la Vimentine.....	119
Figure 45 : Les cellules progénitrices des myofibroblastes activés à travers l'organisme lors de pathologies fibrotiques.....	120
Figure 46 : Voies responsables des dysfonctions endothéliales lors d'hypertension artérielle pulmonaire et les solutions pharmacologiques de cette pathologie .....	130

### **Section 1.3: Le diabète**

Figure 47 : Le métabolisme du glucose .....	137
---	-----

### **Section 1.4 : La Nestine**

Figure 48 : Structure et assemblage des protéines filamenteuses intermédiaires .....	170
Figure 49 : La Nestine est une protéine filamenteuse intermédiaire de grande taille.....	172
Figure 50 : La Structure du domaine central d'hélice- $\alpha$ des protéines filamenteuses intermédiaires et de la Nestine .....	172
Figure 51 : Les gènes <i>Nestine</i> humain, de rat et de souris.....	175
Figure 52 : Caractérisation des CSNPRCN <sup>(+)</sup> .....	179
Figure 53 : La plasticité des cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine <sup>(+)</sup> .....	182
Figure 54 : Les cellules Nestine <sup>(+)</sup> ressemblant à des cardiomyocytes.....	184

Figure 55 : Le rôle de la Nestine dans la différenciation des myoblastes via sa régulation de la signalisation de CDK5 ..... 189

Figure 56 : L'EGF et son récepteur régulent la prolifération des CMLV en augmentant l'expression de la Nestine ..... 192

### **Section 1.5 : L'EMT et l'EndMT**

Figure 57 : Le processus d'EMT ..... 194

Figure 58 : L'EMT de type 1 ..... 197

Figure 59 : L'EMT de type 2 ..... 197

Figure 60 : L'EMT de type 3 ..... 203

Figure 61 : Schématisation du processus d'EndMT en situation de fibrose pathologique tissulaire ..... 206

### **Chapitre 2 : Premier article**

Figure 1: Neurofilament-M and GAP43 expression by nestin<sup>(+)</sup> cells in the heart of sham and 1 week post-MI rat hearts ..... 224

Figure 2 : Nestin and GAP43 protein expression in non-diabetic and diabetic infarcted rat hearts ..... 227

Figure 3 : The impact of type I diabetes on the neurogenic response of cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> cells during scar formation/healing of the myocardial infarcted rat heart ..... 229

Figure 4 : The impact of type I diabetes on the neurogenic response of cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> cells following administration of 6-hydroxydopamine ..... 232

### **Chapitre 3 : Second article**

Figure 1 : Adult and neonatal rat lung contains nestin<sup>(+)</sup> cells and a subpopulation exhibit a myofibroblast phenotype ..... 252

Suppl Figure 1 : Adult rat lung contains Nestin<sup>(+)</sup> cells, which are not alveolar epithelial type I or type II cells ..... 253

Suppl Figure 2 : Neonatal rat nestin<sup>(+)</sup> pulmonary cells exhibit a myofibroblast phenotype.. 254



Figure 2 : Pulmonary remodeling of 1-week post-MI rats and patients that succumbed to heart failure .....	259
Suppl Figure 3. MI rat nestin <sup>(+)</sup> pulmonary cells exhibit a myofibroblast phenotype .....	260
Figure 3 : Profibrotic stimuli induce nestin expression in pulmonary fibroblasts.....	262
Suppl Figure 4 : Type I diabetes reduces expression of Nestin <sup>(+)</sup> cells, but the staining persist in pulmonary vascular endothelial cells.....	264
Figure 4 : Pulmonary remodeling of 1-week type I diabetic rats .....	266
Figure 5 : Nestin and miR-125b expression during physiological and pathological lung remodeling .....	270
Figure 6 : Nestin <sup>(+)</sup> cells morphologically distinct from pulmonary fibroblasts were identified in rodent lungs.....	273

### **Chapitre 3 : Troisième article**

Suppl Figure 1 : Alveolar and perivascular fibrosis and vessel remodeling in rats exposed to hypobaric hypoxia.....	295
Figure 1 : Gene expression in the lungs of hypobaric hypoxic rats.....	297
Suppl Figure 2 : Right ventricular remodeling of rats exposed to hypobaric hypoxia. ....	300
Figure 2 : Protein expression in the lungs of hypobaric hypoxic rats.....	303
Figure 3 : Nestin and collagen type I staining of normal adult rat pulmonary fibroblasts and lungs of rats exposed to hypobaric hypoxia.....	305
Suppl Figure 3 : Nestin and smooth muscle $\alpha$ -actin staining in the lungs of normoxic rats. .	306
Figure 4 : Nestin protein and mRNA expression in pulmonary fibroblasts treated with a panel of peptide growth factors. ....	308
Figure 5 : Displaced CD31 <sup>(+)</sup> -endothelial cells and epithelial cells exhibit a mesenchymal phenotype in the lungs of hypobaric hypoxic rats. ....	310
Suppl Figure 4 : E-cadherin and CD31 protein expression in the lungs of hypobaric hypoxic rats.....	311
Figure 6 : The <i>in vitro</i> transition of rat alveolar epithelial cells to a mesenchymal phenotype was associated with nestin expression. ....	315

## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

AC	Adénylate Cyclase
ACC	<i>American College of Cardiology</i>
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AD	<i>ADult</i>
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
ADP	Adénosine DiPhosphate
aFGF R	<i>α Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
AGE	<i>Advanced Glycation End products</i>
AHA	<i>American Heart Association</i>
Ang II	Angiotensine II
AINS	Anti-Inflammatoire Non-Stéroïdien
ALK1	<i>Activin-Like receptor Kinase-1</i>
αMHC	<i>alpha Myosin Heavy Chain</i>
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ANOVA	<i>ANalysis Of VAriance</i>
ANP	<i>Atrial Natriuretic Peptide</i>
AQP5	AQuaPorine 5
ARA	Antagonistes des Récepteurs de l'Angiotensine
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
α-SMA	<i>Smooth Muscle α-Actin</i>
AT <sub>1</sub> R	le Récepteur de type 1 de l'Angiotensine II
ATP	Adénosine TriPhosphate
A-type	Myofibroblaste qui exprime l'α-actine des muscles lisses
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
βIIIT	β-tubuline de classe III
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BB	Isoenzyme de la créatine kinase surtout retrouvé dans le cerveau ( <i>Brain</i> )
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BMP-7	<i>Bone Morphogenic Protein-7</i>
BMPR2	<i>Bone Morphogenetic Protein Receptor type II</i>
BNP	<i>Brain Natriuretic Peptide</i>
BW	<i>Body Weight</i>
CABG	<i>Coronary Artery Bypass Grafting</i>
CADUCEUS	<i>CArdiosphere-Derived aUtologous stem CElls to reverse ventricUlar dySfunction</i>

CAEI	Cellules Alvéolaires Épithéliales de type I
CAEII	Cellules Alvéolaires Épithéliales de type II
CAV1	<i>CAVeolin-1</i>
CD18	<i>Integrin-β2</i>
CD31	<i>Cluster of Differentiation 31</i>
CD36	<i>thrombospondin receptor</i>
CD40	<i>TNF receptor superfamily member 5</i>
CDC2	<i>Cell Division Cycle 2 kinase</i>
CDK1/CDK5	<i>Cyclin Dependant Kinase 1, Cyclin Dependant Kinase 5</i>
CE	Cellules Endothéliales
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Receptor</i>
CGM	<i>Continuous Glucose-Monitoring</i>
c-kit	<i>proto-oncogene c-kit</i> ou <i>CD117</i>
CK-BB	<i>Creatine Kinase Brain type</i>
CK-MM	<i>Creatine Kinase Muscle type</i>
CIC5/CIC2	<i>Chloride Channel 5 / Chloride Channel 2</i>
CMLV	Cellule Musculaire Lisse Vasculaire
CNG	<i>Cyclic Nucleotide-Gated channel</i>
CO	Monoxyde de Carbone
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de Carbone
Coil-1	domaine d'hélice-1 du domaine central des protéines filamenteuses
Coll α <sub>1</sub> /Coll α <sub>3</sub>	<i>Collagen α<sub>1</sub> and α<sub>3</sub></i>
COOH	queue carboxy-terminale
COX-1	Cyclo-Oxygénase-1
CSC	Cellules Souches Cancéreuses mammaires
CSF-1	<i>Colony-Stimulating Factor-1</i>
CSNP	Cellules Souches Neurales Progénitrices
CSNPRCN <sup>(+)</sup>	Cellules Souches Neurales Progénitrices Résidentes Cardiaques Nestine <sup>(+)</sup>
C-Src	<i>Tyrosine-protein kinase CSK</i>
CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>
DAG	DiAcylGlycérol
DAMP	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
DCCT	<i>Diabetes Control and Complications Trial</i>
DDR-2	<i>Discoidin Domain Receptor 2</i>
DL <sub>CO</sub>	<i>Diffusion capacity of the Lungs for Carbon Monoxide</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DOPA	6-hydroxydopamine
dP/dt	dérivée de la pression/dérivée du temps
DPP-4	DiPeptidylPeptidase-4
DT1	Diabète de Type 1
D-type	Myofibroblaste qui exprime la Desmine
ECA	Enzyme de Conversion de l'Angiotensine II

E-Cadhérine	Cadhérine Épithéliale
ECG	ÉlectroCardioGramme
ECL	<i>Enhanced ChemoLuminescence</i>
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
ED-A	<i>Extra Domain-A de la fibronectine</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFP	<i>Enhanced GFP</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EMPHASIS-HF	<i>Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And Survival Study in Heart Failure</i>
EMT	<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>
ENA-78	<i>Epithelial Neutrophil-Activating peptide 78</i>
ENABLE	<i>Endothelin Antagonist Bosentan for Lowering cardiac Event in heart failure</i>
ENaC	<i>Epithelial sodium Channel</i>
EndMT	<i>Endothelial-Mesenchymal Transition</i>
ENG	<i>ENdoGline</i>
eNOS	<i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
EPHESUS	<i>Eplerenone Post-acute myocardial infarction Heart failure Efficacy and Survival Study</i>
ErbB1	Récepteur de l'EGF
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
ET-1	EndoThéline-1
ET <sub>B2/A</sub>	Récepteurs de l'Endothéline
FAP1	<i>Fibroblast Activation Protein-1</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FEV1	<i>Forced Expiratory Volume in 1 second</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FIRST	<i>Flolan International Randomized Survival Trial</i>
FPG	<i>Fasting Plasma Glucose</i>
FSA	<i>Fibroblast Surface Antigen</i>
FSP-1 (S100A4)	<i>Fibroblast-Specific Protein 1</i>
FVC	<i>Forced Vital Capacity</i>
G	Protéine G
G <sub>q</sub>	
G <sub>s</sub>	Protéine G stimulatrice
GABA <sub>A</sub>	<i>Ionotropic <math>\gamma</math>-aminobutyric acid type A</i>
GAP43	<i>Growth Associated Protein 43</i>
GAPDH	<i>GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase</i>
GATA4	<i>GATA binding protein 4</i>
GCs	Guanylate Cyclase soluble

GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GIP	<i>Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide</i>
GLP-1	<i>Glucagon-Like Peptide-1</i>
GLUT	<i>GLUcose Transporter</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
GMPc	Guanosine MonoPhosphate cyclique
GPIIb/IIIa	<i>GlycoProtein IIb/IIIa</i>
GRO-1 $\alpha$	<i>melanoma GROwth-stimulatory activity</i>
GSG	Ganglion Stellaire Gauche
GTP	Guanosine TriPhosphate
<sup>3</sup> H-thymidine	tritium radioactif
6-HD	6-HydroxyDopamine
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HbA1c	Hémoglobine Glycosylée
HDL	<i>High-Density Lipoproteins</i>
HED	C <sub>11</sub> -hydroxyéphédrine
HEPES	<i>4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid</i>
HETEs	<i>HydroxyEicosaTetraEnoic acids</i>
Hg	Mercure
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HMGB1	<i>High Mobility Group Box 1</i>
HPC	Hémangiomatose Capillaire Pulmonaire
HPRT	<i>Hypoxanthine guanine PhosphoRibosylTransferase</i>
HSC	<i>Highly Selective sodium Channel</i>
HSP47	<i>Heat Shock Protein-47</i>
HSPG	<i>Heparan Sulfate ProteoGlycans</i>
HTAP	HyperTension Artérielle Pulmonaire
IA-2 et IA-2 $\beta$	autoanticorps de la tyrosine phosphatase membranaire
ICAM-1	<i>IntraCellular Adhesion Molecule-1</i>
IECA	Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine
IgG	ImmunoGlobuline de type G
IGF	<i>Insuline-like Growth Factor</i>
IL	InterLeukines
IM	Infarctus du Myocarde
IMC	Indice de Masse Corporelle
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
IP	Récepteur de la Prostacycline
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trisPhosphate
IP-10	<i>Inducible Protein-10</i>
IRS-1	<i>Insulin Receptor Substrat-1</i>

ISIS-2	<i>Second International Study of Infarct Survival</i>
ITS	<i>Insulin-Transferrin-Selenium</i>
K <sup>+</sup>	ions potassiques
KCNK3	<i>Potassium Channel subfamily K member 3</i>
kDa	KiloDalton
KGF	<i>Keratinocyte Growth Factor</i>
LAD	<i>Left Anterior Descending artery</i>
LAP	<i>Latency Associated Peptide</i>
LDL	<i>Low-Density Lipoproteins</i>
LSN	Limite Supérieure de la Normale
LTBP	<i>Latent TGF-<math>\beta</math> Binding Protein</i>
LV	<i>Left Ventricle</i>
LV + dP/dt	<i>rate of Left Ventricular contraction</i>
LV - dP/dt	<i>rate of Left Ventricular relaxation</i>
LVEDP	<i>Left Ventricular End-Diastolic Pressure</i>
LVSP	<i>Left Ventricular Systolic Pressure</i>
MAP	<i>Mean Arterial Pressure</i>
MAP-2	<i>Microtubule-Associated Protein 2</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MET	<i>Mesenchymal-Epithelial Transition</i>
MI	<i>Myocardial Infarction</i>
MI3J	rats mâles ayant subi un infarctus du myocarde 3 jours auparavant
MIP	<i>Macrophage Protein</i>
miR	<i>micro RNA, Micro ARN</i>
MM	Isoenzyme de la créatine kinase surtout retrouvé dans les muscles ( <i>Muscle</i> )
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
MOSP	<i>Myelin Oligodendrocyte Specific Protein</i>
mPAP	<i>mean Pulmonary Arterial Pressure</i>
MPF	<i>maturation/M-phase- Promoting Factor</i>
MPI	Maladie Pulmonaire Interstitielle
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MUC1	<i>MUCin-1</i>
N	Nombre d'individus
NaK-ATPase	pompe sodium-potassium Adénosine Triphosphatase
N-Cadhérine	Cadhérine Neurale
NCAM-1	<i>Neural Cell Adhesion Molecule-1</i>
ND	<i>Not Detected</i>
Neurofilament-M	<i>Neurofilament-Medium</i>
NF-H	<i>NeuroFilament-High</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor-<math>\kappa</math>B</i>
NF-L	<i>NeuroFilament-Light</i>

NF-M	<i>NeuroFilament-Medium</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NH <sub>2</sub>	tête amino-terminale
Nkx2.5	<i>NK2 homebox 5</i>
NO	Monoxyde d'azote
NO-GMPc	<i>Nitric Oxide-cyclic Guanosine MonoPhosphate</i>
NN	NeoNatal
NSC	<i>Non-Selective sodium Channel</i>
NSP	NeuroSphères Nestine <sup>(+)</sup>
NSTEMI	<i>Non-ST-segment Elevation Myocardial Infarction</i>
O <sub>2</sub>	dioxygène
OGTT	<i>Oral Glucose Tolerance Test</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P	Valeur de P
P1, P2...	lobe Pulmonaire 1, lobe Pulmonaire 2
P2Y <sub>12</sub>	récepteur de l'ADP présent sur les plaquettes
PAF	<i>Platelet Activating Factor</i>
PAR-1	<i>Protease-Activated Receptor 1</i>
pBSM13+	<i>E. coli phagemid vector BlueScribe M13+</i>
PCI	<i>primary Percutaneous Coronary Intervention</i>
P <sub>CO2</sub>	Pression du dioxyde de carbone
PDE5	PhosphoDiEstérase 5
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PGE2	<i>ProstaGlandine E2</i>
PGI <sub>2</sub>	Prostacycline
pH	potentiel Hydrogène
PI3-K	PhosphatidylInositol-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	PhosphatidylInositol 4,5-bisPhosphate
PKC	Protéine Kinase C
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	PhosphoLipase C
P <sub>O2</sub>	Pression du dioxygène
PPAR <sub>γ</sub>	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ</i>
Pro-SPC	<i>Pro-Surfactant Protein C</i>
PVR	<i>Pulmonary Vascular Resistance</i>
qPCR	<i>Quantitative real-time Polymerase Chain Reaction</i>
R	Récepteur
RALES	<i>Randomized Aldactone Evaluation Study</i>
RANTES	<i>Regulated, upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted</i>
REACH-1	<i>Research on Endothelin Antagonists in Chronic Heart failure</i>
RELAX	<i>phosphodiesterase-5 inhibition to improve clinical status And exercise capacity in diastolic heart failure</i>
RNA	<i>RiboNucleic Acid</i>



ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RS	Réticulum Sarcoplasmique
RV	<i>Right Ventricle</i>
RV + dP/dt	<i>rate of Right Ventricular contraction</i>
RV - dP/dt	<i>rate of Right Ventricular relaxation</i>
RVSP	<i>Right Ventricular Systolic Pressure</i>
SAL	Saline
SCC	Société Canadienne de Cardiologie
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SCIPIO	<i>Stem Cell Infusion in Patients with Ischemic cardiomyopathy</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
S.E.M	<i>Standard Error to Mean</i>
SERCA2	<i>Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase</i>
SGLT-2	<i>Sodium GLucose coTransporter-2</i>
shRNA	<i>microRNA-adapted Short Hairpin RNA</i>
SIP1	<i>Survival of motor neuron protein Interacting Protein 1</i>
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i>
SLRPs	<i>Small Leucine-Rich Proteoglycans</i>
SM $\alpha$ -actin	<i>Smooth Muscle <math>\alpha</math>-Actin</i>
Smad3	Mothers Against Decapentaplegic homolog 3
SNC	Système Nerveux Central
SP1	<i>Specificity Protein 1</i>
SP-A,B,C,D	<i>Surfactant Protein-A, Surfactant Protein-B, ect.</i>
SPARC	<i>Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine</i>
SRA	<i>Scavenger Receptor A</i>
STEMI	<i>ST-segment Elevation Myocardial Infarction</i>
STZ	Streptozotocine
SUR1	<i>SulfonylUrea Receptor-1</i>
SV40 polyA	séquences de polyAdénylation provenant du Virus Simian 40
TEM1 (CD248)	<i>Tumor Endothelial Marker 1</i>
TEP	Tomographie d'Émission de Positrons
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
THY1 (CD90)	<i>Thy-1 cell surface antigen</i>
Tie-2	récepteur de l'angiopoïétine-1
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of MMP</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptors</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
Troponine-C	Troponine dépendante du Calcium
Troponine-I	Troponine Inhibitrice
Troponine-T	Troponine qui lie la Tropomyosine
Type 1	<i>Type 1 diabetes</i>
UKPDS	<i>United Kingdom Prospective Diabetes Study</i>



ULF	<i>Unit Length Filament</i>
UTR	<i>UnTranslated Region</i>
VALIANT	<i>VALsartan In Acute myocardial iNfarcTion</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VD	Ventricule Droit
VE-Cadhérine	Cadhérine Endothéliale Vasculaire
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
VO <sub>2</sub>	Volume de diOxygène
Vs.	Versus
V-type	Myofibroblaste qui exprime la Vimentine
ZDF	<i>Zucker Diabetic Fatty</i>
ZO-1	<i>Zonula Occludens-1</i>

*Je dédie cette thèse à ma belle petite mamie Marguerite,  
qui nous a quittés ce printemps.*

*Ton parcours m'a inspiré mon domaine d'étude en  
cardiovasculaire, puisque je désirais mieux comprendre les  
maladies dont tu souffrais. C'est ainsi que j'ai développé  
mon intérêt pour la pharmacologie et la physiologie.*

*Tu as été une femme inspirante et aimante,  
d'une infinie bonté et générosité,  
qui a toujours été très fière de mes succès,  
qui m'a toujours encouragée à être ambitieuse,  
mais surtout tu as été une seconde mère pour moi.*

# REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier les membres qui composent mon jury de défense de thèse et qui ont accepté avec intérêt de lire et commenter mon ouvrage. Vos connaissances impressionnantes dans vos domaines respectifs et vos opinions scientifiques aiguisées me permettront d'améliorer et approfondir mon travail, afin de déposer une thèse de qualité.

J'aimerais ensuite remercier mon directeur de recherche, Dr. Angelo Calderone pour tout le temps qu'il a investi à approfondir mes connaissances scientifiques, mais surtout mon sens critique et analytique. J'ai sincèrement apprécié mon expérience dans le laboratoire et je crois également que cette opportunité m'a permis de m'épanouir, plus que je ne l'aurais cru. Merci aussi de m'avoir appris à faire de la bonne science et d'avoir suscité chez moi un intérêt encore plus grand pour la recherche, dû à l'ardeur et à la passion que tu mets dans chacune de tes nouvelles et innombrables idées scientifiques. Évidemment, tes conseils et opinions marqués, sur de nombreux sujets, ont initié des discussions, des réflexions et parfois beaucoup de rires. Néanmoins, il y a un sujet sur lequel tu ne m'auras pas fait changer d'idée... ;) *You know which one I'm thinking about, in theory!*

Je désire également remercier les collègues dans le laboratoire de Dr. Calderone, Vanessa Hertig Ross, Marc-André Méus et Kim Tardif, avec qui j'ai partagé la plupart de mes journées, les bonnes comme les mauvaises, ces dernières années. Parfois, nous étions comme une famille les uns pour les autres, à nous entraider et à partager nos conseils, tant scientifiques que personnels. Mais comme toute bonne famille qui se respecte, nous pouvions aussi tour à tour nous taper sur les nerfs. Évidemment, la communication et le rire ont été des outils clés dans le maintien de l'harmonie au sein du laboratoire. Un merci tout particulier à Vanessa qui a été d'une aide précieuse tout le long de mon parcours et qui m'a toujours fait énormément rire. J'ai également eu beaucoup de plaisir à t'enseigner ce que je savais, vu ton très grand intérêt et ta rapidité d'apprentissage. Merci d'avoir été là, et je serais également là pour toi jusqu'à ta fin! Je tiens aussi à remercier les stagiaires qui ont été de passage dans le laboratoire, soit Justine Dehedin, Camille Dumais et Élena Boscher, qui m'ont permis d'apprendre à partager mes connaissances et dont l'aide a été significative dans l'acquisition

de résultats pour parvenir à réaliser trois publications dans ce court délai. Un merci aussi aux nombreuses personnes que j'ai côtoyées au centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal et qui ont chacune contribué à leur façon à ma réussite, soit Natacha Duquette, Louis Villeneuve, Maya Mamarbachi, Emma Dedelis, Marie-Élaine Clavet, Hugues Gosselin, Patrice Naud PhD, Adeline Raignault et Fanny Toussaint.

J'aimerais remercier mes parents, soit ma mère Claire et feu ma petite mamie Marguerite, qui m'ont inculqué des valeurs qui ont fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. Avec de l'ambition, de la persévérance et de la passion pour ce que l'on fait, tout est possible. Je vous aime beaucoup et je vous remercie d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir encouragée à persévérer dans les moments difficiles et de m'avoir soutenue dans tout ce que j'ai entrepris. Je désire aussi remercier mes oncles Denis et Bernard pour leurs encouragements, leur support, leurs savoirs inépuisables et l'ardeur qu'ils ont à défendre leurs opinions et dont je tente de m'inspirer jour après jour. Merci aussi à ma tante Hélène, qui nous a quitté beaucoup trop rapidement il y a déjà 11 ans, de m'avoir démontré à quel point il est important de profiter des plaisirs de la vie!

Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement mon amoureux Marc-André qui réussi à me faire voir la vie différemment avec son écoute attentive et ses conseils précieux. Depuis déjà cinq années que je partage ta vie et que tu guides la mienne, tel un phare. Notre très grande complicité est essentielle à mon bonheur. Tu sais toujours quoi dire pour me faire rire et tu embarques dans mes folies passagères. Tu as été d'un immense support dans le processus de mes études doctorales, ce qui m'as permis de m'accomplir et de me dépasser jour après jour. Je suis comblée de pouvoir enfin te dire que c'est véritablement la fin de mes études, que nous pourrons bâtir de nouveaux projets à deux et qu'à ton tour tu pourras davantage compter sur moi. Je t'aime et j'espère passer ma vie avec toi mon Chouchou.

# **CHAPITRE 1 : INTRODUCTION**

## **1.1 LE CŒUR**

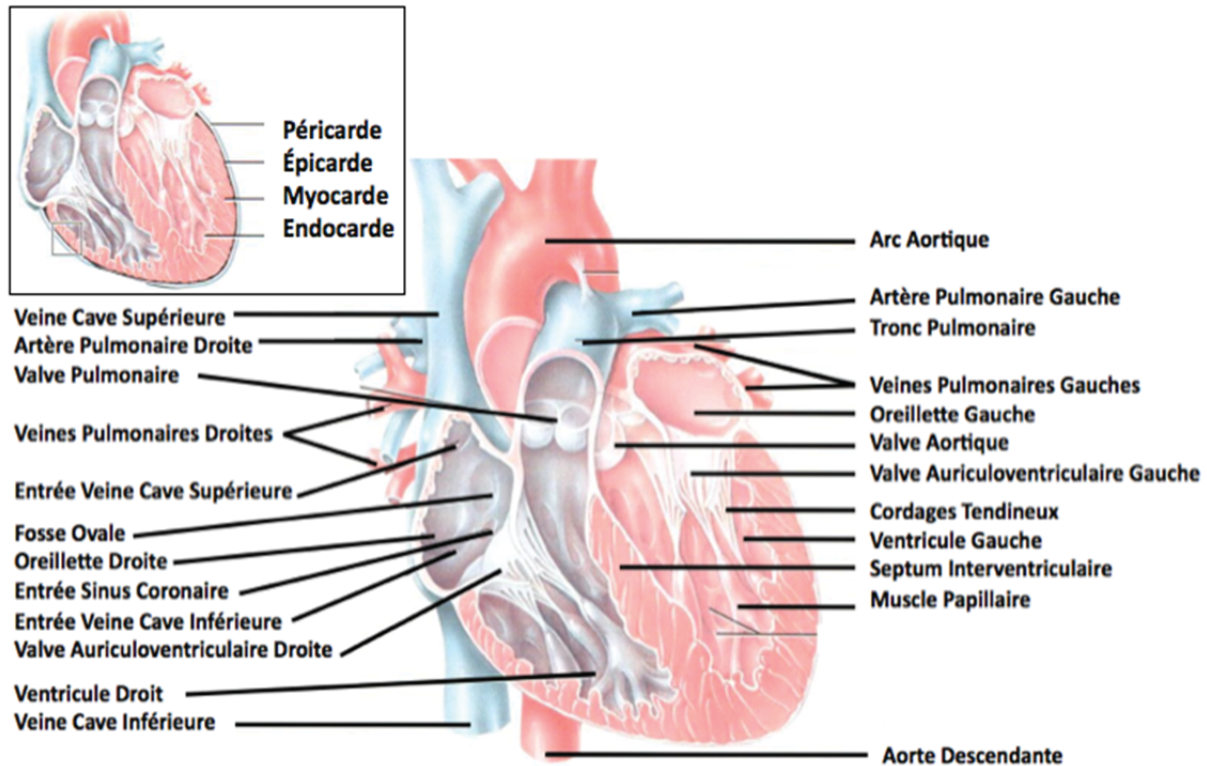
Le cœur est un organe essentiel qui assure la propulsion du sang, via les vaisseaux sanguins, à la circulation systémique et pulmonaire. Pour ce faire, le cœur bat environ 100 000 fois par jour chez un homme adulte normal. Ainsi, le cœur subvient aux besoins physiologiques cellulaires, puisque le sang transporte les éléments essentiels au fonctionnement des cellules, soit les nutriments, l'oxygène et les hormones. De plus, le sang contribue à l'élimination des déchets cellulaires, à la protection de l'organisme via le système immunitaire, en plus de réguler l'homéostasie interne (pH et température) (1).

### **1.1.1 DE L'ANATOMIE À LA PHYSIOLOGIE CARDIAQUE**

#### ***1.1.1.1 Les tuniques de la paroi du cœur et le péricarde***

La paroi du cœur est constituée de trois tuniques, soit l'épicarde, situé à l'extérieur, le myocarde, situé en partie centrale de la paroi, et l'endocarde qui tapisse les cavités du cœur (Voir Figure 1). Chacune de ces tuniques joue un rôle différent afin d'optimiser chaque battement cardiaque. L'endocarde est constitué d'endothélium et d'une mince couche de tissu conjonctif. Ainsi, cette couche permet aux cavités du cœur et aux valves d'être lisses afin de diminuer la friction du sang à chaque propulsion. Le myocarde est quant à lui principalement composé de cardiomyocytes qui contribuent à la contraction cardiaque, et donc, à l'action de pompe du cœur. L'épicarde est une paroi mince et transparente constituée de mésothélium et de tissu conjonctif délicat, ce qui permet de rendre la surface du cœur lisse et glissante. D'ailleurs, l'épicarde est une constituante du péricarde. Le péricarde a pour fonction de protéger le cœur, de le maintenir en place au sien du médiastin, en plus de lui assurer une liberté de mouvement nécessaire aux contractions qui surviennent rapidement et vigoureusement. Le péricarde est composé de deux couches distinctes, soit le péricarde fibreux et le péricarde séreux. C'est grâce au péricarde séreux que le péricarde assure une liberté de mouvement au cœur. En effet, le péricarde est composé d'une sérosité péricardique, soit un liquide qui permet de réduire la friction entre les feuillets du péricarde séreux (1).

**Figure 1 : Le péricarde, les parois du cœur et l'anatomie interne du cœur**



Le péricarde protège et maintien en place le cœur. Les trois tuniques du cœur sont de l'extérieur vers l'intérieur, l'épicarde, le myocarde et l'endocarde. Une coupe frontale du cœur en vue antérieure permet d'observer l'anatomie interne du cœur. (1) avec la permission de Pearson ERPI.

### ***1.1.1.2 Les cavités du cœur***

Le cœur est constitué de quatre cavités, soit les oreillettes droite et gauche et les ventricules droit et gauche (Voir Figure 1). L'oreillette droite a pour fonction de recevoir le sang désoxygéné provenant de la circulation systémique via les veines caves supérieure et inférieure et du sinus coronaire qui achemine le sang provenant du cœur. Le sang passe ensuite au ventricule droit lors de l'ouverture de la valve auriculo-ventriculaire droite, aussi appelée valve tricuspide. Tant au niveau du ventricule droit que du ventricule gauche, les valves auriculo-ventriculaires sont reliées à des muscles papillaires via des cordages tendineux. Ainsi, l'ouverture de ces valves se fait lorsque la pression sanguine des oreillettes est supérieure à celle des ventricules, ce qui a pour conséquence le relâchement des muscles papillaires et des cordages tendineux. Par la suite, le sang est propulsé du ventricule droit au tronc pulmonaire

cordages tendineux. Par la suite, le sang est propulsé du ventricule droit au tronc pulmonaire via l'ouverture de la valve pulmonaire, ce qui permet d'acheminer le sang aux poumons via les artères pulmonaires droite et gauche. Une fois débarrassé du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et réoxygéné, le sang retourne au cœur via les veines pulmonaires qui transportent le sang jusqu'à l'oreillette gauche. Le sang passe alors de l'oreillette gauche au ventricule gauche lors de l'ouverture de la valve auriculo-ventriculaire gauche, aussi appelée valve bicuspide ou mitrale. Enfin, le sang oxygéné est propulsé à la circulation systémique via l'ouverture de la valve aortique, ce qui achemine le sang dans l'arc aortique, puis les aortes ascendantes et descendantes. Il est à noter que la perfusion des artères coronaires se fait via l'aorte ascendante, mais seulement lorsque le cœur se relâche. En effet, lors de la contraction, les artères coronaires sont maintenues fermées, puis quand la pression diminue au niveau de l'aorte, les artères coronaires peuvent être irriguées (1). Les ventricules se contractent de manière simultanée pour propulser des volumes similaires de sang. Cependant, leur morphologie est tout de même distincte. Ainsi, le ventricule gauche est beaucoup plus épais, puisqu'il doit propulser le sang dans la circulation systémique, qui oppose une grande résistance et qui doit couvrir une très grande distance. Le ventricule droit envoie le sang aux poumons qui sont situés à proximité et qui offrent une plus faible résistance, ce qui explique que le myocarde du ventricule droit est moins volumineux. Enfin, le septum permet de séparer les ventricules droit et gauche en plus de comprendre un élément du système de conduction cardiaque (1).

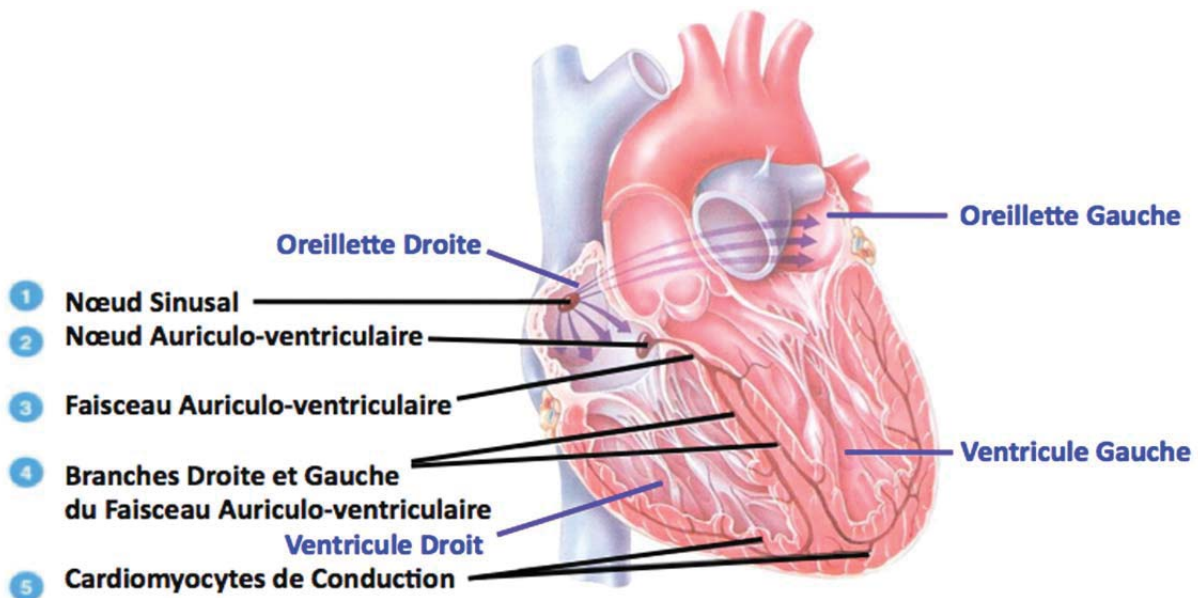
### ***1.1.1.3 Le système de conduction cardiaque***

C'est grâce au système de conduction du cœur que les cavités cardiaques peuvent se contracter de manière coordonnée, ce qui permet l'efficacité optimale du cœur. L'excitation cardiaque débute au niveau de l'oreillette droite dans le nœud sinusal [1] (Voir Figure 2), qui est constitué de cellules cardionectrices (Voir Section 1.1.2.1.1). Ces cellules se dépolarisent de manière spontanée, relativement lentement, de manière répétitive et progressive (potentiel *pacemaker*), jusqu'à l'obtention d'un certain seuil d'excitation, ce qui déclenche le potentiel d'action. D'ailleurs, les potentiels d'action générés par le nœud sinusal constituent le rythme sinusal, qui correspond au rythme fondamental des battements cardiaques. Cependant, le



moment et la force des battements cardiaques peuvent être modifiés par le système nerveux autonome ou les hormones. Par la suite, le potentiel d'action du nœud sinusal se propage à l'ensemble des oreillettes via les jonctions communicantes (*gap junctions*) des cellules cardionectrices (Voir Section 1.1.2.1.1), ce qui permet la contraction des oreillettes. Ensuite, le potentiel d'action atteint le nœud auriculo-ventriculaire [2], situé juste devant l'ouverture du sinus coronaire au niveau du septum interauriculaire. Le potentiel d'action est alors transmis au faisceau auriculo-ventriculaire [3], aussi appelé faisceau de His, soit le seul endroit possible permettant le passage du potentiel d'action des oreillettes aux ventricules. Par la suite, le potentiel d'action poursuit sa course à travers le septum interventriculaire jusqu'à l'apex du cœur via les branches droites et gauches du faisceau auriculo-ventriculaire [4]. Enfin, les myocytes de conduction cardiaque [5], aussi connus sous le nom de fibres de Purkinje, permettent la transmission rapide du potentiel d'action de l'apex à la partie résiduelle des ventricules, ce qui induit alors la contraction de ceux-ci (1).

**Figure 2 : Le système de conduction cardiaque**



Le système de conduction cardiaque permet une contraction coordonnée des cavités cardiaques. Les potentiels d'action cardiaques sont générés par le nœud sinusal [1], puis se propagent dans l'ordre, au nœud auriculo-ventriculaire [2], puis au faisceau auriculo-ventriculaire [3], ensuite aux branches droite et gauche du faisceau auriculo-ventriculaire [4] et enfin aux cardiomyocytes de conduction situés au niveau des ventricules [5]. (1) avec la permission de Pearson ERPI.

## 1.1.2 LES TYPES CELLULAIRES CARDIAQUES

Deux types cellulaires cardiaques constituent majoritairement le cœur normal, soit les cardiomyocytes et les fibroblastes. Évidemment, d'autres types cellulaires sont également présents, dont entre autres les cellules vasculaires, tels que les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (CML). Toutefois, les cardiomyocytes demeurent le type cellulaire qui compose principalement le volume (75%) et la masse (90%) ventriculaire, alors qu'ils ne représentent que 25% du nombre cellulaire ventriculaire total. Les cellules non-cardiomyocytaires, soit les fibroblastes et les cellules vasculaires, totalisent quant à elles 75% du nombre cellulaire total au niveau des ventricules, alors qu'elles n'occupent qu'environ 33% du volume ventriculaire et ne composent que 10% de la masse totale (2, 3). Néanmoins, les fibroblastes cardiaques constituent de 90 à 95 % de la masse occupée par les cellules non-cardiomyocytaires et représentent 30 à 50 % du contenu cellulaire du cœur des mammifères (2-4).

### 1.1.2.1 *Les cardiomyocytes*

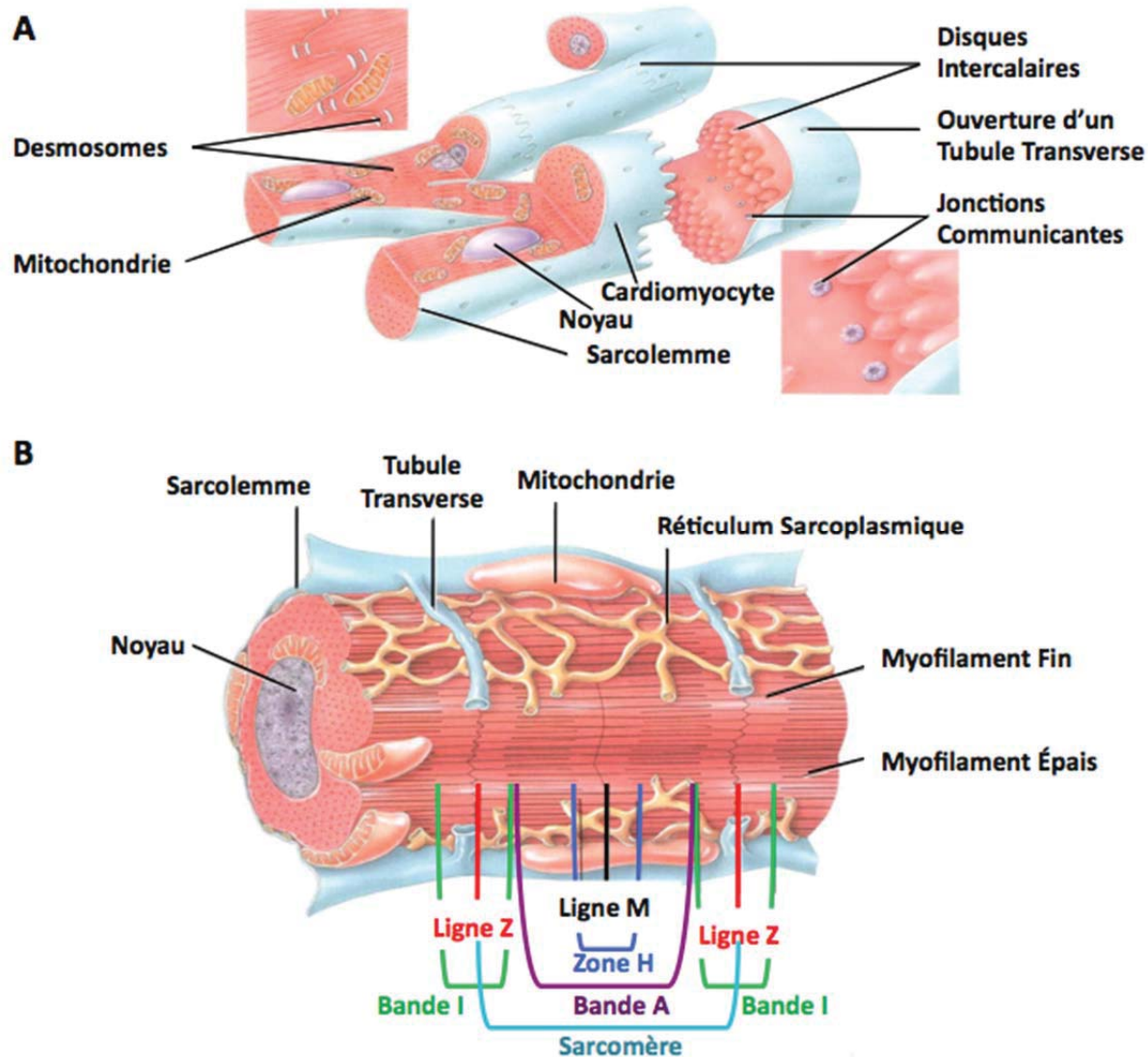
Les myocytes cardiaques, tout comme les myocytes squelettiques, ont une apparence striée (Voir Figure 3). Cependant, les cardiomyocytes se distinguent de plusieurs façons des myocytes squelettiques. Ainsi, les myocytes squelettiques se contractent de manière volontaire et sont de longues fibres cylindriques composées de plusieurs noyaux qui sont situés de manière périphérique, alors que les cardiomyocytes se contractent involontairement et sont des myocytes ramifiés qui possèdent un ou deux noyaux centraux. Un cardiomyocyte typique a un diamètre d'environ 14 $\mu$ m et une longueur de 50 à 100 $\mu$ m. Les cardiomyocytes ont une activité électrique intrinsèque qui est essentielle à la contraction cardiaque. De plus, ces cellules ont des jonctions intercellulaires avec les myocytes cardiaques voisins. Ainsi, leur membrane plasmique est constituée de disques intercalaires, qui sont des digitations transverses irrégulières constituées de desmosomes et de jonctions communicantes (*gap junctions*). Les desmosomes permettent de maintenir ensemble des cardiomyocytes adjacents, alors que les jonctions communicantes assurent une transmission rapide et unidirectionnelle des potentiels d'action électriques d'un cardiomyocyte à l'autre (1). Les jonctions communicantes des

cardiomyocytes ventriculaires contribuent à la propagation de l'influx principalement via la connexine 43. Afin de réaliser cette fonction, les connexines s'assemblent sous forme d'hexamère et forment alors un connexon, soit un canal transmembranaire qui comporte un pore aqueux. D'ailleurs, les jonctions communicantes sont formées à partir de l'alignement de deux connexons de cellules adjacentes, ce qui permet la communication directe entre les cytoplasmes des deux cardiomyocytes, contribuant ainsi à la propagation de l'influx (5).

En plus des disques intercalaires et des noyaux, les cardiomyocytes sont constitués de mitochondries, qui occupent environ 25% du volume d'un cardiomyocyte et qui alimentent en oxygène la cellule (Voir Figure 3A). Les cardiomyocytes présentent également un réticulum sarcoplasmique, qui constitue une réserve limitée de calcium intracellulaire (Voir Figure 3B). De plus, il y a le sarcolemme, qui est la membrane plasmique du cardiomyocyte et qui s'invagine dans la cellule au niveau de la ligne Z. Enfin, les myocytes cardiaques sont constitués de sarcomères, soit l'unité contractile de ces cellules et qui leur confèrent leur apparence striée. Les extrémités du sarcomère sont délimitées par la ligne Z. Les filaments fins, en vert à la Figure 4A, sont principalement constitués d'actine, alors que les filaments épais, en rouge, sont de la myosine. Ces filaments se chevauchent plus ou moins selon que le muscle soit contracté, relâché ou étiré. Ce qui permet la contraction du muscle cardiaque, c'est le déplacement du sarcomère en entier et non pas des protéines en elles mêmes. À la figure 4B, on observe que le filament fin est constitué de nombreuses molécules d'actine, en rouge, qui s'assemblent en deux brins et s'enroulent en hélice. La tropomyosine et le complexe des Troponines sont quant à elles des protéines régulatrices qui agissent comme un interrupteur pour enclencher et arrêter le processus de contraction. Ainsi, la tropomyosine inhibe l'association de l'actine et de la myosine dans le muscle au repos, soit lors de la diastole, car elle couvre le site de liaison sur l'actine pour la myosine. Les Troponines lient l'actine et la tropomyosine afin de maintenir la tropomyosine dans sa position de blocage. Ainsi, lorsqu'il y a déclenchement de l'activité contractile d'un cardiomyocyte, alors il y a une augmentation importante du calcium intracellulaire, qui provient du réticulum sarcoplasmique. Alors, le calcium lie la Troponine-C, conférant un état activé et induisant un changement de conformation de la Troponine-I, ce qui détruit la liaison Troponine-I/actine, et de cette façon le complexe Troponine-T/tropomyosine n'est plus stabilisé. Puis, il y a dégagement du

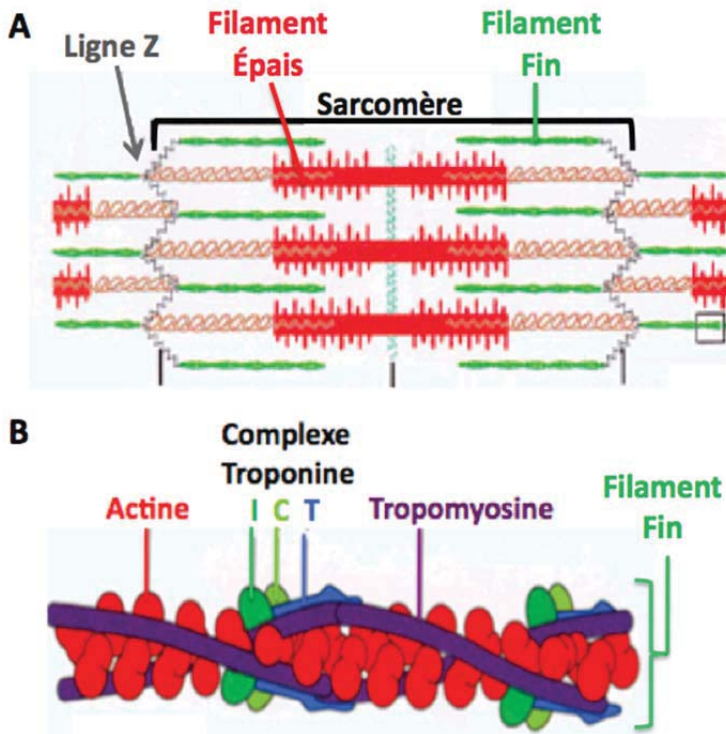
complexe Troponine/tropomyosine, libérant l'actine, qui peut alors lier la myosine, ce qui produit un raccourcissement du sarcomère via de l'ATP et induit finalement la contraction (1).

**Figure 3 : Histologie des cardiomyocytes**



**A** Structure tridimensionnelle d'un cardiomyocyte, schématisant sa forme ramifiée et le positionnement de ses différentes composantes. **B** Détails d'un sarcomère. La Ligne Z est composée d' $\alpha$ -Actinine et permet de relier les filaments fins entre eux, en plus de délimiter les extrémités d'un sarcomère. Les Bandes I représentent les segments ne comprenant que des filaments fins, alors que la Bande A représente le filament épais de myosine en sa totalité et comprend les zones de chevauchement des filaments fins et épais. La Zone H représente la section ne comprenant que le filament épais, alors que la Ligne M schématise les protéines de soutien des filaments épais qui sont situées au centre d'un sarcomère. (1) avec la permission de Pearson ERPI.

**Figure 4 : Schématisation d'un sarcomère et d'un filament fin**

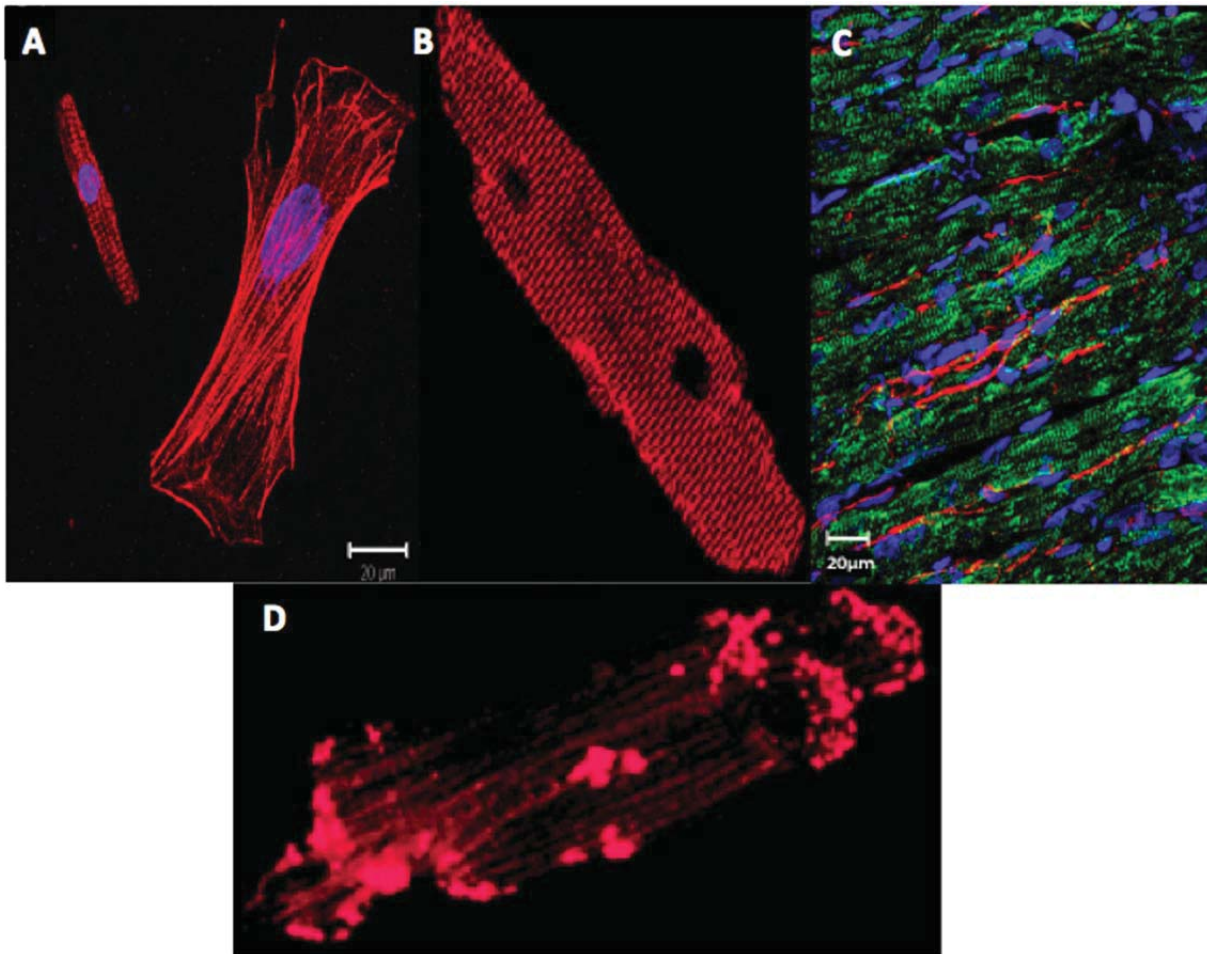


**A** Le sarcomère est constitué de filaments épais de myosine en rouge et de filaments fins en vert. **B** Le filament fin est principalement constitué d'actine, en rouge, mais aussi de tropomyosine en violet et du complexe de Troponines, qui est composé des Troponines I, C et T. La Troponine-I (en vert foncé) est la Troponine inhibitrice qui permet la liaison du complexe des Troponines au filament d'actine. La Troponine-C (en vert lime) est dépendante du calcium. La Troponine-T (en bleu) permet au complexe de lier la Tropomyosine. (1) avec la permission de Pearson ERPI.

Il existe de nombreux marqueurs des cardiomyocytes, cependant certains sont reconnus comme étant spécifiques à ce type cellulaire. Ainsi, il est possible de distinguer les cardiomyocytes des fibroblastes cardiaques isolés de ventricules de rats et mis en culture via un marquage à la phalloïdine. Cette dernière marque spécifiquement l'actine, en immunofluorescence rouge à la Figure 5A. Cependant, l'actine revête un phénotype strié chez les cardiomyocytes et un phénotype filamenteux chez les fibroblastes cardiaques (6). Un autre marqueur spécifique aux cardiomyocytes est l' $\alpha$ -actinine, qui est une protéine structurale du sarcomère qui relie les filaments fins entre eux et qui compose la ligne Z du sarcomère (Voir Figure 5B) (7). Une troisième protéine qui marque les myocytes est la Desmine, soit une protéine filamenteuse intermédiaire de la classe III (Voir Figure 5C) (8). Enfin, la connexine-43 permet de visualiser les jonctions communicantes des cardiomyocytes ventriculaires (Voir Figure 5D). (7)



**Figure 5 : Les marqueurs des cardiomyocytes**



**A** Le marquage à la phalloïdine en immunofluorescence rouge révèle l'expression d'actine en phénotype strié chez les cardiomyocytes (à gauche) et en phénotype filamenteux chez les fibroblastes cardiaques (à droite) isolés de cœurs de rats néonataux (6). **B** L'immunofluorescence rouge de l' $\alpha$ -actinine caractérise les cardiomyocytes (7). **C** L'immunofluorescence verte de la Desmine est présente chez les cardiomyocytes adultes qui sont intercalés par des cellules souches neurales (Voir Section 1.4.3.1 pour des détails concernant ce type cellulaire) révélées par l'immunofluorescence rouge de la Nestine (8). **D** La connexine-43 en immunofluorescence rouge est présente dans les jonctions communicantes des myocytes cardiaques (7). (7) avec la permission de Wolters Kluwer Health Inc.

### ***1.1.2.1.1 Les cellules cardionectrices***

Les cellules cardionectrices sont des cardiomyocytes spécialisés et autoexcitateurs qui génèrent les potentiels d'action qui stimulent les contractions cardiaques. Il n'y a qu'environ 1% des cardiomyocytes qui sont des cellules cardionectrices. Ces cellules cardionectrices ont deux fonctions principales. Tout d'abord, constituer le centre d'automatisme (*pacemaker*) pour générer le rythme d'excitation électrique qui permet de produire les contractions cardiaques. D'ailleurs, ces cellules génèrent environ 100 potentiels d'action par minute. De plus, les cellules cardionectrices vont constituer le système de conduction cardiaque, qui permet la propagation des cycles d'excitation à travers le cœur en entier (1). Les cellules cardionectrices et les cardiomyocytes ont des patrons d'expression distincts de connexines à travers le cœur qui correspondent à leur rôle spécifique respectif. Ainsi, la connexine 43 est impliquée dans la transmission du potentiel d'action au niveau des cardiomyocytes ventriculaires, alors que la connexine 40 participe à la propagation de l'influx au niveau des cellules cardionectrices des oreillettes et du système de conduction. La connexine 45 est quant à elle impliquée dans la synchronisation contractile des cardiomyocytes embryonnaires, alors que la connexine 30,2 constitue les cellules cardionectrices du nœud auriculo-ventriculaire et permet ainsi le ralentissement de la propagation de l'activité électrique (5).

### ***1.1.2.1.2 La régénération des cardiomyocytes***

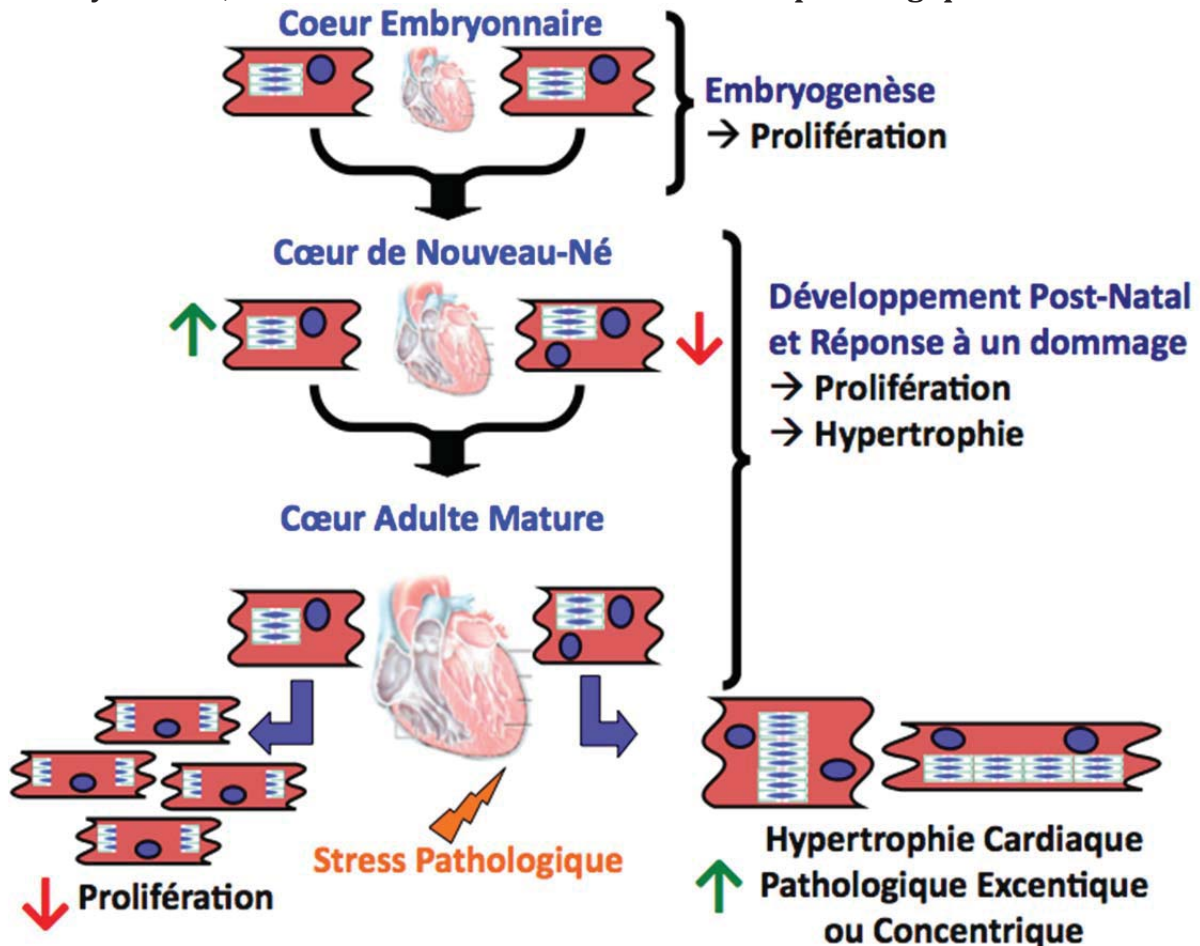
Il a longtemps été considéré que les cardiomyocytes de cœurs matures de mammifères sont des cellules hautement différenciées qui n'étaient pas capables de se régénérer à la suite d'un dommage, par exemple lorsqu'un infarctus du myocarde induit la nécrose des cardiomyocytes (Voir Section 1.1.3) (9-11). Ainsi, selon ce dogme, les cardiomyocytes sont dans un stage post-mitotique à la suite de la naissance, ont donc quitté le cycle cellulaire et sont alors incapables de proliférer (9-11). Ce faisant, lors du développement post-natal, toute augmentation de masse du cœur était attribuée exclusivement à l'hypertrophie individuelle de chacun des cardiomyocytes (Voir Section 1.1.4), et non pas à la régénération des cardiomyocytes et à l'augmentation concomitante de leur nombre via la prolifération (9-11). Cette vérité a toutefois été démentie récemment lorsqu'il a été découvert que les

cardiomyocytes ventriculaires mononucléés, présents à des niveaux élevés dans le cœur embryonnaire ainsi que durant un court laps de temps à la suite de la naissance chez les mammifères, ont une capacité proliférative attribuable à leur aptitude à réintégrer dans le cycle cellulaire (9, 12). Ainsi, lorsque l'on induit une résection partielle chirurgicale du ventricule de souris néo-natales de seulement 1 jour, ces cardiomyocytes mononucléés prolifèrent et permettent de régénérer totalement le myocarde endommagé, et ce, sans enclencher de processus cicatriciel ou hypertrophique (9). Puis, à 2 mois suivant la résection, ces souris ont une fonction contractile systolique comparable à celle de souris témoins (9). D'ailleurs, ce phénomène est analogue à ce qui est observé tout le long de la vie chez les amphibiens et les poissons (9). En effet, il a été observé chez les poissons zèbres qu'un dommage cardiaque n'induit jamais de cicatrisation cardiaque, mais plutôt un processus de régénération cardiaque qui permet de restituer l'ensemble des cardiomyocytes perdus, via la prolifération des cardiomyocytes préexistants (9, 10, 13-15). Lors de l'embryogenèse et du développement post-natal, la plupart des cardiomyocytes sont retrouvés sous une forme mononucléée, mais une sous-population de ces cellules contractiles ventriculaires sont également binucléée/polynucléée (Voir Figure 6) (9). Cependant, durant la phase de développement/maturation, la majorité des cardiomyocytes sont retrouvés sous une forme binucléée/polynucléée, soit environ 95% à l'âge adulte, et sont incapables de proliférer puisque leur différenciation post-mitotique est terminale (Voir Figure 6) (9). Ces cardiomyocytes binucléés/polynucléés réagissent donc à un stimulus hémodynamique en s'hypertrophiant (9). Il existe néanmoins une sous-population de cardiomyocytes mononucléés, possédant la capacité proliférative, qui persistent au sein du myocarde mature et qui participent à un certain taux de régénération des cardiomyocytes durant le vieillissement physiologique normal (Voir Figure 6) (9-11, 16-18). Cette sous-population peut donc être recrutée via un stimulus induit par l'infarctus du myocarde, et ce faisant, des cardiomyocytes prolifératifs sont retrouvés au niveau de la région cicatricielle et bordant la cicatrice (9, 11, 12). Toutefois, la capacité régénérative du myocarde de mammifère adulte est limitée et elle ne suffit donc pas pour permettre la réparation des dommages cardiaques (9, 11, 13). En effet, la réponse des cardiomyocytes mononucléés est largement marginale comparativement à la réponse des cardiomyocytes binucléés/polynucléés qui contribuent à l'hypertrophie cardiaque du myocarde intact et qui sécrètent des facteurs qui stimulent l'initiation de la fibrose



réparative pour former la cicatrice cardiaque dans la région ischémisée (Voir Sections 1.1.3.3.1.3 et 1.1.4.1.1) (Voir Figure 6) (9).

**Figure 6: La régénération et l'hypertrophie cardiaque lors de la phase embryonnaire, suite à la naissance et lors d'un stress pathologique**



Dans le cœur embryonnaire et de nouveau-né la majorité des cardiomyocytes sont mononucléés, et conséquemment la prolifération est abondante. Le développement post-natal est associé à une augmentation importante et progressive du nombre de cellules binucléées/polynucléées, qui sont dans un état post-mitotique, et d'une diminution concomitante du nombre de cardiomyocytes mononucléés, si bien que le cœur adulte mature présente environ 95% de cardiomyocytes binucléées/ polynucléées. Ainsi, le remodelage cardiaque observé lors du vieillissement est attribuable à l'hypertrophie des cardiomyocytes binucléées/polynucléées, ainsi qu'à la prolifération des cellules contractiles ventriculaires mononucléées. Cependant, lors d'un stress pathologique, tel l'infarctus du myocarde, la majorité des cardiomyocytes, les binucléés/polynucléés, participent à une hypertrophie cardiaque excentrique ou concentrique dépendamment du stimulus, alors qu'une minorité de cardiomyocytes, les mononucléés, prolifèrent pour participer à la régénération des cardiomyocytes nécrosés. (9) avec la permission d'Elsevier.

Enfin, il est reconnu que des cellules souches résidentes cardiaques peuvent se différencier en cellules ressemblant à des cardiomyocytes (*cardiac myocyte-like cells*) à la suite d'un infarctus du myocarde (Voir Section 1.4.3.2) (9, 19). En effet, les cellules souches qui expriment des facteurs de transcriptions de la *Cardiac Homebox Protein*, soit le GATA4 (*GATA binding protein 4*) et le Nkx2.5 (*NK2 homebox 5*), sont reconnues pour acquérir un phénotype de lignée de cardiomyocyte (6, 9). Ainsi, l'équipe d'Anversa a identifié une population de cellules souches progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup>/c-kit<sup>(+)</sup> (*proto-oncogene c-kit*) exprimant ces facteurs de transcriptions et leurs résultats suggèrent que ces cellules participent à la régénération cardiaque (6, 9, 19, 20). En somme, de nouvelles approches thérapeutiques émergent actuellement pour contribuer à améliorer la survie à la suite d'un infarctus du myocarde et celles-ci mettent en relief l'utilisation de différents types de cellules souches progénitrices résidentes cardiaques (Voir Section 1.1.3.5.2.5) (9).

### **1.1.2.2 Les fibroblastes cardiaques**

Les fibroblastes cardiaques représentent évidemment le type cellulaire non-cardiomyocytaire le plus présent au sein des cœurs de mammifères (2-4). Cependant, leur proportion peut varier selon l'espèce, le genre et l'âge (3). Habituellement, les fibroblastes cardiaques sont retrouvés de manière intercalée dans le réseau matriciel de collagène au niveau du myocarde des mammifères adultes (3). De plus, les fibroblastes cardiaques entourent les cardiomyocytes et permettent ainsi de faire le pont entre les couches de tissu myocardique (3). Globalement, les fibroblastes sont des cellules d'origine mésenchymateuse qui sécrètent des protéines de la matrice extracellulaire (ECM, *ExtraCellular Matrix*) et des médiateurs et dont l'apparition contrôlée et transitoire au niveau de divers organes contribue à rétablir l'intégrité structurelle du tissu endommagé (3, 21-23). Cependant, les fibroblastes cardiaques sont bien plus que de simples producteurs et dégradateurs d'ECM (4, 21). Ainsi, ils jouent un rôle central dans le maintien de la fonction cardiaque et dans la réponse suite à un dommage, tant au niveau du remodelage cardiaque permettant la formation d'une cicatrice cardiaque à la suite d'un infarctus du myocarde (Voir Section 1.1.3.3.1.3.1), qu'au niveau de la fibrose réactive pathologique (Voir Sections 1.1.3.3.2.1) (21, 23, 24). D'ailleurs, la caractérisation des fibroblastes cardiaques est un sujet très actuel, car bien comprendre les

populations de fibroblastes cardiaques, leur phénotype, leur origine et leur rôle, permet de cibler les populations qui contribuent de manière bénéfique à la cicatrisation, tout en bloquant les populations nuisibles qui induisent la fibrose réactive.

#### ***1.1.2.2.1 La caractérisation morphologique et phénotypique des fibroblastes cardiaques***

Morphologiquement, les fibroblastes sont des cellules en forme de fuseau aplati qui présentent un noyau arrondi et allongé, qui possèdent de nombreuses élongations provenant de leur corps cellulaire et des réticulums endoplasmiques étendus (4, 21). Ce qui permet de distinguer plus aisément les fibroblastes cardiaques des autres types cellulaires présents au niveau interstitiel, c'est qu'ils sont le seul type cellulaire qui ne présente pas de membrane basale au niveau du tissu cardiaque (3, 21). Évidemment, nombreux sont les marqueurs qui permettent d'identifier les fibroblastes, tels que la Vimentine, le DDR-2 (*Discoidin Domain Receptor 2*) ou le FSP-1 (*Fibroblast-Specific Protein 1*) (3, 4, 21). Cependant, à ce jour, aucun marqueur n'est spécifique à ce type cellulaire (3, 21). Ainsi, le Tableau 1 résume la panoplie de protéines présentes chez les fibroblastes, leur fonction, mais aussi leur expression dans d'autres types cellulaires (21). Toutefois, certains marqueurs semblent se démarquer afin de caractériser les fibroblastes cardiaques (4). Ainsi, la Nestine est présente chez les fibroblastes ventriculaires de rats néonataux, puis son expression est abolie chez les fibroblastes ventriculaires de rats adultes, et enfin la nestine est réexprimée chez les fibroblastes ventriculaires de la cicatrice cardiaque chez les rats ayant subi un infarctus du myocarde (25). De plus, la périostine apparaît comme étant un marqueur très efficace des fibroblastes cardiaques en situations particulières, tel que *in utero* suite à la naissance, et surtout chez les myofibroblastes activés à la suite d'un dommage cardiaque (3, 4, 26). Le FSP-1 semble être indiqué dans la détection d'une sous population de fibroblastes cardiaques adultes, mais est également exprimé par les macrophages, les monocytes, les lymphocytes et les CML, alors qu'à la suite d'un dommage cardiaque le FSP-1 est plutôt exprimé par une sous population non-fibroblastique (3, 4, 24). Enfin, les fibroblastes cardiaques ne sont pas une population statique, mais bien plutôt une population très hétérogène en fonction de leur origine ou de l'environnement où ils sont résidents (4, 21, 24, 27). Ainsi, les populations présentes lors de la croissance n'auront pas les mêmes fonctions, ni les mêmes caractéristiques, qu'une population

de fibroblastes recrutés suite à une lésion (21, 27). En définitive, l'hétérogénéité phénotypique des fibroblastes au niveau d'un même organe lors de divers événements fait en sorte qu'il soit impossible d'établir un marqueur unique permettant d'identifier cette population (3, 21).

Une distinction importante est également à faire. Depuis plusieurs années, un dogme largement accepté dans la littérature stipule que lors du remodelage cardiaque secondaire à un infarctus du myocarde, le TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ) active des fibroblastes cardiaques résidents, ce qui induit la transdifférenciation de ceux-ci en myofibroblastes cardiaques (3, 4, 6, 21, 28). De plus, il est reconnu que ce qui distingue les fibroblastes cardiaques normaux des myofibroblastes cardiaques activés est une régulation à la hausse de l'expression de protéines contractiles, tel que l' $\alpha$ -actine du muscle lisse ( $\alpha$ -SMA, *Smooth Muscle  $\alpha$ -Actin*), par ces myofibroblastes (3, 4, 6, 21, 28). Néanmoins, l' $\alpha$ -SMA n'étant pas spécifique à ce type cellulaire, la localisation au site de lésion ainsi que la morphologie s'avèrent des éléments essentiels afin d'identifier les myofibroblastes cardiaques (3, 4). Également, il est reconnu que les myofibroblastes cardiaques activés produisent et sécrètent davantage de collagène et d'ECM que les fibroblastes normaux (6, 28). Ce faisant, ils sont fortement impliqués dans les pathologies fibrotiques cardiaques, tel l'infarctus du myocarde (6, 28). Cependant, d'autres sous-population de fibroblastes cardiaques participent également à la réparation tissulaire à la suite d'une lésion cardiaque (3, 21). D'ailleurs, il existe une large hétérogénéité de fibroblastes lors du développement et de la cicatrisation cardiaque, qui est attribuable aux diverses origines des différentes sous-populations de fibroblastes et de myofibroblastes cardiaques (4, 21, 24, 29, 30). En effet, ces cellules peuvent provenir de la transdifférenciation de fibroblastes cardiaques résidents, mais également de cellules progénitrices de la moelle osseuse, de cellules épithéliales via la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT, *Epithelial-Mesenchymal Transition*) et de cellules endothéliales via la transition endothélio-mésenchymateuse (EndMT, *Endothelial-Mesenchymal Transition*) (4, 21, 24, 29, 30).

**Tableau 1 : Marqueurs communs des fibroblastes**

<b>Protéine</b>	<b>Fonction</b>	<b>Expression par d'autres types cellulaires</b>
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	<b>Protéine associée aux filaments intermédiaires exprimée par les fibroblastes transdifférenciés en myofibroblastes activés</b>	<b>CML Péricytes Cellules myoépithéliales</b>
<b>Cadhérine-9</b>	<b>Molécule d'adhésion dépendante du Calcium</b>	<b>Neurones Système vasculaire tumoral</b>
<b>CD40</b>	<b>Membres famille des récepteurs au TNF<math>\alpha</math></b>	<b>Cellules présentatrices d'antigène</b>
<b>CD248 (TEM1)</b>	<b>Récepteur du collagène</b>	<b>Péricytes Cellules endothéliales</b>
<b>Collagène de type 1</b>	<b>Responsable de la biosynthèse du Collagène de type 1</b>	<b>Ostéoblastes Chondroblastes</b>
<b>DDR-2</b>	<b>Récepteur tyrosine kinase qui lie le collagène</b>	<b>CML Cellules hépatiques stellaires</b>
<b>FAP1</b>	<b>Sérine protéase (gélatinase)</b>	<b>Mélanocytes activés</b>
<b>FSP-1 /S100A4</b>	<b>Protéine associée aux filaments intermédiaires qui lie le calcium</b>	<b>Monocytes , Macrophages, CML, Lymphocytes et Cellules de carcinome invasif</b>
<b>FSA</b>	<b>Molécule qui lie la fibronectine</b>	<b>Monocytes et Macrophages</b>
<b>HSP47</b>	<b>Serpine chaperone qui lie le collagène</b>	<b>Monocytes, Macrophages et Cellules productrices de collagène</b>
<b>PDGFRb</b>	<b>Récepteur Tyrosine Kinase</b>	<b>CML et Péricytes</b>
<b>Prolyl-4-hydroxylase</b>	<b>Responsable de la biosynthèse de Collagène</b>	<b>Cellules endothéliales Cellules épithéliales</b>
<b>THY1/CD90</b>	<b>Molécule d'adhésion cellulaire</b>	<b>Leucocytes Cellules endothéliales Cellules progénitrices variées</b>
<b>Vimentine</b>	<b>Protéine filamenteuse intermédiaire</b>	<b>Cellules endothéliales CML Péricytes Cellules myoépithéliales</b>

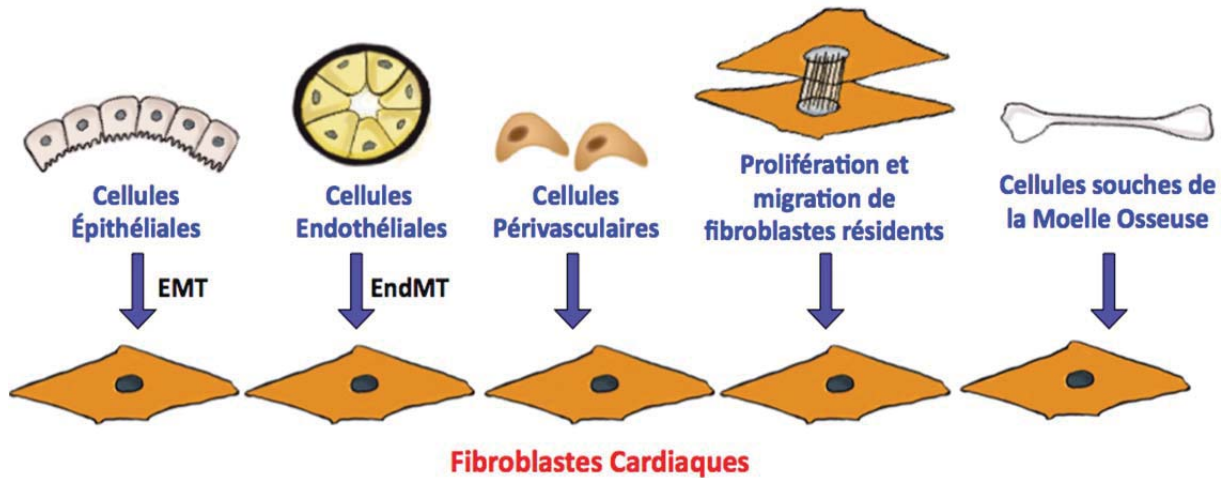
*$\alpha$ -SMA,  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin; TNF- $\alpha$ , Tumor Necrosis Factor; CD40, TNF receptor superfamily member 5; TEM1, Tumor Endothelial Marker; DDR-2 Discoidin Domain Receptor 2; FAP1, Fibroblast Activation Protein-1; FSP-1, Fibroblast-Specific Protein-1; FSA, Fibroblast Surface Antigen; HSP47, Heat Shock Protein-47; PDGFRb, Platelet-Derived Growth Factor Receptor- $\beta$  et THY1, Thy-1 cell surface antigen; CML, Cellules Musculaires Lisses. Tableau adapté de (21).*

#### ***1.1.2.2.2 L'origine des fibroblastes cardiaques***

Lors du développement, la principale source de fibroblastes cardiaques provient des cellules mésenchymateuses du proépicaire embryonnaire via l'EMT (Voir Figure 7 et Section 1.5.1) (4, 21, 31). Pour ce faire, les cellules mésenchymateuses vont d'abord migrer à la surface du cœur embryonnaire (21, 32). De cette façon, elles forment l'épicaire et deviennent alors des cellules dérivées de l'épicaire qui participent à l'EMT afin de finalement se différencier en fibroblastes cardiaques (21, 32-34). Cependant, l'EMT nécessite la présence de facteurs de croissances, tels le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), le FGF (*Fibroblast Growth Factor*) et le TGF (21, 35). Les fibroblastes valvulaires sont quant à eux originaires de l'EndMT à partir de l'endocarde en présence de TGF- $\beta$  et de PDGF (Voir Figure 7 et Section 1.5.2) (21, 36). Il est à noter que l'EMT et l'EndMT peuvent aussi être induits en présence de facteurs pro-fibrotiques à la suite d'un dommage (21, 24). Enfin, il est reconnu que les fibroblastes cardiaques peuvent également provenir de cellules périvasculaires, de monocytes circulants, de cellules progénitrices de la moelle osseuse, de fibrocytes circulants et de la prolifération et de la migration de fibroblastes résidents, et ce, plus particulièrement à la suite d'un dommage (Voir Figure 7) (4, 21, 24). De cette façon, le cœur présente une augmentation drastique de son nombre de fibroblastes et de myofibroblastes qui peuvent alors participer à la cicatrisation (Voir Section 1.1.3.3.1.3.1) (4, 24).



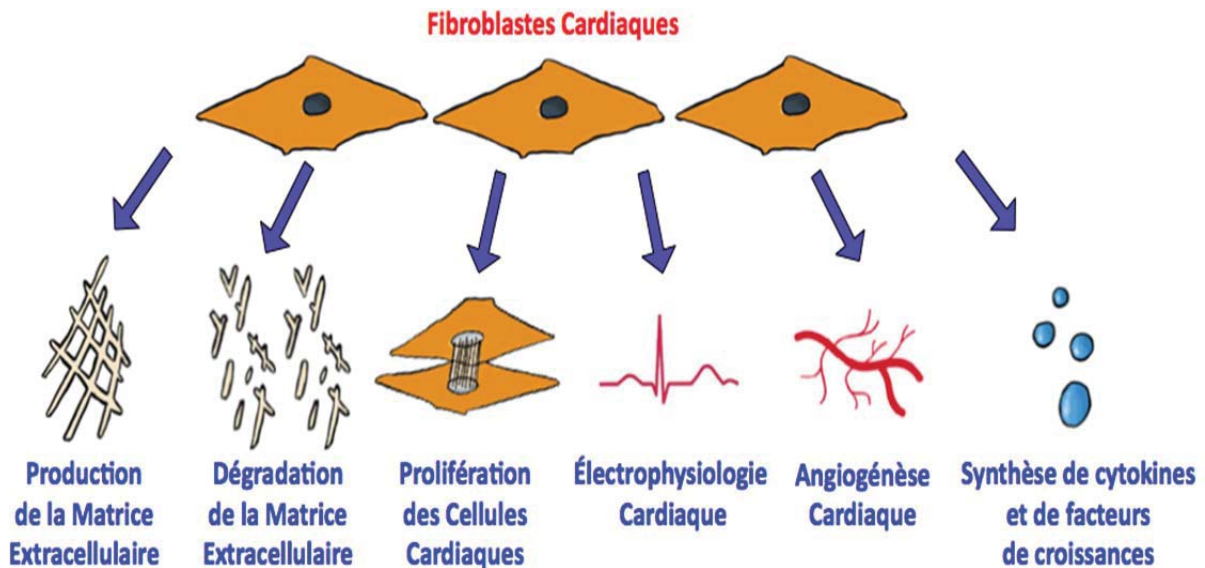
**Figure 7 : L'origine des fibroblastes cardiaques**



Les fibroblastes cardiaques peuvent être originaires du processus d'EMT (*Epithelial-Mesenchymal Transition*), du processus d'EndMT (*Endothelial-Mesenchymal Transition*), des cellules périvasculaires, de la prolifération et de la migration de fibroblastes résidents et des cellules souches de la moelle osseuse. (21) avec la permission de John Wiley and Sons.

**1.1.2.2.3 Les fonctions des fibroblastes cardiaques**

**Figure 8 : Fonctions des fibroblastes cardiaques**



Les fibroblastes cardiaques synthétisent des cytokines et facteurs de croissances, ce qui permet la production et la dégradation de la matrice extracellulaire. Ces cellules permettent aussi la prolifération des cellules cardiaques, participent passivement à l'électrophysiologie cardiaque et contribuent à l'angiogenèse cardiaque. (21) avec la permission de John Wiley and Sons.

En plus de jouer un rôle dans la synthèse et la dégradation d'ECM, les fibroblastes cardiaques sont essentiels à la structure cardiaque, la mécanique cardiaque, l'électricité cardiaque, la biochimie cardiaque, le développement cardiaque et la réparation suite à un dommage (Voir Figure 8) (4, 21). Ainsi, ils contribuent à la préservation de la fonction cardiaque, car ils sont capables de réagir suite à la détection d'un changement dans leur environnement (21).

Les fibroblastes cardiaques permettent de maintenir l'homéostasie de l'ECM, et ce, en réponse à des facteurs de croissance, des cytokines ou de l'étirement mécanique (Voir Figure 8) (21). Ainsi, ils produisent du collagène, de l'élastine, de la laminine, des protéoglycanes, des glycoprotéines, des cytokines, des facteurs de croissances ou des protéases pour réguler l'homéostasie de l'ECM (21, 37, 38). De plus, les fibroblastes cardiaques peuvent dégrader cette matrice en induisant l'expression des MMP (*Matrix Metalloproteinase*) ou des TIMP (*Tissue Inhibitor of MMP*) (21, 39). Cette action de maintien de l'homéostasie de l'ECM s'avère essentielle, et ce, pour diverses raisons. L'ECM sert d'échafaudage en entourant et en reliant les cellules cardiaques les unes aux autres; elle transmet les signaux mécaniques cardiaques et elle permet l'isolation électrique des ventricules et des oreillettes (21). Conjointement, ces fonctions de l'ECM permettent une contraction cardiaque optimale.

Les fibroblastes cardiaques ont aussi un impact sur les différents types cellulaires cardiaques, car ils induisent la prolifération ou encore l'apoptose de ces cellules via la production et la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissances (Voir Figure 8) (4, 21). D'ailleurs, malgré la controverse engendrée, il a été démontré que les cardiomyocytes sont capables de proliférer lentement pour contribuer à l'homéostasie cardiaque (9-11, 16-18, 21). Ainsi, puisqu'il a été prouvé que les fibroblastes cardiaques produisent et sécrètent du FGF et de la périostine, soit des molécules qui stimulent *in vitro* et *in vivo* la prolifération des cardiomyocytes adultes, il est possible de spéculer que les fibroblastes cardiaques contribuent à la prolifération des cardiomyocytes lors du développement embryonnaire, mais également à l'âge adulte (3, 4, 10, 21, 40). Également, il a été démontré que les fibroblastes cardiaques peuvent stimuler la réponse fibrotique et hypertrophique des cardiomyocytes à la suite d'une lésion du cœur adulte (4). De plus, les fibroblastes cardiaques produisent et sécrètent du FGF



et du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) pour stimuler l'angiogenèse, soit la formation de capillaires sanguins à partir d'un réseau vasculaire existant (Voir Figure 8) (21, 41). Cependant, les fibroblastes cardiaques peuvent également inhiber l'angiogenèse cardiaque en produisant et sécrétant des molécules anti-angiogéniques, telles que le PDGF et de CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*) (21, 41).

Malgré le fait que les fibroblastes cardiaques sont des cellules non excitables, ceux-ci participent à l'électrophysiologie cardiaque (Voir Figure 8) (4, 21). En effet, via la production d'ECM, les fibroblastes cardiaques peuvent moduler passivement la propagation des influx en isolant certaines sections du système de conduction (4, 21, 34). Cependant, les fibroblastes cardiaques peuvent également participer activement à l'électrophysiologie cardiaque, car ils sont de bons conducteurs de signaux électriques dû à leur membrane qui possède une très grande résistance (21, 42). De plus, les fibroblastes cardiaques sont reliés aux cardiomyocytes via les connexines 43 et 45 de leurs jonctions communicantes afin de transmettre davantage les signaux électriques et permettre une synchronisation accrue de la contraction de cardiomyocytes distants les uns des autres (4, 21, 42-44). Enfin, les fibroblastes cardiaques sont également des transducteurs mécano-électriques efficaces, dû à la présence de plusieurs canaux ioniques activés par l'étirement (21, 45). Ainsi, suite à la contraction du myocarde, un stimulus mécanique est induit, ce qui provoque l'ouverture des canaux sodiques, calciques et potassiques présents à la membrane plasmique des fibroblastes cardiaques et la diminution concomitante du potentiel d'action membranaire de ces cellules (21, 45-47).

### **1.1.3 L'INFARCTUS DU MYOCARDE**

L'infarctus du myocarde est la conséquence d'une occlusion partielle ou complète d'une artère coronaire. Ce faisant, toute irrigation sanguine desservie par cette artère en aval de l'occlusion est obstruée, ce qui induit une interruption de l'apport en oxygène à cette partie du muscle cardiaque. Si l'ischémie qui en résulte n'est pas reperfusée rapidement, alors cela entraîne la nécrose des cardiomyocytes présents dans la zone ischémisée (Voir Section 1.1.3.3.1.1), suivie d'une forte réponse inflammatoire (Voir Section 1.1.3.3.1.2) et enfin de la formation d'une cicatrice cardiaque via la fibrose réparative (Voir Section 1.1.3.3.1.3), ce qui permet de maintenir l'intégrité structurelle du cœur endommagé.

#### ***1.1.3.1 L'épidémiologie et les facteurs de risques des maladies cardiovasculaires et de l'infarctus du myocarde***

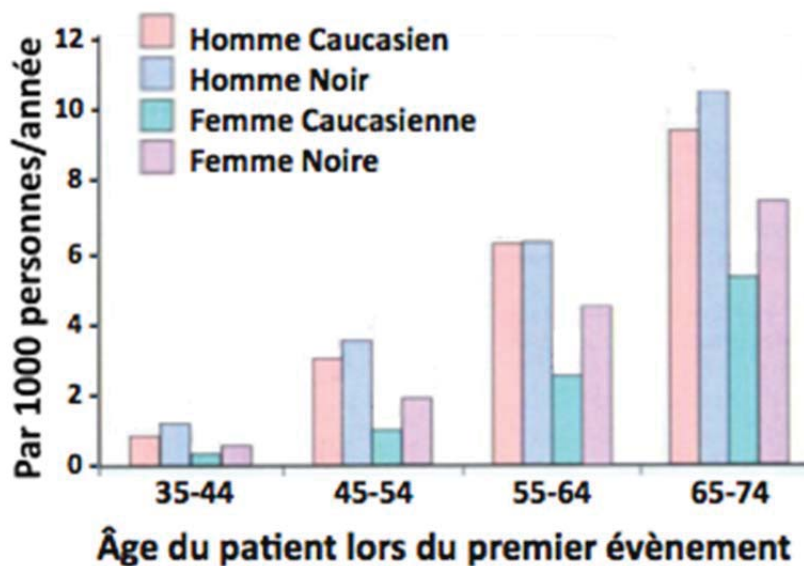
Les maladies cardiovasculaires ont été la cause principale de mort à travers le monde lors de la dernière décennie et elles ont été responsables de 29% des décès en 2001 (48). Ce phénomène a été observé dans le dernier siècle dans les pays riches et développés, mais désormais les pays à revenus faibles et intermédiaires voient une augmentation inquiétante de leur taux d'individus atteints des maladies cardiovasculaires (48). Les facteurs de risques des maladies cardiovasculaires sont multiples. Un premier facteur est l'hypertension qui est définie comme étant une pression sanguine de 140/90 mm de mercure ou supérieure (48). Cependant, le taux d'hypertension non diagnostiquée, et donc non traitée, est très élevé. Ainsi, il a été estimé que 14% des décès mondiaux sont attribuables à des niveaux non optimaux, ou non contrôlés, de pression artérielle (48). Un second facteur est le cholestérol, puisqu'un taux élevé de cholestérol *Low-Density Lipoproteins* (LDL) sanguin est responsable de 56% des cardiomyopathies ischémiques à travers le monde (48). Cependant, les cholestérols *High-Density Lipoproteins* (HDL) sont de bons cholestérols, puisqu'ils améliorent la santé cardiovasculaire. En effet, à chaque augmentation de 1 mg/dL d'HDL cholestérol, il y a une diminution de 2 à 3% de risque de développer des maladies cardiovasculaires (48). Ensuite, la consommation tabagique est considérée comme étant un facteur de risque important qui pourrait être facilement évitable. Il ne faut pas oublier que la fumée secondaire participe à

l'accroissement de 1,31 fois du risque d'être atteint de troubles cardiovasculaires (48). L'inactivité physique est également un facteur de risque de maladies cardiovasculaires qui a une prévalence importante dans les pays riches. Les lignes directrices actuelles suggèrent soit de l'exercice modéré durant 30 minutes 5 fois par semaines ou encore une activité physique soutenue et intense pendant 20 minutes 3 fois par semaines, mais malheureusement peu d'individus les respectent. Une alimentation inappropriée constituée de gras animal saturé, d'acides gras trans et de carbohydrates simples constitue aussi un facteur de risque de troubles cardiovasculaires. En fait, une combinaison d'un manque d'exercice à une alimentation malsaine peut mener indubitablement à de l'obésité, une autre cause importante de maladies cardiovasculaires. Une étude réalisée en 2005 a estimé que 23% des adultes âgés de plus de 20 ans ont un surpoids, c'est-à-dire que leur indice de masse corporelle (IMC) est supérieur à 25, et qu'un 10% additionnel de la population adulte est obèse (IMC>30) (48). Enfin, le diabète est aussi une maladie ayant une grande prévalence, affectant près de 180 millions de personnes dans le monde, qui a un impact important sur le développement des maladies cardiovasculaires (48). En effet, l'impact du diabète de type 2 sur la santé cardiovasculaire est tel que cela induit un risque comparable à vieillir de 15 ans (48). Également, les patients atteints de diabète sont de 2 à 4 fois plus susceptibles d'avoir des événements cardiovasculaires (48). En somme, les maladies cardiovasculaires ont une prévalence beaucoup trop importante actuellement, dû à une diversité de facteurs de risques.

En 2005 est paru un document du *World Bank Country Group* qui avait pour objectif d'établir une estimation du fardeau mondial des maladies en 2001. Ce document révèle que dans les pays développés (*High income*), tels que les États-Unis, le Canada, le Japon, l'Australie, la Nouvelle-Zélande et les pays de l'Union Européenne, les maladies cardiovasculaires sont responsables de 38,5% des décès (48, 49). Également, chez les populations des pays développés, les maladies coronaires sont les plus mortelles parmi les maladies cardiovasculaires, puisqu'elles sont imputables de 45% des décès (48). Ainsi, aux États-Unis en l'an 2005, 1 255 000 événements d'infarctus du myocarde sont survenus (48). Toutefois, il est à noter que la recherche constante dans ce domaine afin de découvrir de nouvelles thérapies a porté ses fruits. Ainsi, au Canada, de 2001 à 2011, les maladies cardiovasculaires sont passées de la première cause de décès, avec 32,1% des décès totaux, à

la deuxième cause de décès, avec 19,7%, derrière les différentes formes de cancers (50). Évidemment, la prévalence de l'incidence d'un infarctus du myocarde augmente avec l'âge, et ce, tant chez les hommes que chez les femmes (Voir Figure 9) (48, 51). Cependant, l'incidence de la première crise cardiaque diffère également en fonction de la race et du sexe. Ainsi, les hommes et les femmes noirs sont en général plus à risque de subir un infarctus du myocarde que les hommes et les femmes caucasiens, alors que les femmes semblent davantage être protégées que les hommes de l'avènement de cet incident cardiovasculaire néfaste (48, 51). Enfin, il est reconnu que chez environ 50% des patients subissant un infarctus du myocarde, en plus de la présence des facteurs de risques des maladies cardiovasculaires, il existe la présence d'un facteur précipitant, à savoir un trop grand stress émotif ou encore la réalisation d'un exercice lourd inhabituel, et ce, plus particulièrement chez les gens sédentaires et fatigués (48).

**Figure 9 : Taux annuel des premières crises cardiaques selon l'âge, le sexe et la race**



Données tirées du rapport de 2009 du comité des statistiques de l'American Heart Association. (48) avec la permission d'Elsevier.

### ***1.1.3.2 La principale cause de l'infarctus du myocarde : l'athérosclérose***

Les artères coronaires ont pour fonction d'assurer une perfusion sanguine suffisante aux cardiomyocytes, afin de leur acheminer les nutriments et les molécules d'oxygène nécessaires à leur rôle de cellules contractiles. La plupart des infarctus du myocarde sont consécutifs de l'athérosclérose d'une artère coronaire (48, 52, 53). Évidemment, l'athérosclérose est une pathologie pouvant survenir dans n'importe quelle artère de calibre moyen à large de l'organisme (1, 48). Cependant, lorsqu'il cause un infarctus du myocarde, ce processus délétère s'est souvent développé au niveau des artères coronaires. L'athérosclérose est une coronaropathie évolutive où une plaque d'athérosclérose est formée suite à la lésion d'une artère coronaire (1). Ainsi, le développement de cette pathologie peut être secondaire à différents facteurs de risques, tels que l'hérédité, l'hypertension artérielle, l'obésité, la sédentarité, le tabagisme, le diabète, l'hypercholestérolémie et la présence de lésions de l'endothélium coronaire (1, 54). Le développement de l'athérosclérose débute lorsque des molécules de LDL, soit le «mauvais» cholestérol, sont en excès dans la circulation sanguine, se déposent et s'accumulent au niveau de l'*intima* d'une artère coronaire ayant subi une lésion (1). Ensuite, ces lipoprotéines se lient aux protéoglycanes et sont alors plus susceptibles à diverses modifications, telles l'oxydation et la glycation (1, 48). Les lipoprotéines modifiées génèrent alors du stress oxydatif induisant la libération locale de cytokines, qui augmentent alors l'expression de molécules permettant l'adhésion des leucocytes au niveau des cellules endothéliales (48). De cette façon, un recrutement de leucocytes est induit via la molécule d'adhésion VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) nouvellement présente à la surface des cellules endothéliales d'un site d'initiation de l'athérome au niveau de l'artère coronaire (48, 52). Puis, les leucocytes, tels les monocytes sanguins, infiltrent la paroi du vaisseau et migrent jusqu'à l'*intima* de ce vaisseau via l'action chimioattractante des chimiokines, telles que le MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) (48, 52). Une fois dans l'*intima*, les monocytes se différencient en macrophage, puis en cellules spumeuses qui expriment fortement le SRA (*Scavenger Receptor A*) et le CD36 (*thrombospondin receptor*), ce qui leur permet de phagocyter des lipoprotéines modifiées (48, 52). Cela mène ensuite à la déposition d'une strie de lipides au niveau de l'*intima* de l'artère coronaire, puis à un épaississement de la paroi vasculaire via la migration des CML au niveau de l'*intima* (48, 52).

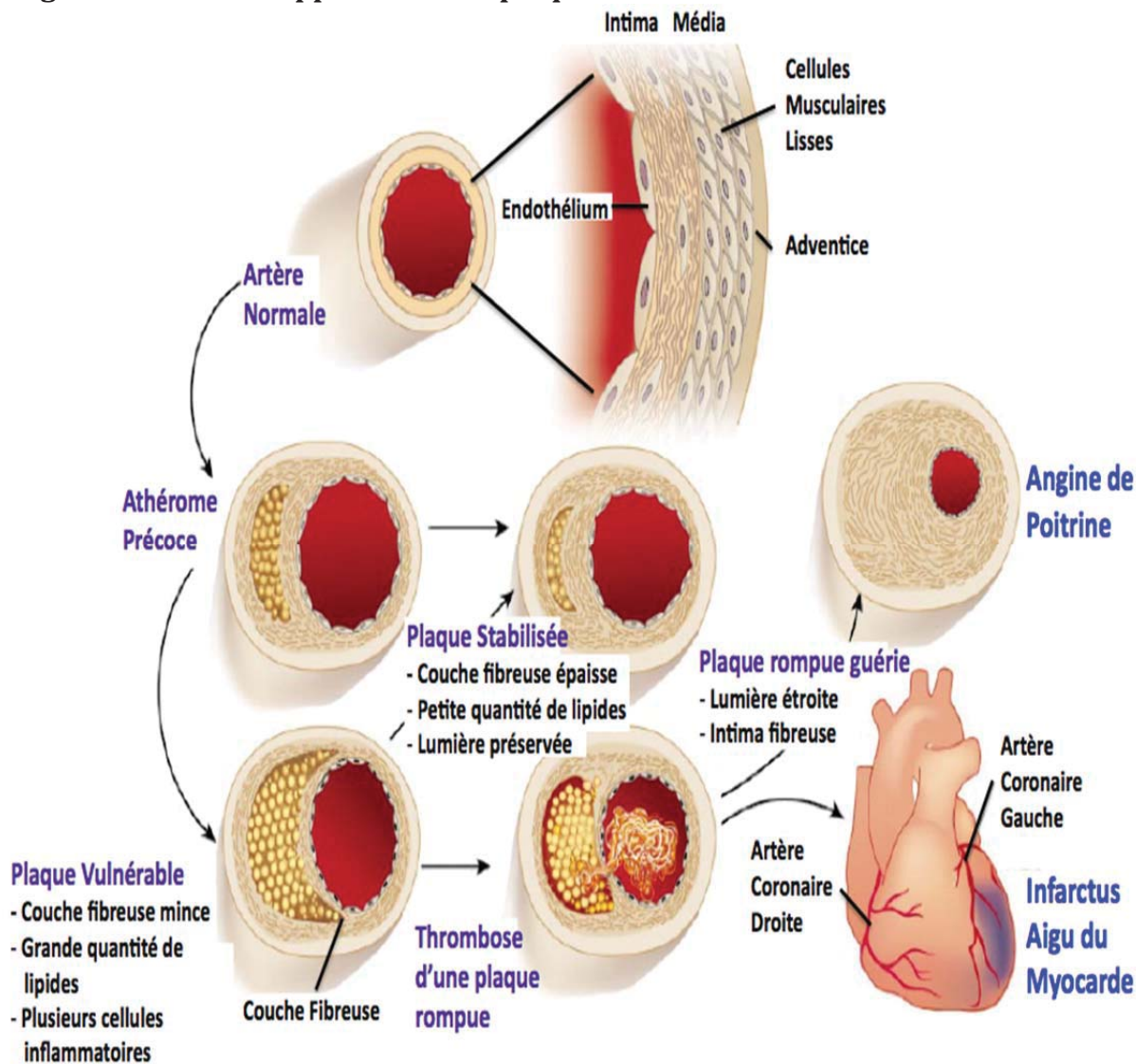
Enfin, les CML produisent et sécrètent de l'ECM, ce qui mène à la formation d'un athérome précoce ayant une couche fibreuse (Voir Figure 10) (48, 52). D'ailleurs, cette couche fibreuse peut parfois se calcifier, provoquant la rigidité du vaisseau (48). Une fois cet athérome précoce formé, celui-ci peut prendre de l'expansion en présence de la dyslipidémie et de cytokines pro-inflammatoires (48, 52). Ce faisant, la couche fibreuse de la plaque s'amincit progressivement, ce qui la rend instable et beaucoup plus vulnérable à une rupture (48, 52). La plupart du temps, si cette plaque se rompt, alors les facteurs de coagulation présents dans la circulation sanguine vont entrer en contact avec des facteurs tissulaires au niveau de la plaque (52). Par la suite, la cascade de coagulation produit de la thrombine qui active les plaquettes, ce qui génère la formation d'un thrombus. Le caillot ainsi généré peut alors provoquer un infarctus du myocarde (Voir Figure 10), soit en bloquant l'artère directement au niveau du site d'initiation de l'athérome, ou encore le thrombus peut être transporté dans la circulation pour obstruer une artère coronaire plus petite en aval, ce qui bloque ou réduit substantiellement la circulation sanguine au niveau de cette artère coronaire (48, 52-54). L'occlusion d'une artère coronaire initie un mécanisme de protection : la dilatation d'anastomoses contribue à générer un réseau de capillaires collatéraux permettant de dévier la circulation sanguine (54). Ce faisant, 1 mois suite à l'occlusion, il est parfois possible d'observer une circulation coronarienne pratiquement normale chez des patients dont le myocarde a réussi à être préservé quasiment intégralement via la présence d'un réseau de capillaires coronaires collatéraux (54).

L'athérosclérose peut également être responsable d'une crise d'angine de poitrine (Voir Figure 10) (52). En effet, l'athérome précoce formé peut aussi donner naissance à une plaque stable. Cependant, avec le temps, l'athérome peut prendre de l'expansion, provoquant un rétrécissement progressif du vaisseau, ce qui induit alors une réduction du débit sanguin et mène à de l'angine de poitrine. Également, suite à la rupture de la plaque et à la formation du thrombus, celui-ci peut être résorbé via des agents thrombolytiques exogènes ou endogènes (48, 52). Cependant, la thrombine générée lors de la cascade de coagulation est reconnue pour induire une cicatrisation, qui peut alors stimuler la prolifération des CML et la sécrétion de collagène (48, 52). Ainsi, le diamètre de la lumière est rétréci, provoquant une réduction du débit sanguin, particulièrement en situation de grande demande suite à un stress ou un effort,



ce qui provoque alors de l'angine de poitrine (48, 52). Évidemment, d'autres causes d'infarctus du myocarde sont aussi possibles, mais moins fréquentes, telles que la présence d'une maladie des artères coronaires autre que l'athérosclérose, une embolie des artères coronaires, des anomalies congénitales des artères coronaires, une demande accrue en oxygène myocardique ou encore des troubles hématologiques (48, 55).

**Figure 10: Le développement de la plaque d'athérosclérose**



Lorsqu'un athérome précoce est formé, la couche fibreuse de celui-ci peut s'amincir progressivement, ce qui rend la plaque instable. À ce moment, la plaque d'athérosclérose peut se rompre, puis induire la formation d'un thrombus, ce qui peut provoquer un infarctus du myocarde. La plaque rompue peut également induire une réponse de cicatrisation, ce qui réduit la lumière de l'artère coronaire et mène alors à de l'angine de poitrine. (52) avec la permission de Nature Publishing Group.

### ***1.1.3.3 La physiopathologie de l'infarctus du myocarde***

Un infarctus du myocarde peut survenir lorsqu'il y a une occlusion partielle ou complète d'une artère coronaire. Conséquemment, la zone du myocarde desservie par l'artère coronaire ayant subi l'occlusion subit l'arrêt de son irrigation sanguine (53). Ce phénomène, aussi connu sous le terme d'ischémie, induit une interruption de l'apport en oxygène, une hypoxie, à cette partie du muscle cardiaque. Si l'ischémie qui en résulte n'est pas reperfusée rapidement, ou encore s'il y a absence d'un réseau suffisant de capillaires coronaires collatéraux dans la zone ischémisée pour pallier au manque d'apport sanguin, alors cela engendre la nécrose des cardiomyocytes présents dans cette zone (56). Ce faisant, le myocarde ischémié et nécrosé est incapable de maintenir sa capacité contractile usuelle (53). La mort des cardiomyocytes entraîne alors une forte réponse inflammatoire pour entamer le processus de guérison (6, 53, 57). De plus, cette réponse inflammatoire induit un remodelage ventriculaire caractérisé par des changements moléculaires et cellulaires au niveau de la zone ischémisée, de la zone bordant la zone ischémisée, ainsi que de la zone non ischémisée (3, 53, 57). Ainsi, dans la zone ischémisée, le remodelage cardiaque contribue à la formation d'une cicatrice cardiaque, qui est une réponse physiologique essentielle permettant de maintenir l'intégrité structurelle du cœur endommagé (6). En effet, le myocarde endommagé est remplacé par du tissu cicatriciel non contractile, mais conférant tout de même une certaine élasticité à cette partie du ventricule (1). En parallèle, le remodelage cardiaque de la zone non infarctée permettra au cœur de s'adapter à la perte de contractilité afin de maintenir une fonction cardiaque suffisante. En effet, le remodelage ventriculaire contribue à la restructuration de l'architecture et de la géométrie du ventricule qui a subi l'ischémie (53). Cependant, ce remodelage cardiaque peut mener à la dilatation de la chambre ventriculaire, à l'hypertrophie des parois cardiaques et à la modification de la structure tridimensionnelle du cœur qui tend désormais davantage vers une sphère plutôt qu'une ellipse (53, 57).

Il a été déterminé que le processus de remodelage subséquent à un infarctus du myocarde se divise en deux phases, soit la phase précoce qui survient dans les 72 heures suivant le début de l'ischémie, et la phase tardive qui débute passée ces 72 heures (57). La première phase implique la perte aigüe des cardiomyocytes via principalement l'apoptose et la



nécrose cellulaire qui déclenchent le processus inflammatoire, ce qui contribue à l'expansion de la zone de l'infarctus (57). Parfois, cette phase précoce peut être associée à la formation d'un anévrisme ou encore à la rupture du ventricule (53, 57). La phase de remodelage tardive implique le ventricule gauche dans son ensemble, qui tente de normaliser la fonction cardiaque via des processus structurels, tels la dilatation du ventricule en fonction du temps, la distorsion de la forme du ventricule ischémiquement atteint, ainsi que l'hypertrophie compensatoire du myocarde non infarcté (53, 57). Le processus de remodelage ventriculaire peut perdurer durant des semaines et même des mois, et ce, jusqu'à ce que la cicatrice formée parvienne à neutraliser les forces de distension via sa résistance à la traction (57). Cependant, si le stress induit sur la paroi ventriculaire ne parvient pas à être normalisé, alors la dilatation ventriculaire s'accroît progressivement, ce qui mène à une détérioration de la fonction contractile (57). À ce moment, l'infarctus du myocarde peut progresser vers de l'insuffisance cardiaque et des arythmies ventriculaires (53).

Évidemment, les caractéristiques propres à l'infarctus influencent l'étendue de la perte de tissu contractile, et donc la taille de la cicatrice formée lors du processus de réparation (57). Ainsi, la taille de la cicatrice est dépendante de la localisation de l'ischémie, la taille de la zone à risque (soit l'ensemble du myocarde irrigué par l'artère coronaire occlusée), si l'ischémie est transmurale ou non, la demande cardiaque au moment de l'ischémie, la durée de l'ischémie (qui peut être réduite si une reperfusion est réalisée dans de bons délais), la perméabilité de l'artère occlusée et la présence d'un débit collatéral existant (56, 57). De plus, la taille de la cicatrice cardiaque peut être modulée en fonction de la capacité à former *de novo* des collatérales coronaires à la suite de l'hypoxie via l'angiogenèse, ainsi qu'en fonction de la capacité à induire un processus d'artériogenèse (56, 57). Or, l'artériogenèse permet un remodelage du réseau de collatérales coronaires existant et est induite par des contraintes de cisaillement sur la paroi vasculaire afin d'augmenter le flux sanguin dans la zone ischémisée (56, 57).

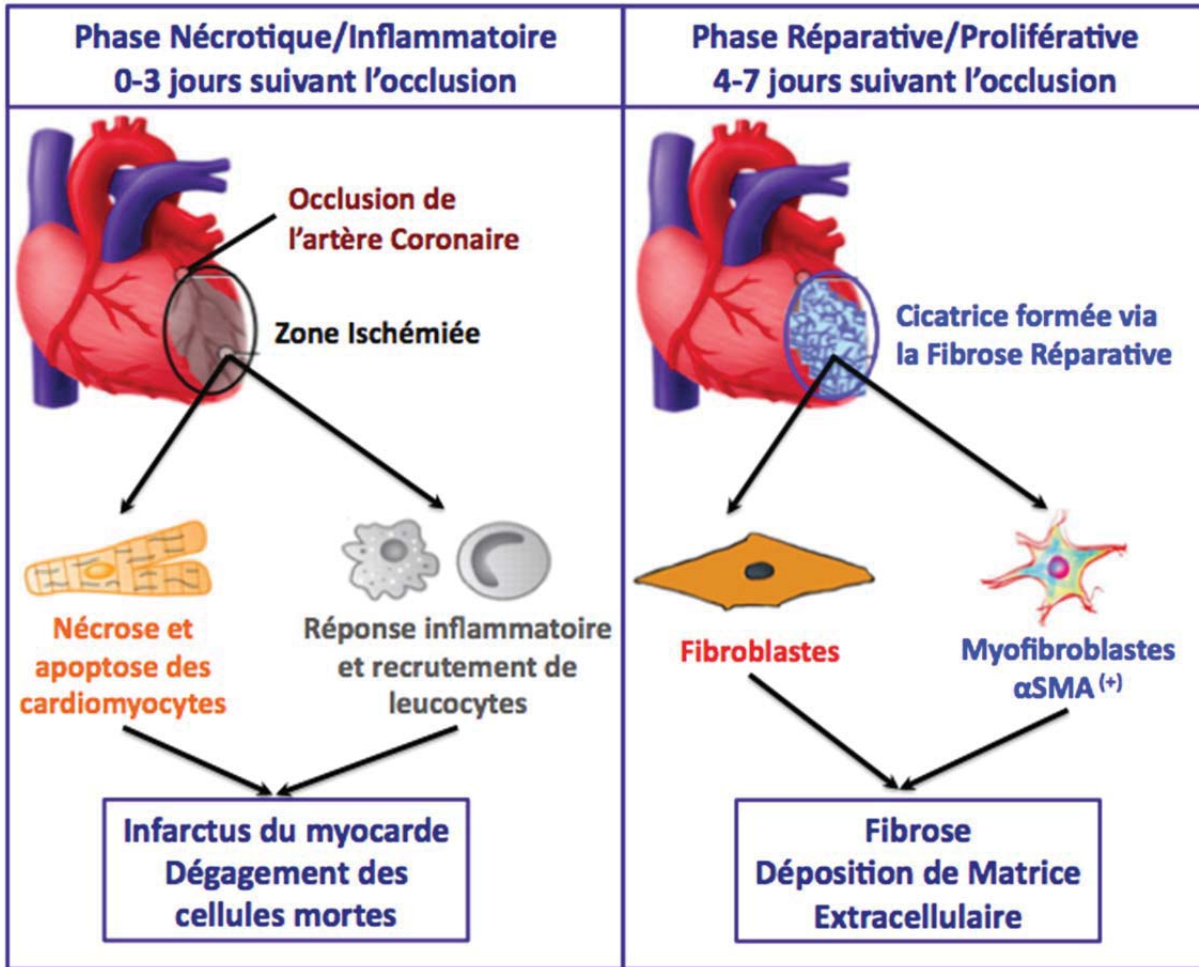
### ***1.1.3.3.1 La région ischémique***

À la suite de l'infarctus du myocarde, plusieurs évènements surviennent dans la zone ischémique afin de contribuer au remodelage ventriculaire. Ainsi, le processus de réparation tissulaire débute de manière aiguë avec la nécrose et l'apoptose des cardiomyocytes lésés, ce qui induit ensuite la réponse inflammatoire permettant de nettoyer la région infarctée des cellules mortes et des débris de matrice (Phase Nécrotique/Inflammatoire, Voir Figure 11) (3, 6, 14, 53, 57). Par la suite, le processus de fibrose réparative, contribuant à la formation de la cicatrice cardiaque, est également initié par la réponse inflammatoire, ce qui induit le recrutement des fibroblastes cardiaques de la zone non infarctée. Ce faisant, ils migrent vers la zone infarctée et se différencient en myofibroblastes cardiaques, puis ceux-ci prolifèrent et sécrètent massivement du collagène et de l'ECM pour former la cicatrice cardiaque (Phase Proliférative/Réparative, Voir Figure 11) (3, 14). Enfin, une bonne cicatrisation cardiaque est également associée à l'initiation de processus d'angiogenèse et de neurogenèse dans la zone ischémique (3, 6, 8, 58-75).

#### **1.1.3.3.1.1 La mort des cardiomyocytes via nécrose et apoptose cellulaire**

L'interruption de l'apport en oxygène provoque un déséquilibre entre l'apport et la demande en oxygène au niveau du myocarde perfusé par l'artère coronaire occlusée (48). Ce faisant, si ce déséquilibre survient de manière prolongée, cela entraîne la nécrose des cardiomyocytes présents dans la zone ischémique (48). En effet, les cardiomyocytes de cœurs de mammifères sont incapables de produire de l'énergie en quantité suffisante pour maintenir les processus cellulaires en situation d'anaérobie (53). Ainsi, lorsqu'une artère coronaire est obstruée, il y a une diminution de la tension d'oxygène au niveau des cardiomyocytes présents dans la zone ischémique, ce qui empêche la phosphorylation oxydative et diminue la production d'ATP (adénosine triphosphate) qui active la pompe NaK-ATPase (53). Or, si cette pompe ne fonctionne pas, alors l'influx de sodium et d'eau sortant est bloqué, menant au gonflement des cardiomyocytes (53). De plus, après aussi peu que 10 secondes d'occlusion, le métabolisme aérobie est arrêté, il y a un épuisement des réserves d'ATP et une production d'acide lactique via le métabolisme anaérobie (Voir Figure 12) (48, 53).

Figure 11 : Schématisation de la phase Nérotique/Inflammatoire et de la phase Réparative/Proliférative qui sont induites à la suite d'un infarctus du myocarde



L'occlusion de l'artère coronaire provoque la nécrose et l'apoptose des cardiomyocytes, ce qui initie une réponse inflammatoire et le recrutement de leucocytes. Quatre jours suivant l'ischémie, la réponse inflammatoire stimule la prolifération des fibroblastes et des myofibroblastes, ce qui mène à la déposition de matrice extracellulaire et à la formation de la cicatrice cardiaque via la fibrose réparative. *Image inspirée de (14).*

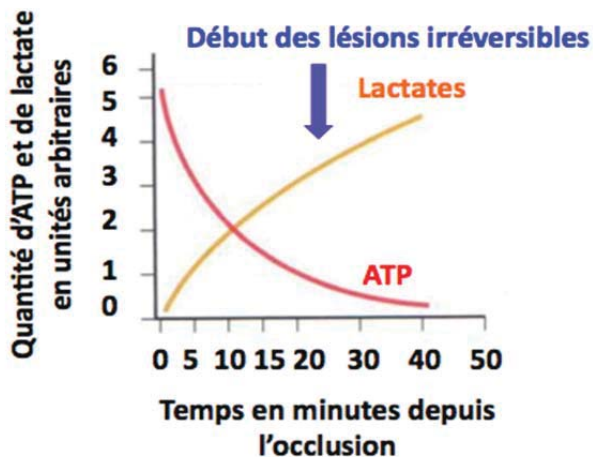


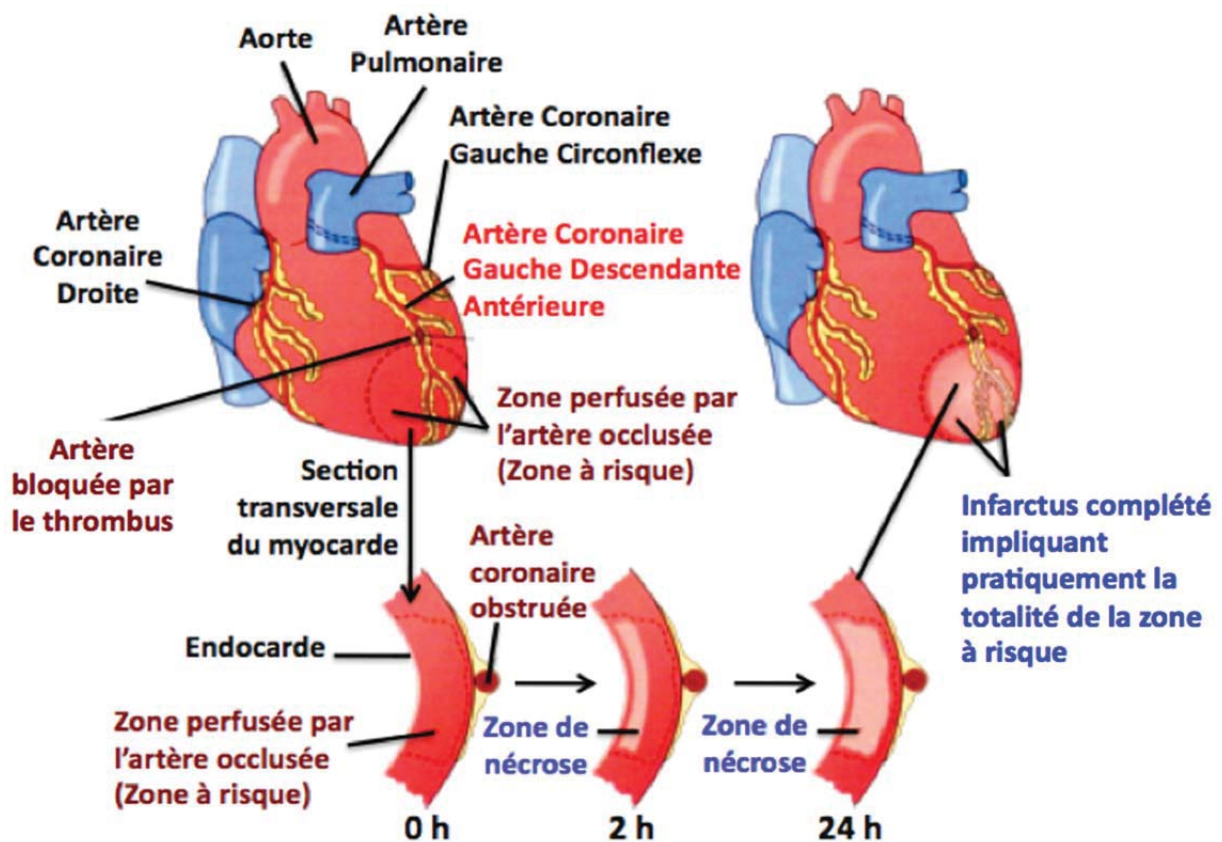
Figure 12 : Les lésions irréversibles des cardiomyocytes surviennent à environ 20 à 40 minutes suivant l'occlusion de l'artère coronaire

Lorsque les réserves d'ATP (Adénosine Triphosphate) sont épuisées et que la production de lactate est augmentée de manière importante, alors les lésions irréversibles du tissu cardiaque commencent à survenir. (48) avec la permission d'Elsevier.

De plus, on observe déjà après 10 secondes la perte progressive de contractilité cardiaque, qui devient substantielle après 1 minute d'ischémie (53). D'ailleurs, c'est à ce moment, soit quelques minutes suivant l'occlusion, que des modifications structurelles, mais réversibles, des cardiomyocytes surviennent, tel que l'épuisement des réserves de glycogène, ainsi que le gonflement mitochondrial et cellulaire. Cependant, si l'occlusion perdure au-delà de 20 à 40 minutes ou s'il n'y a pas eu de reperfusion avant la fin de ce délai, alors des dommages irréversibles commencent à survenir au niveau du myocarde ischémié, tels une rupture du sarcolemme et la présence de petites densités amorphes dans les mitochondries (48, 53, 76). À ce moment, la mort des cardiomyocytes est enclenchée via principalement la nécrose de coagulation, mais le processus d'apoptose est également observé (48, 77). La nécrose de coagulation survient particulièrement lors du premier jour où l'artère coronaire est obstruée et peut aussi persister lors des jours suivants (48). Cette nécrose est habituellement présente au niveau de la zone centrale de l'ischémie et se caractérise par l'arrêt des cardiomyocytes dans leur état relaxé (48). Cela se traduit par un étirement passif des cellules musculaires présentes dans la zone ischémiée, et conséquemment d'un étirement des myofibrilles (48). Ce faisant, plusieurs des cardiomyocytes présentent de la rétraction nucléaire et de la congestion vasculaire est observée au niveau des myofibrilles, ce qui induit un processus de guérison où les cardiomyocytes nécrosés sont phagocytés (48). Enfin, les cardiomyocytes subissant la nécrose viennent à perdre leur intégrité membranaire et à libérer leur contenu cellulaire, ce qui initie une réponse inflammatoire intense associée à l'immunité innée (53, 78). De plus, l'apoptose, une mort cellulaire programmée, contribue aussi à la mort des cardiomyocytes en hypoxie (48, 53, 78). Contrairement au processus de nécrose de coagulation, les cardiomyocytes qui subissent l'apoptose présentent un rétrécissement cellulaire, une condensation de la chromatine et une fragmentation de l'ADN (48). Cependant, lors de l'apoptose, les cardiomyocytes conservent leur intégrité membranaire durant le processus et leur mort cellulaire se termine lorsqu'ils sont phagocytés par les macrophages, et ce, sans induire un processus d'inflammation (78). L'apoptose peut également survenir peu de temps après le début de l'ischémie myocardique, mais son apport est plus substantiel lors du remodelage ventriculaire tardif secondaire à l'infarctus du myocarde (48).

Le processus de nécrose est habituellement initié à la suite d'une ischémie sévère et persistante dans une petite zone du myocarde, située au centre de la zone ischémisée (zone à risque) et en dessous de la surface endocardique (Voir Figure 13) (48). Évidemment, une partie étroite du myocarde, située tout juste sous l'endocarde, est épargnée de la nécrose, car son oxygénation est permise via la diffusion du sang présent à l'intérieur même du ventricule (48). La propagation de la nécrose induit une mort progressive des cardiomyocytes qui débute au niveau du myocarde subendocardique et se dirige vers l'épicarde (Voir Figure 13) (48). Au bout de 24 heures d'occlusion, la phase de nécrose est complétée. Si le patient atteint n'a pas de réseau d'artères coronaires collatérales, ou s'il ne reçoit pas un traitement ou une reperfusion dans ce délai, alors la taille de l'infarctus induit correspond pratiquement à celle

**Figure 13 : Représentation de la progression de la nécrose myocardique à la suite de l'occlusion d'une artère coronaire**



Une vingtaine de minutes suivant l'occlusion de l'artère coronaire, la nécrose débute au sein d'une zone du myocarde située tout juste sous la surface de l'endocarde. La zone nécrosée va augmenter en fonction du temps, de l'intérieur vers l'extérieur du myocarde, et dépend de la zone à risque et de la reperfusion. (48) avec la permission d'Elsevier.



de la zone à risque, donc tout le myocarde perfusé par l'artère coronaire occlusée est ischémié (48). Dépendamment de l'étendue de la nécrose, on distingue deux types d'infarctus du myocarde, soit le transmural et le subendocardique, ou le non-transmural (48). Ainsi, si la nécrose atteint la totalité de l'épaisseur du myocarde de la paroi ventriculaire, on parle alors d'un infarctus transmural (48). Cependant, si la nécrose atteint soit le myocarde sous-endocardique, soit le myocarde intramural, ou encore ces deux parties du myocarde mais que la nécrose ne s'étend pas tout le long du myocarde sous-endocardique à l'épicarde, alors on parle d'un infarctus du myocarde subendocardique (48).

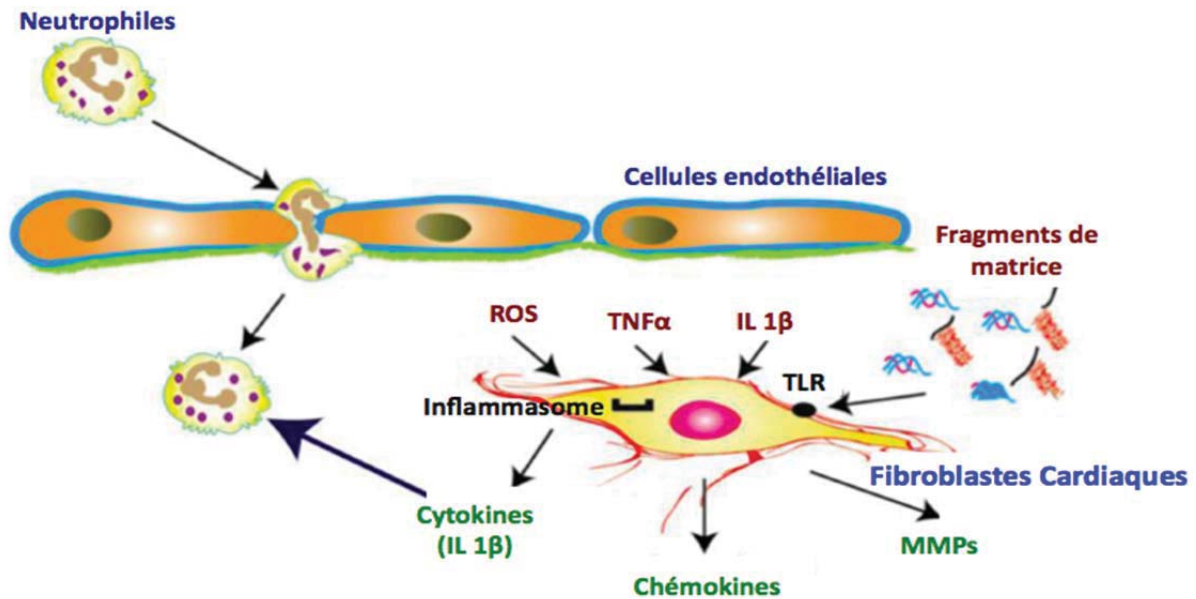
#### **1.1.3.3.1.2 La phase inflammatoire**

Puisque le cœur des mammifères a peu de capacité régénérative, la nécrose des cardiomyocytes entraîne une forte réponse inflammatoire essentielle permettant de nettoyer la région ischémiée des cellules mortes et des débris de matrice, mais qui contribue également à initier la cicatrisation cardiaque (3, 6, 77). Une fois nécrosés, les cardiomyocytes relâchent leur contenu intracellulaire et cela active différents mécanismes de l'immunité innée qui reconnaît ces signaux de danger (3, 77). Ainsi, différentes voies de l'immunité innée, telles la DAMP (*Damage-Associated Molecular Patterns*), la cascade du complément et la HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*), sont initiées de manière précoce dans le processus inflammatoire par le contenu intracellulaire relâché par les cellules nécrosées (3, 53, 68, 77). De plus, les cardiomyocytes nécrosés sont évidemment entourés de débris d'ECM, et ce faisant des fragments de matrice peuvent également activer une autre des voies de l'immunité innée, soit celle induite via les récepteurs TLR (*Toll-Like Receptors*) présents à la membrane des leucocytes (3, 53, 77, 79). Aussi, suite à l'ischémie, des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*) sont générés et induisent alors des signaux inflammatoires, puisque le processus de défense via les antioxydants est totalement surchargé dans la région infarctée (3, 53, 68, 77). Ainsi, l'activation de la plupart de ces voies signalétiques de l'immunité innée a pour conséquence l'activation du NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor- $\kappa$ B*) qui permet la synthèse de cytokines, telles les interleukines (IL-1 $\beta$  et IL-6) et le TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ), et de chimiokines, telle la protéine chimioattractante des monocytes (*MCP-1*) et le facteur des cellules souches (SCF, *Stem Cell Factor*) (3, 53, 68, 77). D'ailleurs, le NF- $\kappa$ B peut

également être activé directement via le TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$  (53, 68). Par la suite, la libération de ces médiateurs pro-inflammatoires permet le recrutement de leucocytes, tels les neutrophiles, les monocytes pro-inflammatoires et les mastocytes, au niveau de la zone myocardique ischémisée afin qu'ils réalisent la phagocytose des cardiomyocytes nécrosés et des débris d'ECM (53, 68, 77, 80, 81). Également, en parallèle, des macrophages activés libèrent des cytokines et divers facteurs de croissance pour permettre la formation de tissus de granulation vascularisés riches en protéoglycanes et d'ECM, afin de remplacer les cellules endommagées (6, 28, 53, 68, 77, 82).

En plus de l'immunité innée, différents types cellulaires résidents de la région ischémisée participent à l'initiation de la réponse inflammatoire. En effet, la littérature révèle que les cellules endothéliales, les mastocytes cardiaques ainsi que les fibroblastes cardiaques participent aussi à la relâche de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires (3, 83-85). D'ailleurs, les fibroblastes cardiaques sont des candidats idéaux pour détecter des modifications environnementales secondaires à l'infarctus du myocarde (3, 85). Ainsi, contrairement aux cardiomyocytes, les fibroblastes cardiaques sont beaucoup plus résistants au stress oxydant et ne présentent ainsi que peu ou pas d'ADN fragmenté à la suite d'une exposition au peroxyde d'hydrogène, soit un des dérivés réactifs de l'oxygène (3, 86). De plus, les fibroblastes cardiaques sont le type cellulaire le plus abondant, après les cardiomyocytes, dans le myocarde (3). Ils ont également un positionnement stratégique en étant placés entre les cardiomyocytes et ils ne succombent pas à la nécrose en présence d'ischémie (3). Dans les 24 à 72 heures suivant l'infarctus du myocarde, les fibroblastes cardiaques peuvent acquérir un phénotype pro-inflammatoire en réagissant à divers signaux pour induire le processus inflammatoire et permettre le recrutement de neutrophiles en synthétisant et sécrétant de l'IL-1 $\beta$  (Voir Figure 14) (3, 85). Ainsi, les fibroblastes cardiaques sont reconnus pour être activés via les dérivés réactifs de l'oxygène (Voir Figure 14) (3, 85). En effet, les ROS peuvent moduler les fonctions des fibroblastes et également stimuler la synthèse de cytokines par ce type cellulaire (3). Une étude réalisée par Kawaguchi et ses collègues a illustré l'implication des ROS à activer *in vitro* l'inflammasome des fibroblastes cardiaques, soit une plateforme moléculaire qui est activée chez un modèle d'ischémie-reperfusion chez la souris et qui permet

**Figure 14 : Les fibroblastes cardiaques résidents du myocarde ischémié contribuent à la réponse inflammatoire**



Les fibroblastes cardiaques détectent les dommages cardiaques. Ils sont activés par les ROS (*Reactive Oxygen Species*), les cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ ; *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  et IL-1 $\beta$ ; *Interleukine-1 $\beta$* ) et les fragments de matrice extracellulaire. Une fois activés, les fibroblastes peuvent initier en partie la réponse inflammatoire, via la sécrétion de chimiokines et de cytokines. TLR; *Toll-Like Receptors*, MMP; *Matrix Metalloproteinase*. (3) avec la permission d'Elsevier.

la synthèse d'IL-1 $\beta$  actif, ainsi que le déclenchement des caspases inflammatoires (3, 85, 87). De plus, les fibroblastes cardiaques sont sensibles à l'environnement riche en cytokines pro-inflammatoires caractéristique de l'environnement ischémié, si bien que des études *in vitro* ont démontré que l'IL-1 $\alpha$  et le TNF $\alpha$  ont la capacité de promouvoir la synthèse de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires par les fibroblastes cardiaques (Voir Figure 14) (3, 85, 88, 89). Enfin, les cytokines fortement présentes dans le myocarde ischémié, soit l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le TNF $\alpha$ , peuvent également induire *in vitro* l'expression de MMP par les fibroblastes cardiaques en culture (Voir Figure 14) (3, 90). En somme, les fibroblastes cardiaques sont donc des cellules sentinelles qui sont capables de détecter les signaux induits dans le myocarde ischémié, par les ROS, les cytokines pro-inflammatoires et les débris d'ECM, et qui réagissent à ceux-ci en initiant des cascades pro-inflammatoires (3, 85). Cependant, la contribution exacte des fibroblastes cardiaques dans la réponse inflammatoire est pour l'instant méconnue (3, 85). Chose certaine, les actions des fibroblastes cardiaques ne se limitent pas uniquement à



la phase inflammatoire, mais elles s'étendent également à la phase proliférative induite par la réponse inflammatoire (3). Ainsi, des expérimentations *in vitro* ont illustré que les fibroblastes cardiaques soumis à l'hypoxie acquièrent un phénotype pro-inflammatoire en exprimant diverses cytokines, mais aussi un phénotype fibrogène caractérisé par la transdifférenciation des fibroblastes en myofibroblastes et à une synthèse accrue de collagène par ceux-ci (3, 91-93).

L'histoire a révélé à quel point la réponse inflammatoire est essentielle à une cicatrisation cardiaque efficace et adéquate (77). En effet, dans la littérature, on dénombre plusieurs études cliniques qui avaient pour objectif de réduire la réponse inflammatoire à la suite de l'infarctus du myocarde, afin d'améliorer la survie chez les patients atteints (77). Cependant, certaines de ces thérapies ont eu des impacts délétères lorsqu'utilisées de manière aiguë à la suite de l'infarctus (77). Ainsi, l'utilisation dans les années 1970 de corticostéroïdes, tel le méthylprednisolone, et de glucocorticoïdes a eu des impacts catastrophiques en retardant le processus de guérison cardiaque, en plus d'accroître la taille de la cicatrice cardiaque, ainsi que de produire une cicatrice plus mince et plus susceptible à la rupture (77, 94-96). Ce faisant, les risques de formation d'anévrismes cardiaques étaient accrus, ainsi que les risques de rupture de la paroi ventriculaire, qui tous deux contribuaient à une augmentation de la mortalité chez les patients prenant la médication à l'essai (77, 94-96). Plus récemment, des approches thérapeutiques visant à bloquer les intégrines CD18 et à inhiber la cascade du complément, afin de réduire le recrutement des leucocytes, n'ont pas eu les effets escomptés lorsque administrés de manière aiguë chez des cohortes de patients ayant subi un infarctus du myocarde (77, 97, 98). Ces résultats peu probants lors d'études cliniques suggèrent donc que, malgré les bénéfices observés *in vivo*, cette stratégie visant la réponse inflammatoire n'est probablement pas efficace à améliorer la survie post infarctus du myocarde (77).

La réponse inflammatoire secondaire à l'infarctus du myocarde est caractérisée par l'accumulation d'une panoplie de cellules dans la région ischémisée, lesquelles contribuent à la synthèse et à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrotiques, ainsi que de chimiokines chimioattractantes (3). Une fois la région ischémisée libérée des cardiomyocytes nécrosés et des débris d'ECM, la réponse inflammatoire peut être stoppée (3). Ainsi, les

neutrophiles entrent en apoptose afin d'être phagocytés par les macrophages, alors que les lymphocytes et les macrophages génèrent des signaux inhibant les messages pro-inflammatoires via le TGF- $\beta$  et l'IL-10 (3). D'ailleurs, le TGF- $\beta$  sécrété par les leucocytes permet également de recruter des fibroblastes cardiaques de la région non ischémisée vers la zone ischémique, en plus de promouvoir la transdifférenciation de ce type cellulaire en myofibroblastes cardiaques (3, 6, 28, 68, 82, 99). Ce faisant, la phase proliférative peut débiter via non seulement le recrutement des fibroblastes cardiaques, mais aussi via l'infiltration de monocytes de réparation et de cellules endothéliales dans la zone ischémisée (3, 81).

#### **1.1.3.3.1.3 La phase proliférative associée à la fibrose réparative permet la formation de la cicatrice cardiaque**

La fin de la réponse inflammatoire via la relâche de TGF- $\beta$  par les leucocytes donne naissance à la phase proliférative nécessaire à la formation d'une cicatrice cardiaque permanente (3, 6). La formation de la cicatrice cardiaque résulte d'une réponse physiologique essentielle, soit la fibrose réparative (6, 28, 64, 69). L'objectif de la fibrose réparative est de maintenir l'intégrité structurelle du ventricule qui a subi l'ischémie en remplaçant les cardiomyocytes nécrosés par une cicatrice riche en collagène de type I et de type II principalement, ce qui permet d'éviter la rupture de la paroi myocardique (28, 57, 69, 100). Physiologiquement, le rôle de la cicatrice consiste à limiter le glissement des cardiomyocytes et à limiter la dilatation du ventricule ischémiquement atteint (6, 64, 70, 101-103). Ainsi, si le processus de fibrose réparative est entravé ou perturbé, dû à une déposition de collagène insuffisante, une réduction de la prolifération des myofibroblastes cardiaques et à une réponse angiogénique affaiblie, alors la cicatrification cardiaque peut être inadéquate et mener à un amincissement de la cicatrice, ainsi qu'à une expansion de la chambre ventriculaire et à un remodelage cardiaque néfaste (6, 64, 67, 70, 71, 101-104). D'ailleurs, une étude réalisée par Dai et ses collègues a révélé que l'injection de collagène dans la région ischémisée contribue à augmenter l'épaisseur de la cicatrice cardiaque et à améliorer la fonction cardiaque chez un modèle de rat ayant subi un infarctus du myocarde (103). Il est donc important de produire une bonne cicatrice avec une composition dense en collagène et en ECM via la fibrose réparative,

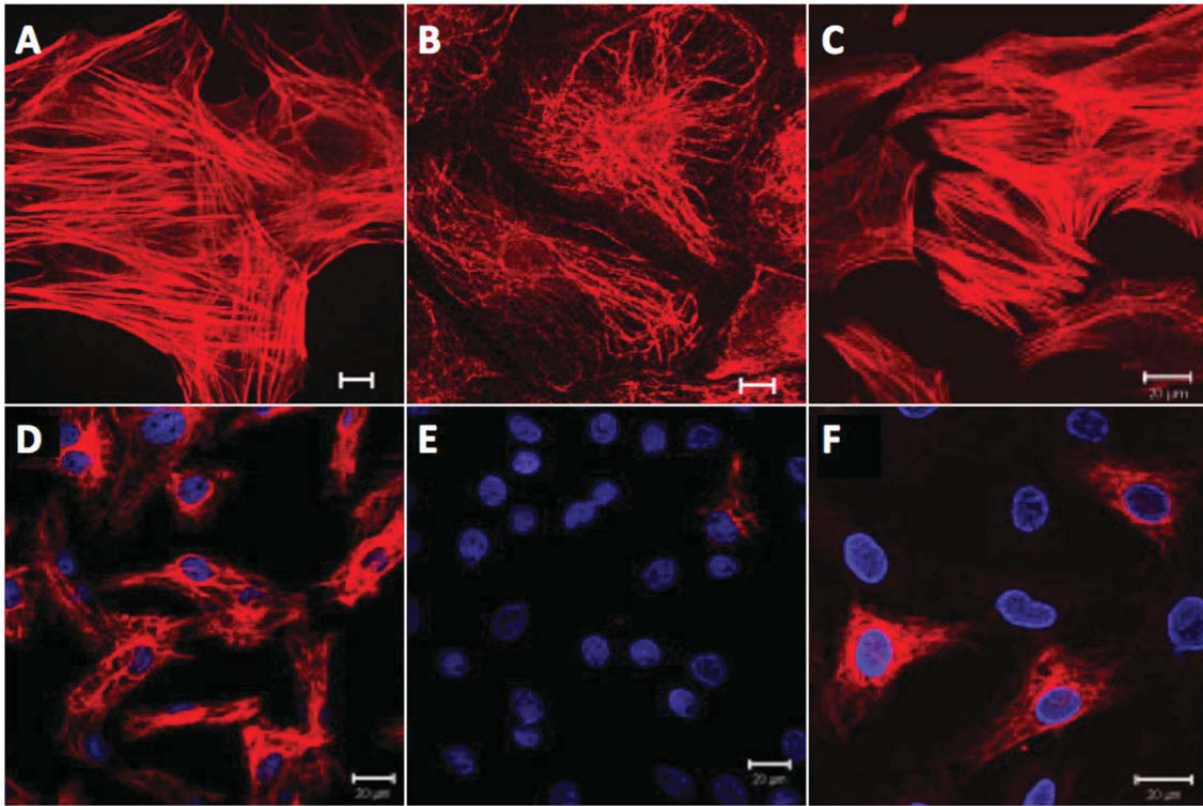
afin de maintenir une capacité contractile suffisante et d'augmenter le taux de survie chez les patients atteints d'un infarctus (104).

La cicatrice cardiaque est un tissu hautement dynamique où plusieurs types cellulaires interagissent afin de permettre la guérison du myocarde endommagé (69, 85). Évidemment, les myofibroblastes cardiaques jouent un rôle central dans la phase proliférative de la cicatrisation cardiaque et ils sont recrutés dans la région ischémisée après aussi peu que 3 jours suivant l'infarctus (3, 28, 64, 85). Cependant, d'autres types cellulaires sont également présents au sein de la cicatrice cardiaque, tels les cellules endothéliales, les CML ainsi que des cellules souches neurales progénitrices (6, 8, 58-63, 65). Ainsi, la fibrose réparative est associée à l'initiation de processus d'angiogenèse et de neurogenèse dans la zone ischémisée, qui sont des événements biologiques essentiels à une bonne guérison des plaies (3, 6, 8, 58-75).

#### 1.1.3.3.1.3.1 Les myofibroblastes cardiaques dans la phase proliférative

La transdifférenciation des fibroblastes cardiaques en myofibroblastes cardiaques est une composante importante de la phase proliférative essentielle à la cicatrisation cardiaque (3, 105). Lors de cette transdifférenciation, les fibroblastes cardiaques subissent des changements phénotypiques et fonctionnels majeurs et possèdent désormais également des caractéristiques propres aux CML (106, 107). Ainsi, les myofibroblastes de la cicatrice cardiaque se distinguent principalement des fibroblastes cardiaques puisqu'ils expriment fortement l' $\alpha$ -actine du muscle lisse ( $\alpha$ -SMA) (Voir Figure 15) (3, 4, 6, 21, 28, 60, 64, 69, 82, 108, 109). D'ailleurs, la présence de l' $\alpha$ -SMA au niveau des myofibroblastes de la cicatrice permet à ces cellules de faire des connexions cellule-cellule et cellule-matrice, ce qui confère une activité contractile aux tissus fibreux cicatriciels (69, 110). Cependant, il est important de préciser que la mise en culture *in vitro* de différents types de fibroblastes cardiaques, tels que les myofibroblastes de la cicatrice cardiaque, les fibroblastes cardiaques de rats néonataux et les fibroblastes ventriculaires de rats adultes, est associée à une expression concomitante de l' $\alpha$ -SMA par ces trois populations lors de leur expansion cellulaire (25, 64, 111). Il est donc

**Figure 15 : Les marqueurs des myofibroblastes isolés de la cicatrice cardiaque**



Les myofibroblastes isolés de la cicatrice cardiaque expriment **A** l' $\alpha$ -Actine du Muscle Lisse (60), **B** la Vimentine (60) et **C** l'actine filamenteuse (64). De plus, **D** les fibroblastes cardiaques de rats nouveau-nés expriment fortement la Nestine en immunofluorescence rouge, **E** puis cette expression est perdue avec le développement chez les fibroblastes ventriculaires de rats adultes. **F** Enfin, une sous-population des myofibroblastes de la cicatrice cardiaque de rats ayant subi un infarctus du myocarde expriment à nouveau la Nestine. Les noyaux sont en immunofluorescence bleue via une coloration au To-PRO3 (25). (60), (64) et (25) avec la permission de John Wiley and Sons.

impossible de distinguer *in vitro* les fibroblastes ventriculaires des myofibroblastes de la cicatrice via l'expression de l' $\alpha$ -SMA, puisque les niveaux d'expression de cette protéine sont comparables chez les différentes populations de fibroblastes cardiaques mises en culture (64). Les myofibroblastes isolés de la cicatrice peuvent aussi être identifiés via l'expression d'autres protéines contractiles caractéristiques des CML, telle qu'un phénotype filamenteux de l'actine, en plus d'exprimer des protéines caractéristiques des fibroblastes cardiaques, telle que la Vimentine (Voir Figure 15 B & C) (3, 4, 21, 60, 64). D'ailleurs, des précisions concernant les myofibroblastes sont apportés à la Section 1.2.2.2.1. Un des éléments qui distingue spécifiquement les myofibroblastes de la cicatrice des fibroblastes adultes de cœur normal est

l'expression *de novo* de la protéine filamenteuse intermédiaire Nestine (Voir Section 1.4.3) (6, 25). En effet, un étude réalisée précédemment dans le laboratoire a permis de révéler que les fibroblastes cardiaques de rats néonataux expriment fortement la Nestine, que cette expression est perdue avec le développement chez les fibroblastes ventriculaires de rats adultes, alors qu'une sous-population des myofibroblastes isolés de la cicatrice de rats ayant subi un infarctus du myocarde expriment à nouveau cette protéine, ce qui peut fournir un avantage prolifératif à ces cellules (Voir Figure 15 D, E & F et Section 1.4.4.3) (6, 25).

Il est également reconnu que les myofibroblastes de la région infarctée prolifèrent davantage que les fibroblastes présents dans la région à distance de la cicatrice (6, 28, 64, 85). Cette augmentation de la quantité de myofibroblastes dénombrés dans la région cicatricielle comparativement au nombre de fibroblastes présents dans la région non infarctée est attribuable à la fois à une augmentation de leur capacité proliférative et est associée à une résistance accrue à l'apoptose via des mécanismes anti-apoptotiques (28, 112). De plus, à la suite d'un infarctus du myocarde, les myofibroblastes de la cicatrice, ainsi que les fibroblastes de la région non infarctée, acquièrent un phénotype leur permettant de synthétiser davantage de collagène et d'ECM (6, 28, 64, 69). Aussi, les myofibroblastes de la région infarctée acquièrent une activité migratoire et d'adhésion supérieure à celle des fibroblastes normaux, ce qui leur permet de se déplacer vers la région cicatricielle (3, 113). D'ailleurs, la capacité des myofibroblastes cardiaques à migrer vers la région cicatricielle a été démontrée précédemment par des membres de notre laboratoire (64). En effet, des myofibroblastes isolés de cicatrices cardiaques de rats ont été marqués avec le traceur fluorescent CM-Dil (5-[[[4-(chlorométhyl)benzoyl]amino]méthyl]-2-[3-(1,3-dihydro-3,3-diméthyl-1-octadécyl-2H-indol-2-ylidène)-1-propényl]-3,3-diméthyl-1-octadécyl-, chlorure), puis injectés dans le myocarde viable de rat ayant subi un infarctus du myocarde chirurgical 3 jours au préalable (64). Puis, une semaine à la suite de la transplantation, des cellules marquées au traceur fluorescent ont migré et ont été détectées dans la région cicatricielle et entourant la zone ischémiée (64). Enfin, les myofibroblastes de la cicatrice se distinguent des fibroblastes ventriculaires parce qu'ils ont la capacité de former *in vitro* des structures ressemblant à des vaisseaux en acquérant un phénotype analogue à celui des cellules endothéliales lorsque mis en culture dans un environnement permissif constitué de matrigel (64). Toutefois, l'environnement

ischémique cardiaque *in vivo* ne permet pas aux myofibroblastes cicatriciels de se différencier en un phénotype endothélial, puisqu'aucun vaisseau de la région ischémisée n'exprimait le traceur fluorescent CM-Dil et qu'aucun myofibroblaste CM-Dil<sup>(+)</sup> ne co-exprimait de marqueur endothélial (eNOS, *endothelial Nitric Oxide Synthase*) (64).

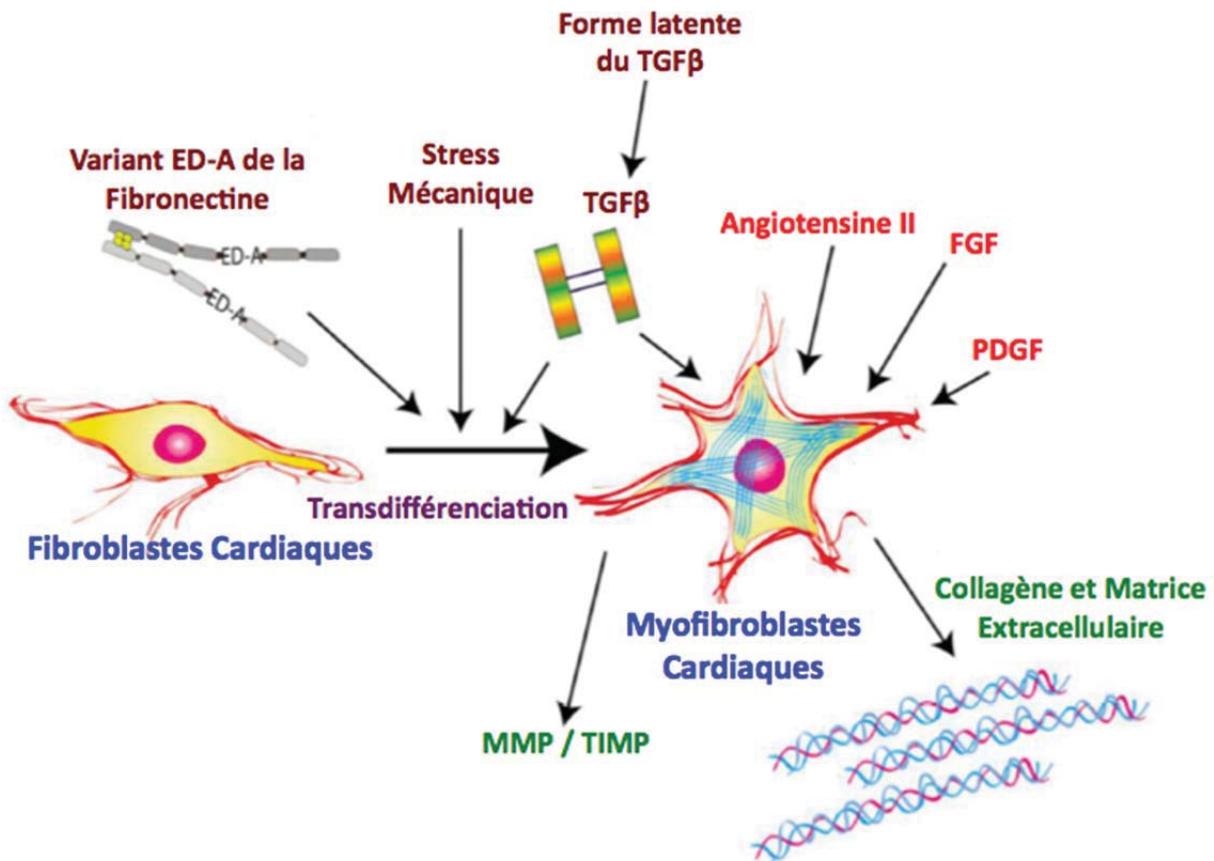
Plusieurs éléments contribuent à promouvoir la transdifférenciation des fibroblastes ventriculaires en myofibroblastes cicatriciels (Voir Figure 16) (3). Pour ce faire, les fibroblastes cardiaques acquièrent d'abord un phénotype intermédiaire de proto-myofibroblastes (3, 109, 114). Une fois ce phénotype atteint, le TGF- $\beta$ , les contraintes mécanique induites à la suite de la dégradation de la matrice et l'expression accrue du variant d'épissage ED-A (*ExtraDomain A*) de la fibronectine permettent ensemble la transdifférenciation des proto-myofibroblastes en myofibroblastes (Voir Figure 16) (3, 69, 99, 109, 114, 115). Le TGF- $\beta$  a quant à lui un rôle central dans cette différenciation, puisqu'il permet la transcription de l' $\alpha$ -SMA en activant la voie de signalisation Smad3 (*Mothers Against Decapentaplegic homolog 3*) (3, 116). D'ailleurs, la voie de signalisation Smad3 est fortement impliquée dans les pathologies fibrotiques, mais elle n'est pas la seule voie par laquelle le TGF- $\beta$  agit (3, 117-120). Le TGF- $\beta$  est produit par de nombreux types cellulaires, mais sous une forme qui n'est pas reconnue par ses récepteurs (3). En effet, le TGF- $\beta$  est d'abord synthétisé sous une forme latente de pro-peptide, puis est activé lorsque les liens covalents qui le relie au LAP (*Latency Associated Peptide*) sont clivés (Voir Figure 16) (3, 121). Le TGF- $\beta$  est donc activé via des protéases, telles les MMP-2 et les MMP-9 (3, 121). En plus de permettre la transdifférenciation des fibroblastes, le TGF- $\beta$  contribue également à la migration de fibroblastes et des cellules progénitrices de fibroblastes à la région infarctée, et ce, en collaboration avec le FGF et le MCP-1 (3, 85). De plus, le TGF- $\beta$  induit la synthèse et la déposition accrue de collagène de type I et de type III, ainsi que d'ECM par les myofibroblastes, en plus de favoriser la synthèse de MMP et d'inhibiteurs de protéases, tels les TIMPs (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*) (Voir Figure 16) (3, 100, 105, 122-124). Ainsi, le TGF- $\beta$  s'avère être un facteur essentiel au développement de la réponse fibrotique permettant la formation de la cicatrice cardiaque (3, 125, 126). D'autres facteurs pro-fibrotique stimulent également la synthèse de collagène et/ou l'action proliférative des



myofibroblastes présents dans la région infarctée, tel l'Angiotensine II via ses récepteurs AT1 (AT1R), le FGF-2 et le PDGF (3, 69, 85, 127, 128). Également, le NGF (*Nerve Growth Factor*) est reconnu comme étant un facteur fibrogénique contribuant à la transdifférenciation des fibroblastes en myofibroblastes (129). Une fois que la cicatrice est solide et bien formée via la déposition dense de collagène et d'ECM, la phase de maturation succède à la phase proliférative (3, 116, 130). Lors de la progression de la phase de maturation, la quantité de myofibroblastes dans la région infarctée décroît, puisque ces derniers deviennent quiescents et sont finalement éliminés via l'apoptose (3, 85, 105, 131-133).

Il est important de souligner que la transdifférenciation des fibroblastes ventriculaires résidents en myofibroblastes cardiaques demeure la source majeure de myofibroblastes lors de la cicatrisation cardiaque (3, 134, 135). Cependant, d'autres sources de myofibroblastes cardiaques contribuent à la réparation tissulaire à la suite d'une lésion cardiaque (3, 21). Ainsi, la littérature a révélé que lorsque des cellules de la moelle osseuse marquées à la protéine fluorescente verte (GFP, *Green Fluorescent Protein*) sont transplantées chez des souris préalablement irradiées, alors des fibroblastes dérivés de la moelle osseuse GFP<sup>(+)</sup> sont retrouvés dans la région infarctée des souris ayant subi un infarctus du myocarde de manière chirurgicale, confirmant que les cellules de la moelle osseuse sont une source de myofibroblastes cicatriciels (3, 4, 21, 24, 136). Enfin, le processus d'EndMT s'est également révélé être une source de fibroblastes cardiaques activés dans des modèles de fibrose cardiaque (Voir Section 1.5.2) (3, 4, 21, 24, 137). Les myofibroblastes de la région cicatricielle ont donc des origines diverses, mais également des fonctions diverses. Ainsi, en plus d'être le type cellulaire produisant le plus d'ECM pour contribuer à la cicatrisation cardiaque, les myofibroblastes de la cicatrice peuvent également collaborer à la fibrose réparative en générant et sécrétant des molécules angiogéniques et neurotrophiques, tels le NGF et le BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*), qui participent à l'angiogenèse et à la neurogenèse de la région cicatricielle et entourant la cicatrice (3, 28, 41, 60, 64, 66, 72, 105, 129, 138-144).

**Figure 16: La transdifférenciation des fibroblastes ventriculaires en myofibroblastes cicatriciels**



La transdifférenciation des fibroblastes ventriculaires en myofibroblastes cardiaques est stimulée par l'expression du variant ED-A (*ExtraDomain A*) de la fibronectine, par la dégradation de matrice extracellulaire qui provoque du stress mécanique et par l'activation de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ). La présence de nombreux facteurs de croissance (Angiotensine II, TGF- $\beta$ , FGF; *Fibroblast Growth Factor* et PDGF; *Platelet-Derived Growth Factor*) favorise la synthèse de collagène et de protéines de la matrice par les myofibroblastes cicatriciels. Enfin, les myofibroblastes cardiaques sécrètent également des MMP (*Matrix Metalloproteinase*) et des TIMP (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*). (3) avec la permission d'Elsevier.



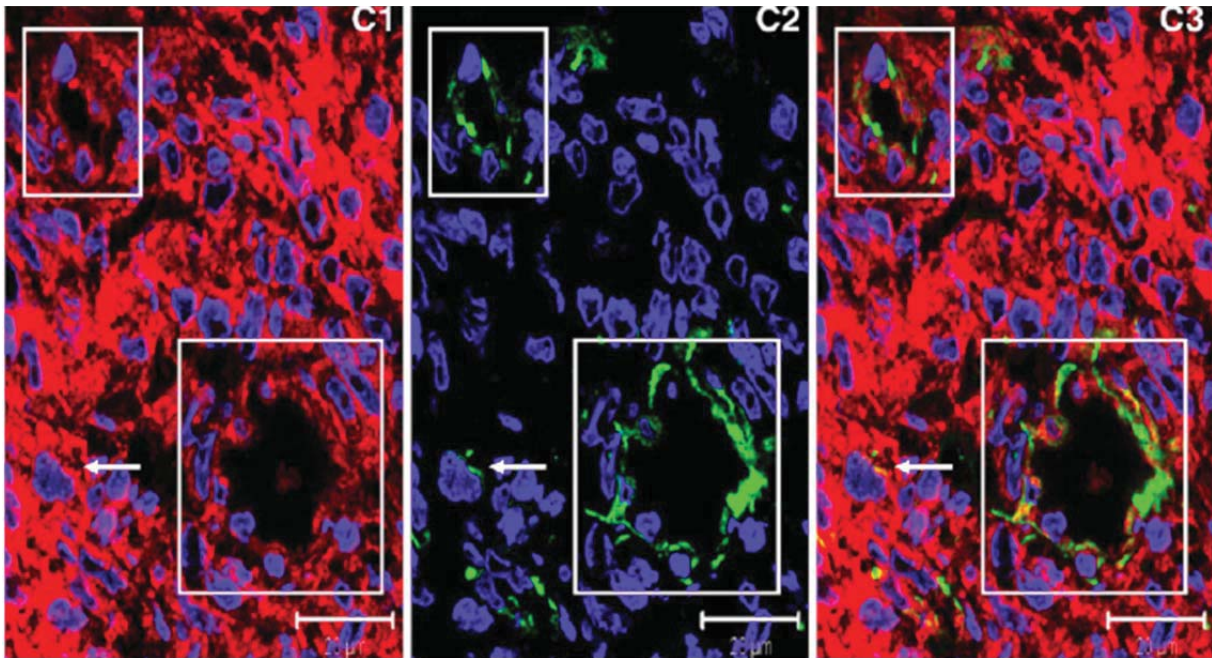
### 1.1.3.3.1.3.2 L'angiogenèse contribue à la fibrose réparative

L'angiogenèse est un événement physiologique fournissant un environnement favorable à la cicatrisation cardiaque et qui permet la formation *de novo* de vaisseaux sanguins pour contribuer à la néovascularisation de la zone infarctée dont l'irrigation a été bloquée à la suite de l'occlusion de l'artère coronaire (3, 6, 8, 61, 62, 64, 67-71). De plus, l'angiogenèse est un événement physiologique indispensable à la fibrose réparative, car elle permet d'éviter l'amincissement et l'expansion de la cicatrice cardiaque, pour ainsi prévenir la dilatation myocardique et un remodelage cardiaque néfaste (6, 67, 69-71, 101, 102, 145). Initialement, l'angiogenèse a pour objectif d'éviter la nécrose des cardiomyocytes présents dans la région ischémisée à risque (6, 67, 70). Toutefois, lorsque la phase inflammatoire est complétée, la région infarctée est métaboliquement très active, alors l'angiogenèse contribue à l'irrigation qui fournit l'alimentation en oxygène et en nutriments essentiels aux cellules de la zone ischémisée qui participent à la cicatrisation cardiaque (3, 68, 105, 131). Le processus d'angiogenèse est induit rapidement dans la région cicatricielle via des facteurs angiogéniques, tels que le VEGF, l'IL-8, les angiopoïétines et le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), ainsi que via la suppression de chimiokines angiostatiques, tel que l'IP-10 (*Inducible Protein-10*) (68, 146-148). Ainsi, l'angiogenèse est un processus dont l'initiation dépend d'un déséquilibre dans la région ischémisée entre les facteurs angiogéniques et angiostatiques, ce qui permet la formation d'interactions complexes entre les cellules endothéliales, les péricytes et l'ECM (68). Ce faisant, la membrane basale entourant les capillaires cardiaques se dégrade et les cellules endothéliales répondent au stimulus angiogénique en migrant et en proliférant, pour ainsi former le nouveau réseau de capillaires (70). Cependant, les cellules endothéliales endogènes ne sont pas suffisantes pour réaliser la totalité du processus angiogénique, dû à leur faible taux prolifératif (149). Ainsi, des cellules souches neurales, des cellules c-kit<sup>(+)</sup> et des cellules endothéliales progénitrices doivent également être recrutées à la région infarctée pour permettre une réponse angiogénique optimale (6, 19, 61, 149). D'ailleurs, le travail de notre laboratoire et d'autres a démontré que la protéine filamenteuse intermédiaire Nestine (Voir Section 1.4) est exprimée par les cellules endothéliales, les CML et les cellules souches neurales qui participent à l'angiogenèse (6, 61, 150, 151).

#### 1.1.3.3.1.3.2.1 L'angiogenèse et la Nestine

Tout d'abord, la Nestine a été détectée au niveau de cellules endothéliales de petits vaisseaux situés dans la zone infarctée de rats ayant subi un infarctus du myocarde (60). De plus, une étude réalisée par Tomita et ses collaborateurs a illustré que l'isolation de cellules Nestine<sup>(+)</sup> de cœurs de souris néo-natales se différencie en CMLV  $\alpha$ SMA<sup>(+)</sup>/calponine<sup>(+)</sup> lorsque mises en culture (6, 152). Également, la capacité des cellules Nestine<sup>(+)</sup> à se différencier en CMLV *in vivo* a été démontrée par ce groupe (6, 152). Pour ce faire, des cardiosphères Nestine<sup>(+)</sup> de souris néo-natales ont été isolées, marquées à la GFP, puis transplantées chez des souris embryonnaires (6, 152). Ce faisant, des vaisseaux GFP<sup>(+)</sup>/ $\alpha$ SMA<sup>(+)</sup> ont été formés lors de la croissance des souris (6, 152). Cependant, leur étude n'a pas permis de révéler la contribution des cardiosphères Nestine<sup>(+)</sup> à générer *de novo* des cellules endothéliales vasculaires (6). Par la suite, des études réalisées par des membres de notre laboratoire ont permis de mettre en évidence l'implication des cellules Nestine<sup>(+)</sup> présentes dans la cicatrice cardiaque à titre de substrat angiogénique afin de participer à la fibrose réparative (6). Pour ce faire, des cellules Nestine<sup>(+)</sup> ont été isolées de la cicatrice de rats ayant subi un infarctus du myocarde de manière chirurgicale 1 semaine auparavant, puis ont été mises en culture afin de former des cardiosphères Nestine<sup>(+)</sup> (6, 61). Ensuite, ces cardiosphères ont été marquées avec le traceur fluorescent CM-Dil, puis transplantées dans la région non infarctée du myocarde de rats ayant subi un infarctus du myocarde de manière chirurgicale trois jours auparavant (6, 61). Cette expérimentation a permis de constater qu'à 7 jours suivant l'injection, les cellules CM-Dil<sup>(+)</sup> avaient migré exclusivement du myocarde intact jusqu'à la région cicatricielle, et donc que ces cellules sont recrutées lors de la fibrose réparative (6, 61). D'ailleurs, la littérature révèle que les cellules cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> dérivées de la crête neurale migrent à la région infarctée sous l'action chimioattractante du MCP-1 (6, 153). De plus, l'étude réalisée par des membres de notre laboratoire a permis d'observer qu'une sous-population de neurosphères CM-Dil<sup>(+)</sup> recrutées dans la région infarctée co-exprime la Nestine (Voir Figure 17) et se différencie en un phénotype de CML Desmine<sup>(+)</sup> (Voir Figure 18) ou de cellule endothéliale eNOS<sup>(+)</sup> (Voir Figure 19) pour contribuer à la formation *de novo* vaisseaux sanguins associés à la cicatrisation cardiaque (6, 61).

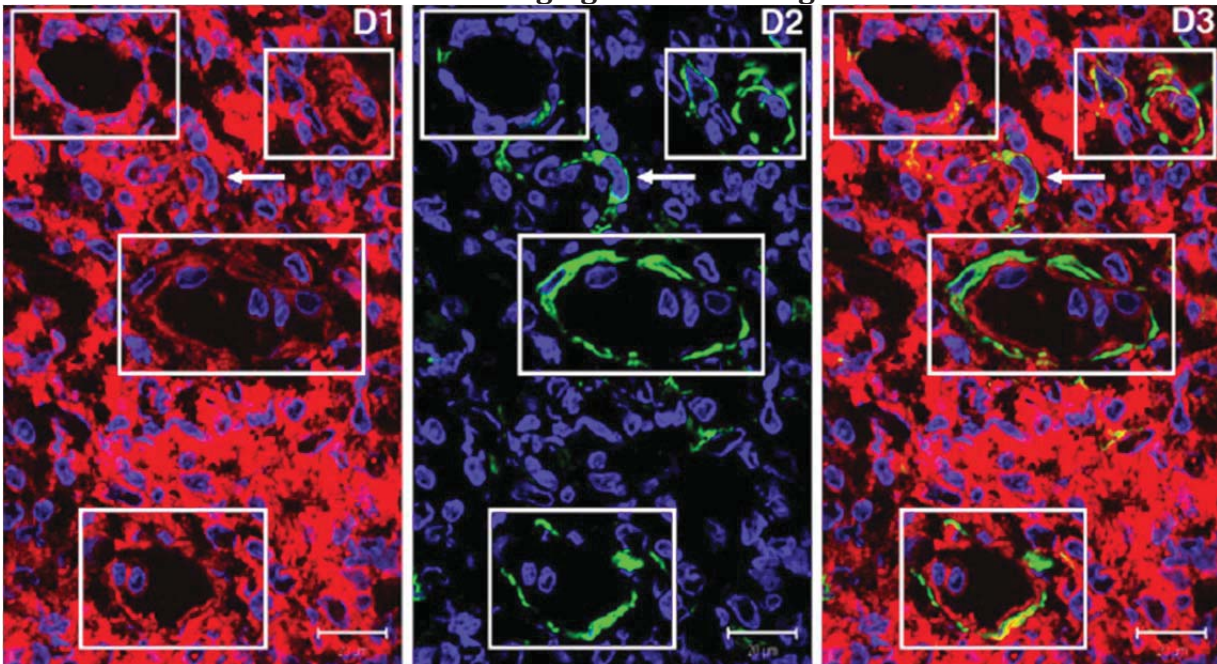
**Figure 17 : Les cardiosphères CM-Dil<sup>(+)</sup> transplantées contribuent à la formation *de novo* vaisseaux sanguins Nestine<sup>(+)</sup> dans la région ischémisée**



L'infarctus du myocarde induit le recrutement dans la région cicatricielle de cardiosphères CM-Dil<sup>(+)</sup> en fluorescence rouge qui participent à la formation *de novo* vaisseaux sanguins Nestine<sup>(+)</sup> en immunofluorescence verte (cases blanches). (61) avec la permission d'Elsevier.

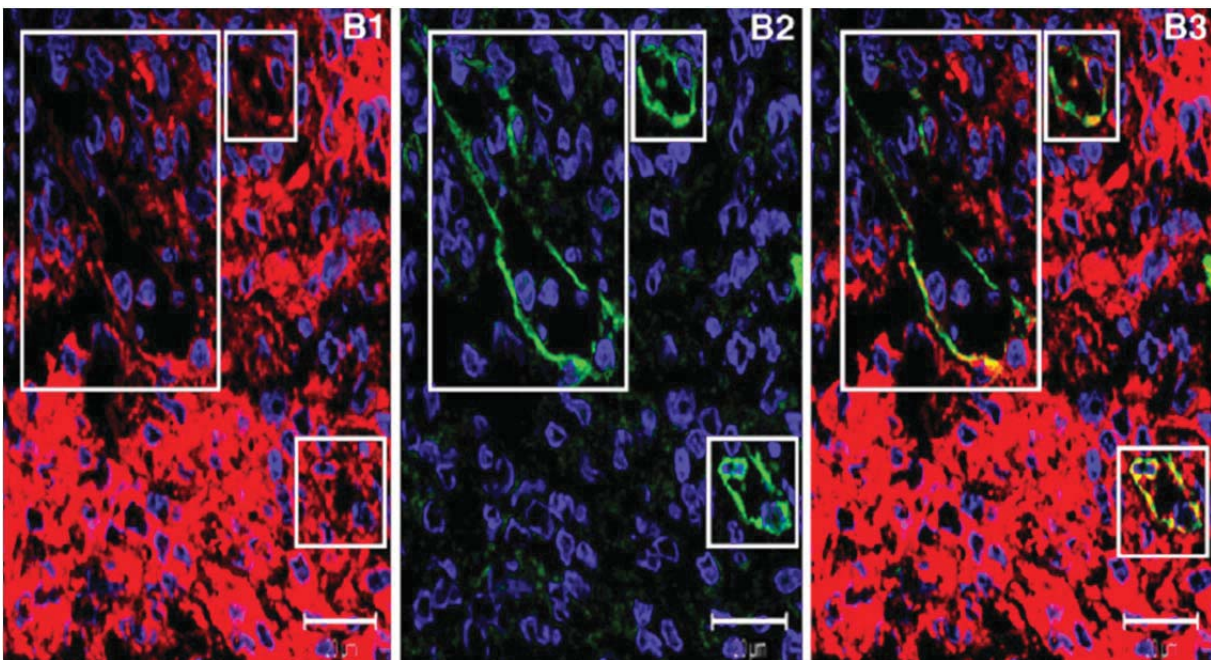


**Figure 18 : Les cardiosphères CM-Dil<sup>(+)</sup> transplantées acquièrent un phénotype de CML Desmine<sup>(+)</sup> et contribuent à l'angiogenèse de la région ischémisée**



Les cardiosphères CM-Dil<sup>(+)</sup> en fluorescence rouge acquièrent un phénotype de cellule musculaire lisse (CML) Desmine<sup>(+)</sup> en fluorescence verte. (61) avec la permission d'Elsevier.

**Figure 19 : Les cardiosphères CM-Dil<sup>(+)</sup> transplantées acquièrent un phénotype de cellule endothéliale eNOS<sup>(+)</sup> et contribuent à l'angiogenèse de la région ischémisée**



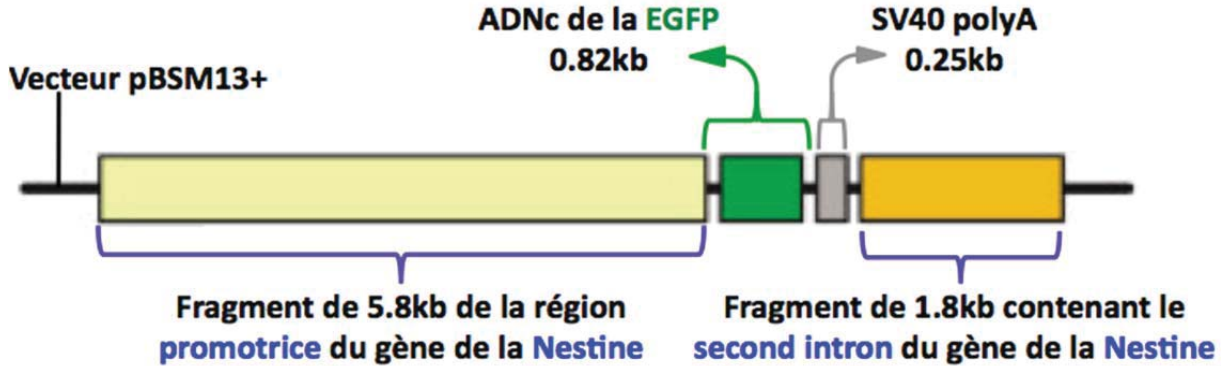
Les cardiosphères CM-Dil<sup>(+)</sup> en fluorescence rouge acquièrent un phénotype de cellule endothéliale eNOS<sup>(+)</sup> (endothelial Nitric Oxide Synthase) en immunofluorescence verte. (61) avec la permission d'Elsevier.

Par la suite, une étude réalisée dans notre laboratoire a mis l'accent sur le type de cellules Nestine<sup>(+)</sup> qui est recruté *in vivo* lors de la fibrose réparative à titre de substrat angiogénique (62). Ainsi, plusieurs éléments suggèrent l'implication potentielle des cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> pour jouer ce rôle de substrat angiogénique (62) (Pour une description complète des cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> Voir Section 1.4.3.1). En effet, il est d'abord reconnu que des populations de cellules Nestine<sup>(+)</sup> dérivées de la crête neurale et qui présentent un phénotype de cellule souche neurale progénitrices résident au sein des cœurs normaux de rats (6, 58, 61-63, 152, 154-157). De plus, une sous population de cellules Nestine<sup>(+)</sup> résidente cardiaque ou transplantée est capable de se différencier respectivement en un phénotype neuronal (Voir Section 1.1.3.3.1.3.3.1) ou en un phénotype vasculaire à la suite d'un infarctus du myocarde (6, 58, 61, 62, 152). Enfin, la littérature révèle que le second intron du gène de la Nestine est responsable de l'expression de la protéine Nestine par les cellules souches neurales progénitrices et qu'en plus il s'agit d'une région hautement conservée dans le gène humain de la Nestine (6, 62, 157-159). Ainsi, un modèle de souris transgénique développé par Grigori Enikolopov et réalisé par Jean-François Jasmin, a été employé (62). Chez ce modèle de souris transgénique, qui a permis d'identifier des populations de cellules Nestine<sup>(+)</sup>/GFP<sup>(+)</sup> au niveau de la peau et du muscle squelettique, le second intron du gène de la Nestine est lié au rapporteur de la GFP (62, 157, 160-163). Pour ce faire, un plasmide Nestine-GFP est généré via le clonage de quatre éléments dans un vecteur pBSM13+ : les fragments du gène de la Nestine, soit le fragment de 5.8kb de la région promotrice du gène de la Nestine et le fragment de 1.8kb contenant le second intron du gène de la Nestine, sont combinés à l'ADN complémentaire de la version améliorée de la GFP (EGFP, *Enhanced GFP*) et à des séquences de polyadénylation provenant du virus simian 40 (SV40 polyA) (Voir Figure 20) (62, 157). De plus, la construction du plasmide Nestine-GFP reflète l'arrangement séquentiel régulateur présent dans le gène de la Nestine, car l'ADN complémentaire de la GFP améliorée est introduit de manière intercalée entre la région promotrice et la séquence contenant le second intron du gène de la Nestine (157). Enfin, le plasmide est isolé, purifié, puis injecté au niveau du noyau d'ovocytes fertilisés de souris hybridées (C57BL/6 X Balb/cBy) (157). D'ailleurs, il s'agit du même modèle de souris transgénique employé dans le cadre de mon deuxième article (Voir Chapitre 3) (160).

Dans un premier temps, l'utilisation de ce modèle de souris transgénique a permis de constater que les cellules GFP<sup>(+)</sup>, en immunofluorescence verte, sont présentes au niveau du myocarde de souris transgéniques adultes et que celles-ci co-expriment la Nestine, en immunofluorescence rouge (Voir Figure 21 A à C) (62). De plus, nous avons observé que l'expression de la protéine GFP, en immunofluorescence verte, est absente des cellules endothéliales myocardiques, alors que certaines cellules endothéliales, mais pas toutes, expriment la Nestine en immunofluorescence rouge (62). Ces résultats ont permis de confirmer l'efficacité de notre modèle, puisque la littérature stipule que c'est le premier intron du gène de la Nestine qui est responsable de l'expression de la Nestine par les cellules endothéliales (Voir Figure 21 D à F) (62, 150). Enfin, nous avons constaté la présence de cellules GFP<sup>(+)</sup>, en immunofluorescence verte, de manière intercalée entre les cardiomyocytes Troponine-T<sup>(+)</sup>, en immunofluorescence rouge (Voir Figure 21 G), ainsi que des cellules Nestine<sup>(+)</sup>/GFP<sup>(+)</sup> à proximité de vaisseaux sanguins myocardiques (Voir Figure 21 D à F) (62). Par la suite, nous avons induit un infarctus du myocarde à ce modèle de souris transgénique adulte via la ligature de l'artère coronaire gauche descendante antérieure (LAD) (62). Nous avons alors pu confirmer que les cellules Nestine<sup>(+)</sup>, dont l'expression dépend du second intron du gène de la Nestine et pouvant être des cellules souches neurales progénitrices, sont un substrat angiogénique. En effet, l'infarctus du myocarde a provoqué la migration de cellules Nestine<sup>(+)</sup>/GFP<sup>(+)</sup> dans la région cicatricielle et entourant la cicatrice et ces cellules ont contribué à la formation *de novo* vaisseaux sanguins GFP<sup>(+)</sup> en immunofluorescence verte pour participer à la néovascularisation réparative (Voir Figure 22 A à F) (62). Ainsi, des cellules endothéliales CD31<sup>(+)</sup>, en immunofluorescence rouge, co-expriment la protéine GFP au niveau des vaisseaux (Voir Figure 22 A à C) et des cellules endothéliales GFP<sup>(+)</sup> qui co-expriment la Nestine (en immunofluorescence rouge) (Voir Figure 22 D à F) sont aussi identifiées dans les vaisseaux de la région cicatricielle de souris transgéniques ayant subi un infarctus du myocarde (62). En somme, cette étude a démontré que des cellules résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> présentant des propriétés de cellules souches neurales progénitrices, ont une très grande plasticité et ont un rôle de substrat angiogénique pour participer à la fibrose réparative à la suite d'un infarctus du myocarde (6, 62).

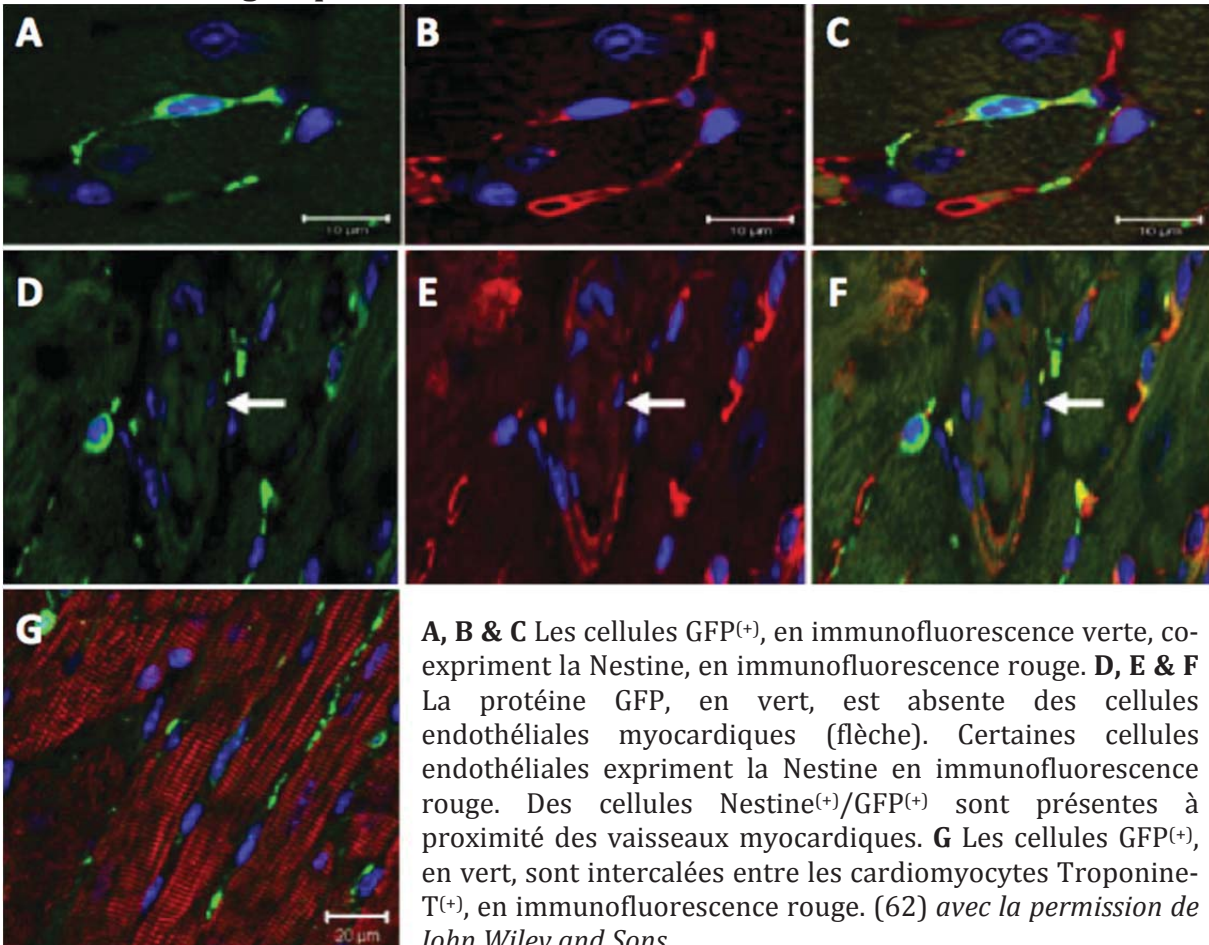


**Figure 20 : Schématisation de la construction du plasmide Nestine-GFP**

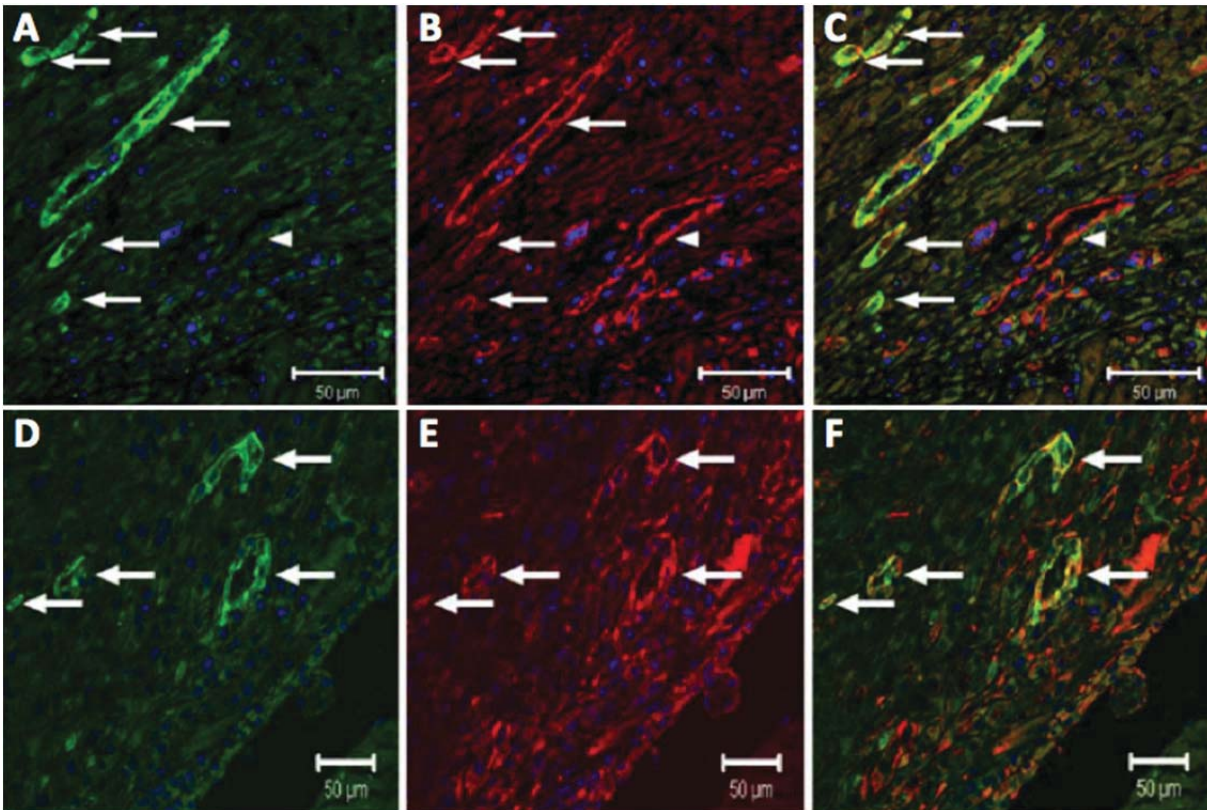


Le plasmide Nestine-GFP est généré via le clonage de quatre éléments dans le vecteur pBSM13+ (*E. coli phagemid vector BlueScribe M13+*), soit la région promotrice du gène de la Nestine, l'ADNc (Acide Désoxyribonucléique complémentaire) de la EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*), les séquences de polyadénylation provenant du virus simian 40 (SV40 polyA) et le 2e intron du gène de la Nestine. (157) avec la permission de John Wiley and Sons.

**Figure 21 : Les cellules Nestine<sup>(+)</sup>/GFP<sup>(+)</sup> sont présentes au niveau du myocarde de souris transgéniques Nestine-GFP adultes**



**Figure 22 : Suite à l'infarctus du myocarde, la vascularisation réparative est associée avec la formation *de novo* vaisseaux GFP<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup>/CD31<sup>(+)</sup>**



**A, B & C** Des cellules endothéliales GFP<sup>(+)</sup>(vert)/CD31<sup>(+)</sup>(rouge) participent à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans la région cicatricielle (flèches), mais certaines cellules endothéliales détectées dans la région infarctée sont aussi GFP<sup>(-)</sup> (triangle blanc). **D, E & F** Plusieurs des nouveaux vaisseaux formés dans la zone ischémisée sont GFP<sup>(+)</sup>(vert)/Nestine<sup>(+)</sup>(rouge) et présentent des tailles variables. (62) avec la permission de John Wiley and Sons

Cette étude s'est ensuite penchée sur la contribution des cellules Nestine(+) quant à l'amélioration de la cicatrisation cardiaque, c'est-à-dire, si l'on augmente cette population cellulaire dans la région ischémisée à la suite d'un infarctus du myocarde, existe-t-il des bénéfices de cet apport sur la fonction cardiaque et/ou sur le processus de guérison cardiaque ? (62) Afin de répondre à cette question, une population de cellules analogues aux cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine(+), mais plus facilement disponible, soit les cellules embryonnaires dérivées de la peau Nestine(+), a été employée (62, 154, 161, 164). Pour ce faire, des cellules dérivées de la peau ont été isolées du derme dorsal d'embryons de 18 jours de rats, puis ont été mises en culture dans un milieu approprié (62,



154). Ces cellules embryonnaires dérivées de la peau avaient pour caractéristique de croître sous forme de sphères et d'exprimer la protéine filamenteuse intermédiaire Nestine, la protéine Sox2 (soit un facteur de transcription responsable de l'expression de la Nestine et de la prolifération des cellules souches neurales progénitrices) et l'ARN (acides ribonucléiques) messenger des gènes de transcriptions liés à la crête neurale (Sox9, Snail et slug), en plus de produire l'ARN messenger (ARNm) de divers facteurs de croissance associés à la migration, la fibrose et à l'angiogenèse (NGF, VEGF, TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 3) (62, 154, 165, 166). Par la suite, ces sphères dérivées de la peau Nestine(+) de premier passage ont été marquées avec le fluorescent CM-Dil et transplantées dans la région entourant la cicatrice de rats ayant subi un infarctus du myocarde chirurgical 3 jours auparavant. Trois semaines suivant la transplantation, les sphères dérivées de la peau Nestine(+) avaient migré à la zone cicatricielle et la transplantation cellulaire a été associée avec une diminution de la taille de la cicatrice, une amélioration de la fonction ventriculaire et une augmentation de la densité de vaisseaux sanguins de petit calibre présents dans la région ischémisée, et ce, comparativement à des rats ayant subi un infarctus du myocarde chirurgical sans injection de neurosphères Nestine(+) (62). Néanmoins, ces sphères dérivées de la peau Nestine(+) n'avaient pas la même plasticité que les cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine(+) (62). Contrairement à une étude antérieure où des cellules dérivées de la peau Nestine(+) ont participé à la guérison des plaies à titre de substrat angiogénique, les sphères dérivées de la peau Nestine(+) de notre étude ne sont pas parvenues à acquérir un phénotype vasculaire dans l'environnement ischémique (62, 161). La contribution bénéfique des sphères dérivées de la peau a plutôt été attribuée à favoriser l'angiogenèse, plutôt qu'à se différencier directement en cellules vasculaires à l'instar des cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine(+) (62). En effet, d'autres études ont démontré que le recrutement au site d'un dommage tissulaire de cellules endogènes et/ou de cellules souches transplantées contribue à la cicatrization des plaies via la sécrétion de facteurs de croissance peptidiques par ces cellules (62, 167-169). D'ailleurs, l'augmentation de la concentration de VEGF dans la région ischémisée est associée à une réponse angiogénique accrue, et conséquemment, à une réduction de la taille de la cicatrice et/ou à une meilleure cicatrization cardiaque (62, 170, 171). Les sphères dérivées de la peau Nestine(+) transplantées migrent à la région cicatricielle et stimulent l'angiogenèse en générant et sécrétant des facteurs de croissance associés à

l'angiogenèse, tel le VEGF, ce qui permet de réduire la taille de la cicatrice cardiaque (62, 102, 167, 168). Toutefois, la contribution de ces sphères Nestine(+) n'a pas été limitée à leur effet sur la formation de novo vaisseaux sanguins, car quelques-unes se sont différenciées en un phénotype neuronal Neurofilament-M(+) pour participer à la neurogenèse associée à la fibrose réparative (62).

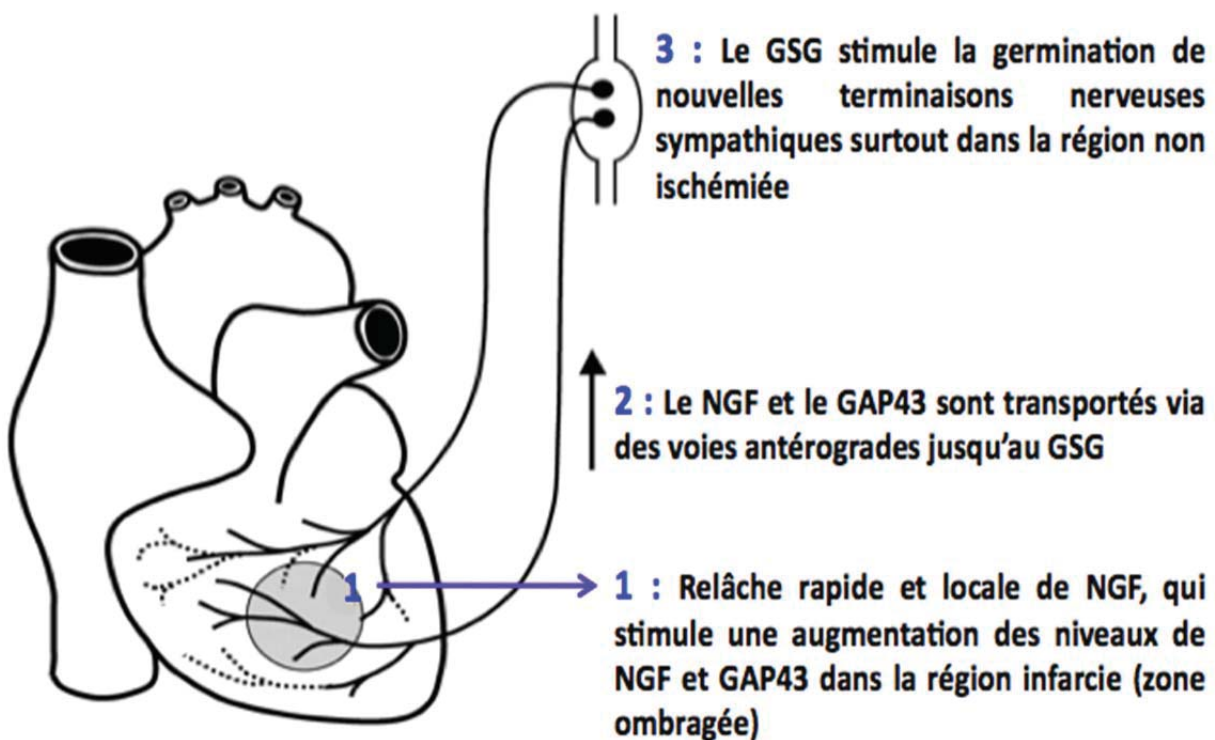
#### 1.1.3.3.1.3.3 La neurogenèse contribue à la fibrose réparative

Trois à quatre jours suite à l'infarctus du myocarde, la neurogenèse est un événement physiologique induit dans le myocarde viable, au niveau de la région entourant la cicatrice et de la région infarctée et qui contribue à la fibrose réparative (6, 8, 58-61, 63, 65, 66, 72-75). En effet, le remodelage neural pourrait participer directement à la cicatrization cardiaque, puisque les fibres sympathiques nouvellement formées peuvent sécréter de la noradrénaline et du NGF, soit des molécules reconnues pour stimuler la croissance des myofibroblastes (58, 59, 75, 111, 129, 172). Ainsi, les myofibroblastes cicatriciels prolifèrent et sécrètent de grandes quantités de collagène pour former une meilleure cicatrice.

L'objectif de l'hyperinnervation sympathique consiste à accroître la germination et l'activité des fibres sympathiques, afin d'innover le myocarde non infarcté principalement, mais également la région infarctée (6, 73-75, 173). Ce faisant, ces fibres apportent un soutien à la contractilité cardiaque réduite à la suite de l'ischémie cardiaque, tout en favorisant l'hypertrophie des cardiomyocytes (6, 58, 59, 174, 175). Également, il a été démontré chez des patients présentant une réinnervation cardiaque spontanée à la suite d'une transplantation cardiaque, caractérisée par une activité scintigraphique accrue d'un analogue injecté de la norépinephrine (HED, C<sub>11</sub>-hydroxyéphédrine) mesuré par TEP (Tomographie d'Émission de Positrons) scan, que les mesures hémodynamiques à l'effort sont améliorées de manière significative comparativement aux patients ne présentant pas de réinnervation spontanée (173, 176). Cependant, l'hétérogénéité sympathique associée à l'hyperactivité neural induit aussi des effets délétères, tels que l'expansion de l'infarctus, de la fibrose réactive dans la région non infarctée (Voir Section 1.1.3.3.2.1), ainsi que des arythmies cardiaques pouvant parfois mener à des morts cardiaques subites (6, 58, 72, 173, 177-183).

L'hyperinnervation sympathique est réalisée via différents mécanismes. Tout d'abord, suite à l'ischémie cardiaque, il y a une relâche rapide et locale par les cellules endommagées de NGF dans la région cicatricielle et entourant la cicatrice (Voir Figure 23 [1]) (58, 75, 173). Le NGF est une molécule neurotrophique essentielle au processus d'hyperinnervation sympathique dû à son action permettant la croissance et la survie des neurones sympathiques (72, 184, 185). Cette relâche de NGF stimule alors une augmentation de l'expression de protéines signalétiques, soit le NGF et le GAP43 (*Growth Associated Protein 43*), qui sont ensuite saisis par les fibres sympathiques et transportés via des voies antérogrades jusqu'aux

**Figure 23 : La signalisation associée à l'hyperinnervation sympathique à la suite de l'infarctus du myocarde**



—— Fibres Nerveuses présentes avant l'infarctus du myocarde

..... Fibres Nerveuses germinées *de novo* après l'infarctus du myocarde

Suite à l'infarctus du myocarde, [1] il y a relâche rapide et locale de NGF (*Nerve Growth Factor*) dans la région infarctée, ce qui augmente les niveaux de NGF et de GAP43 (*Growth Associated Protein 43*) dans la zone ischémisée. [2] Puis, ces protéines signalétiques sont transportées via des voies antérogrades au GSG (Ganglion Stellaire Gauche). [3] Enfin, ce ganglion stimule la germination *de novo* de terminaisons nerveuses sympathiques dans la zone bordant la région ischémisée. (173) avec la permission de Wolters Kluwer Health Inc.

corps des cellules nerveuses dans le Ganglion Stellaire Gauche (GSG) (Voir Figure 23 [2]) (58, 72, 75, 173, 183, 186). Les corps des cellules nerveuses du ganglion stellaire gauche stimulent alors la germination de nouvelles terminaisons nerveuses sympathiques cardiaques, via un transport antérograde de GAP43 et de NGF, principalement dans la zone intacte, mais aussi dans la zone ischémisée (Voir Figure 23 [3]) (75, 173, 177, 178, 183). D'ailleurs, l'infusion de NGF directement dans le ganglion stellaire gauche chez des chiens ayant subi un infarctus du myocarde chirurgical a eu pour impact l'hyperinnervation sympathique cardiaque, alors qu'un modèle de souris transgénique qui surexprime le NGF au niveau du cœur présente aussi une hyperinnervation sympathique cardiaque (72, 177, 187). Il est d'ailleurs important de préciser que seule l'innervation sympathique, et non pas l'innervation sensorielle ou encore parasympathique, a été observée *de novo* dans la zone ischémisée à la suite d'un infarctus du myocarde (58, 72).

De plus, à la suite de l'infarctus du myocarde, des cellules de Schwann et des axones sont recrutés en périphérie de la région nécrosée, prolifèrent et croissent (73, 75). Ainsi, à partir de fibres préexistantes de la région intacte, il y a formation de complexes d'axones et de cellules de Schwann possédant des extensions ramifiées étendues qui contribuent principalement à l'hyperinnervation de la région ischémisée, mais aussi du myocarde non endommagé (60, 73, 75). Lors de ce processus de régénération neurale, des facteurs neurogéniques et neurotrophiques, tels le NGF et le BDNF, sont synthétisés par les myofibroblastes de la cicatrice et les cellules neurales, et contribuent à la cicatrisation cardiaque en favorisant la différenciation et la survie des cellules neuronales, mais également l'angiogenèse, ainsi que la transdifférenciation des fibroblastes en myofibroblastes (60, 129, 142-144, 188-190). En plus d'être synthétisé et sécrété par les cellules neuronales et les myofibroblastes de la cicatrice, le NGF est aussi généré par des cellules inflammatoires, soit les macrophages, mais également par des cardiomyocytes afin de contribuer à l'hyperinnervation sympathiques de la région cicatricielle (58, 60, 72, 75, 129, 144, 173). D'ailleurs, une réponse inflammatoire accrue est associée avec une augmentation de l'expression de NGF, et ce faisant, une hyperinnervation, si bien que l'utilisation du Dexaméthasone, qui réduit la réponse inflammatoire, contribue à l'atténuation de l'innervation de la région infarctée (66, 191). Enfin, le NGF est le facteur neurotrophique principal qui

permet la croissance, la survie et la différenciation des nerfs sympathiques, en plus d'être un facteur de pro-survie et anti-apoptotique pour les cardiomyocytes (144, 192-194). En somme, le NGF est fortement impliqué dans l'hyperinnervation sympathique de la région cicatricielle et entourant la cicatrice à la suite d'un infarctus du myocarde, et ce, tant via ses actions sur le ganglion stellaire gauche et que sur la prolifération et la croissance de cellules de Schwann et des axones situés en périphérie de la région nécrosée. Toutefois, notre laboratoire a découvert qu'il ne s'agit pas des seuls mécanismes impliqués dans l'innervation de la cicatrice à la suite d'une ischémie. Ainsi, les cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> peuvent elles aussi contribuer à la neurogenèse lors de la fibrose réparative, et ce, en acquérant un phénotype neuronal (6, 58, 59).

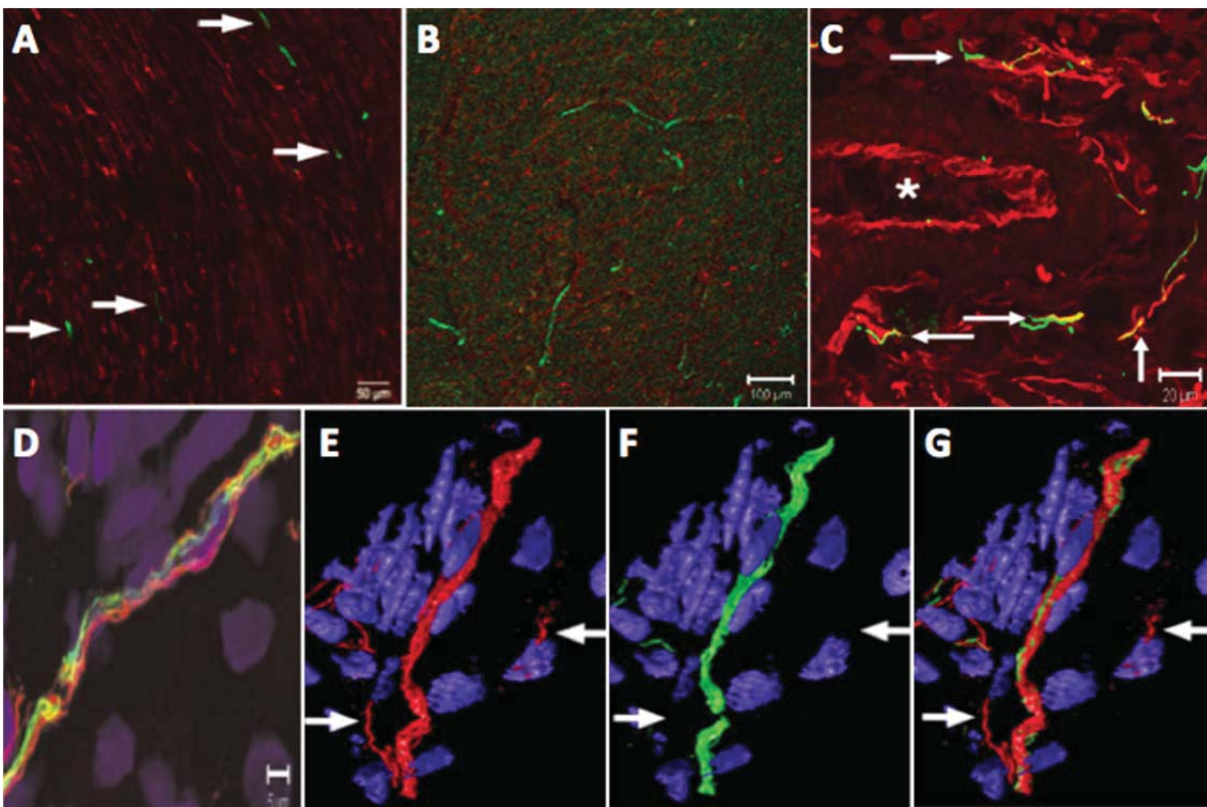
#### 1.1.3.3.1.3.3.1 La neurogenèse et la Nestine

Les cœurs normaux de rats renferment une sous-population de cellules Nestine<sup>(+)</sup> dérivées de la crête neurale présentant un phénotype de cellule souche neurale progénitrice (6, 58, 61-63, 152, 154-157). Il est reconnu qu'une caractéristique propre aux cellules souches neurales consiste à se différencier en un phénotype neuronal et que cette fonction est possible dans n'importe quel tissu (58, 154-156). D'ailleurs, les neurosphères cardiaques, soit une sous-population de cellules résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup>, isolées de la cicatrice cardiaque, puis mises en présence d'un milieu d'induction approprié, se différencient *in vitro* en un phénotype neuronal caractérisé par une expression accrue de Neurofilament-M et de  $\beta$ -tubuline de classe III (58, 59, 61).

Le remodelage neural présent au niveau de la région cicatricielle et entourant la cicatrice à la suite d'un infarctus du myocarde chez divers espèces est quant à lui associé à la présence de fibres neuronales Neurofilament-M<sup>(+)</sup>/Tyrosine Hydroxylase<sup>(+)</sup> et de fibres Neurofilament-M<sup>(+)</sup> qui sont associées physiquement à des fibres Nestine<sup>(+)</sup> (Voir Figure 24 C à G) (6, 58, 60, 61, 63, 73-75, 178). Malgré le fait que la majorité des fibres Neurofilament-M<sup>(+)</sup> co-expriment la Nestine, il est toutefois important de noter que ce ne sont pas toutes les fibres Neurofilament-M<sup>(+)</sup> qui sont associées à la Nestine dans la région cicatricielle et entourant la cicatrice (Voir Figure 24 C, E, F & G) (6, 58, 61). De plus, les fibres



**Figure 24 : Suite à un infarctus du myocarde chez le rat, la région cicatricielle et entourant la cicatrice présente des fibres Neurofilament-M<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup>**



**A** Le myocarde de rat témoin présente des fibres neuronales (Flèches) qui sont exclusivement Neurofilament-M<sup>(+)</sup> (en immunofluorescence verte), ainsi que des fibres Nestine<sup>(+)</sup> (en immunofluorescence rouge). **B à G** Suite à un infarctus du myocarde induit de manière chirurgicale chez le rat, **B** le myocarde non ischémié ne présente pas de fibres neuronales Neurofilament-M<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup>. **C à G** Le myocarde de la région cicatricielle et entourant la cicatrice présente des fibres Neurofilament-M<sup>(+)</sup> qui sont associées physiquement à des fibres Nestine<sup>(+)</sup> **C** Ces fibres (flèches), sont situées à proximité de vaisseaux sanguins (astérisque). Les images **E, F & G** sont des représentations 3D de l'image **D**. **E, F & G** Cependant, ce ne sont pas toutes les fibres Nestine<sup>(+)</sup> qui co-expriment le Neurofilament-M, tel qu'illustré par les flèches. *Images A, D, E, F & G (58) avec la permission de John Wiley and Sons et images B & C (61) avec la permission d'Elsevier.*

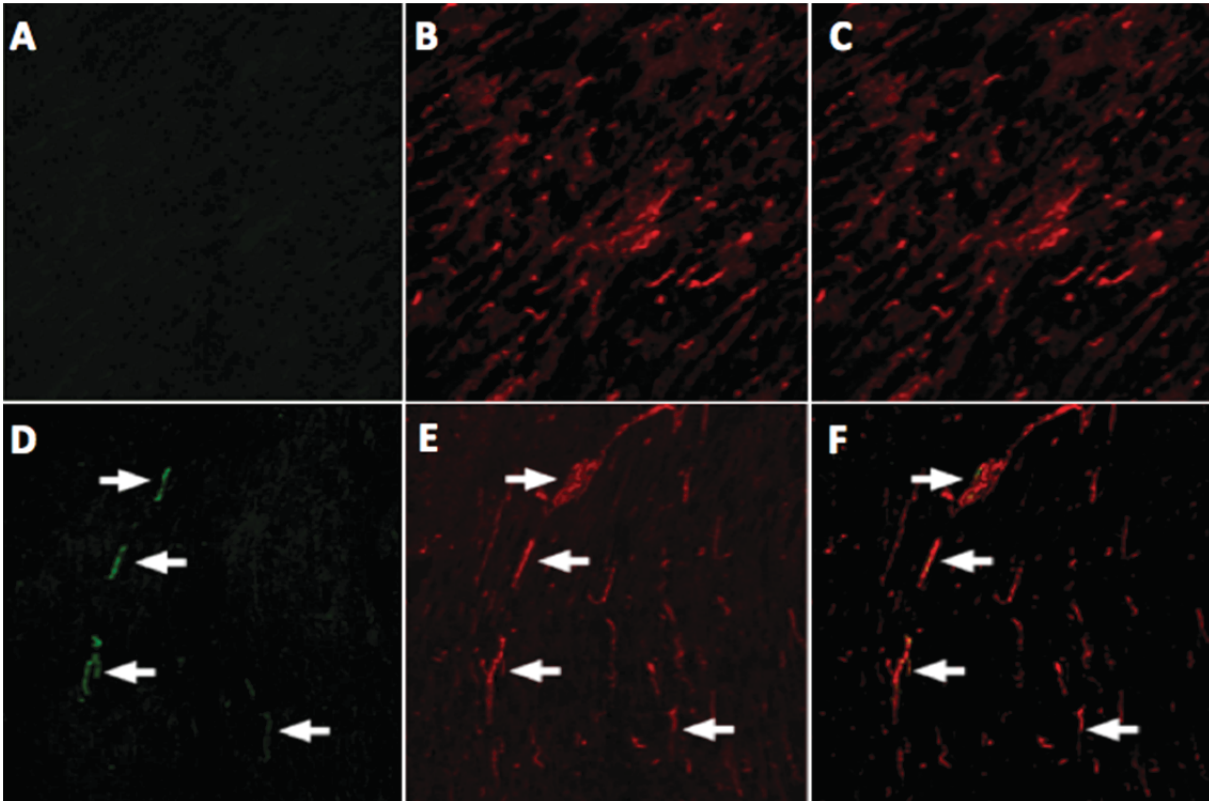
Neurofilament-M<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup> sont absentes du myocarde sain à distance de l'ischémie et du myocarde sain de rat témoin (Voir Figure 24 A & B) (58, 61). Initialement, ces résultats suggéraient que les élongations Nestine<sup>(+)</sup> agissaient à titre d'échafaudage pour permettre la germination de fibres sympathiques dans une bonne orientation lors de la cicatrisation cardiaque, et ce, à l'instar d'un mécanisme similaire observé précédemment chez un modèle de dénervation musculaire squelettique (6, 58, 61, 195, 196). Afin de vérifier si l'apparition

des fibres Neurofilament-M<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup> dans la région cicatricielle et entourant la cicatrice est induite uniquement dans l'optique de fournir un support à la germination sympathique stimulée par le ganglion stellaire gauche, un modèle de dénervation sympathique cardiaque a été employé (6, 58). Pour ce faire, une procédure de transplantation cardiaque hétérotopique isogénique, où le cœur d'un rat mâle a été transplanté dans l'abdomen d'un autre rat mâle, a été réalisée. Une semaine après cette procédure chirurgicale, le cœur transplanté de rat bat toujours, mais il y a perte de l'innervation sympathique, caractérisée par une absence de fibres neuronales sympathiques Neurofilament-M<sup>(+)</sup> au niveau du myocarde transplanté (Voir Figure 25 A à C) (6, 58). Malgré cette perte d'innervation sympathique, il y a présence de cellules résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> au sein du myocarde transplanté (Voir Figure 25 B & C) (58). Toutefois, lorsque l'on induit un infarctus du myocarde de manière chirurgicale chez ce cœur de rat transplanté, alors il y a neurogenèse et formation *de novo* de fibres neuronales Neurofilament-M<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup> (Voir Figure 25 D à F) (6, 58). Ce qui est fascinant, c'est que chez ce modèle, toutes les fibres neuronales Neurofilament-M co-expriment la Nestine (indiqué par les flèches, Figure 25 D à F) (58). De manière analogue, l'administration de 100mg/kg/jour durant 3 jours de 6-hydroxydopamine (6-HD) bromhydrique, soit une neurotoxine qui détruit les terminaisons nerveuses catécholaminergiques, chez des rats témoins et des rats ayant un cœur transplanté a eu pour impact de stimuler la neurogenèse (58). Conséquemment, après seulement quatre jours à la suite de la dernière administration, des fibres neuronales Neurofilament-M<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup> étaient présentes dans le myocarde de ces rats (58).

Afin de déterminer quels sont les mécanismes qui initient l'hyperinnervation de la région cicatricielle et entourant la cicatrice via les cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> à la suite d'un infarctus du myocarde, un modèle de pompe osmotique de NGF (*Nerve Growth Factor*) et un modèle d'hypoxie intermittente ont été employés (6, 58). Chez ces deux modèles, la neurogenèse myocardique a été stimulée, caractérisée par une augmentation de la densité des fibres neuronales Neurofilament-M<sup>(+)</sup> (6, 58). Toutefois, les fibres neuronales Neurofilament-M<sup>(+)</sup> synthétisées *de novo* dans le myocarde à la suite de ces interventions n'étaient pas associées physiquement avec la protéine filamenteuse intermédiaire Nestine (6, 58). Ces résultats suggèrent donc qu'une perfusion de



**Figure 25 : La neurogenèse de la région cicatricielle via les cellules résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> ayant un phénotype de cellule souche neurale progénitrice est indépendant de la neurogenèse via le ganglion stellaire gauche**



**A, B & C** Une semaine suivant la transplantation cardiaque hétérotopique isogénique, il y a perte d'innervation sympathique associée à l'absence de fibres neuronales Neurofilament-M<sup>(+)</sup> (en immunofluorescence verte) au niveau du myocarde transplanté. La protéine filamenteuse intermédiaire Nestine (en immunofluorescence rouge) est encore présente au niveau du cœur ayant subi la transplantation. **D, E & F** L'induction d'un infarctus du myocarde chirurgical au niveau du cœur transplanté ayant perdu toute innervation sympathique provoque la réapparition du phénotype neuronal Neurofilament-M<sup>(+)</sup> où toutes les fibres neuronales synthétisées *de novo* sont physiquement associée à la Nestine (voir les flèches). (58) avec la permission de John Wiley and Sons.

NGF provoque de manière sélective une hyperinnervation sympathique via le ganglion stellaire gauche (58, 75, 177, 187). De plus, l'hypoxie associée à l'occlusion de l'artère coronaire n'est pas suffisante à elle seule pour induire la différenciation des cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal, afin que celles-ci contribuent à la neurogenèse de la région cicatricielle et entourant la cicatrice lors de la fibrose réparative (58). En somme, à la suite d'un infarctus du myocarde chez le rat, une population de cellules résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> qui ont un phénotype de cellules

souches neurales progénitrices participent directement à la fibrose réparative et à la neurogenèse de la région cicatricielle et entourant la cicatrice en acquérant un phénotype neuronal Neurofilament-M<sup>(+)</sup>. Toutefois, l'acquisition de ce phénotype est attribuable à des stimuli distincts de la sécrétion de NGF et de l'hypoxie (6, 58).

#### 1.1.3.3.1.3.3.2 La protéine GAP43

La GAP43 est une protéine qui a pour rôle d'assurer la plasticité structurelle des fibres synaptiques (197-199). De plus, la protéine GAP43 est une médiatrice précoce et importante de la neurogenèse, dont l'expression est augmentée lors des processus de développement, d'apprentissage et de mémorisation, puis régulée à la baisse au niveau de la plupart des synapses neuronales matures (59, 197, 199, 200). Ainsi, la protéine GAP43 stimule le développement et le bourgeonnement des terminaisons nerveuses au niveau des cônes de croissance lorsqu'elle est phosphorylée par la protéine kinase C (75, 183, 200). D'ailleurs, les modèles de souris transgéniques, où la GAP43 est surexprimée, sont associés avec une formation spontanée de synapses, ainsi qu'une germination axonale accentuée en condition normale et à la suite de lésions (75, 183, 197, 201, 202). Puisque l'utilisation d'un modèle de souris homozygote négatif pour le gène de GAP43 est létal, un modèle de *silencing* via un lentivirus shRNA (*microRNA-adapted short hairpin RNA*) ainsi qu'un modèle de souris transgénique ayant une protéine GAP43 mutante non phosphorylable ont été développés afin d'étudier l'importance de cette protéine dans la neurogenèse (183, 197, 199). Ainsi, lorsque l'expression de la protéine GAP43 est réduite, la neurogenèse, qui est normalement initiée à la suite de lésions, est largement entravée, ce qui peut être attribuable au fait que les cônes de croissance sont incapables de produire du NGF (75, 183, 197). En définitive, la protéine GAP43 est essentielle à la réparation des fibres nerveuses périphériques blessées (59, 203). Il est également reconnu qu'à la suite d'un dommage ischémique du myocarde, il y a une augmentation de la densité des fibres neuronales GAP43<sup>(+)</sup>, et ce, tant au niveau de la région qui borde la cicatrice, qu'au niveau de la région non ischémisée du myocarde (75, 191). Enfin, il a été démontré, via la culture de cellules de la peau originaires de la crête neurale, que la différenciation de ces cellules en un phénotype neuronal est associée à une régulation à la baisse de l'expression de la Nestine et à une augmentation concomitante de l'expression de la

protéine GAP43 (59, 154). Ce faisant, à la suite d'un infarctus du myocarde, la protéine GAP43 pourrait jouer un rôle déterminant dans la différenciation des cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal pour contribuer à la neurogenèse et la fibrose réparative (Voir Chapitre 2) (59).

### ***1.1.3.3.2 La région non ischémisée***

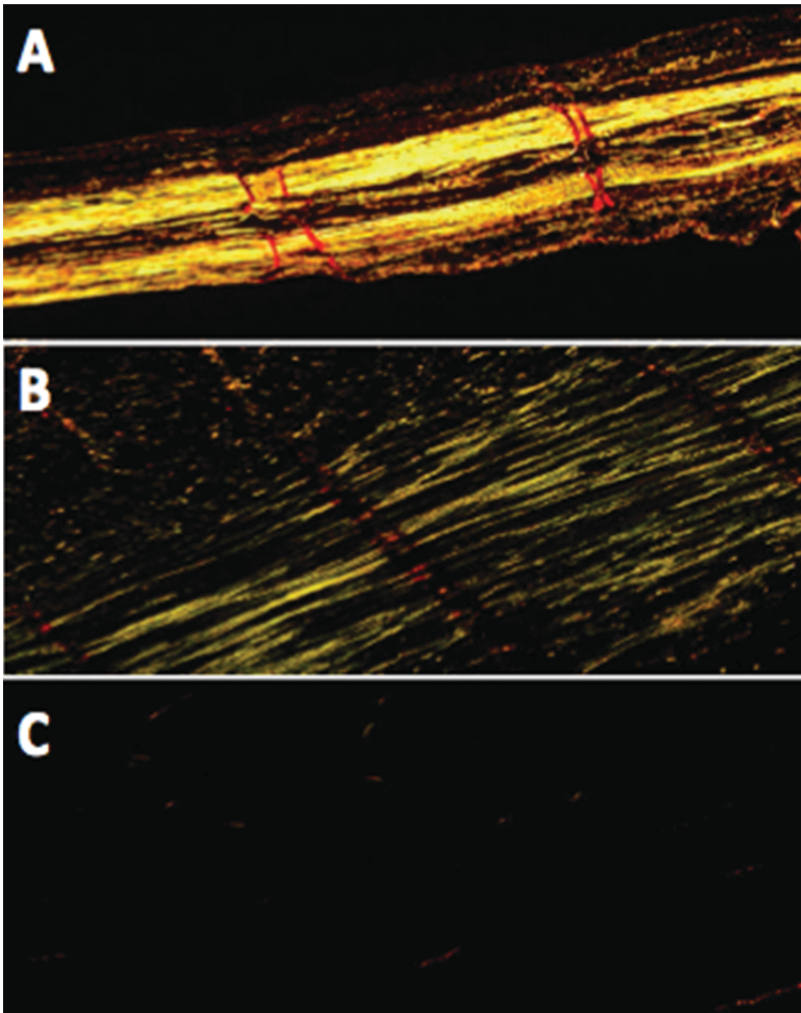
Lors de l'infarctus du myocarde, la nécrose des cardiomyocytes dans la région ischémisée provoque une augmentation drastique des pressions de remplissage dans le ventricule gauche, ce qui entraîne non seulement un remodelage de la région entourant la cicatrice, mais également du myocarde de la zone non infarctée éloignée de la zone ischémisée (57). Ce remodelage du myocarde non ischémié est un processus physiopathologique adaptatif qui implique des modifications structurelles et fonctionnelles, caractérisées par de la fibrose réactive interstitielle et de l'hypertrophie cardiaque (57). D'ailleurs, les types d'hypertrophies cardiaques seront développés à la Section 1.1.4.

#### **1.1.3.3.2.1 La fibrose réactive**

Suite à l'infarctus du myocarde, le remodelage cardiaque entraîne une synthèse exagérée des protéines de l'ECM, qui est bien souvent amplifiée par l'inhibition de la dégradation de ces protéines (204). Il s'agit du phénomène de fibrose cardiaque et il existe deux types de fibroses (204-206). La fibrose réparative est une réponse physiologique essentielle associée à une déposition massive de collagène par les myofibroblastes cardiaques dans la région ischémisée, ce qui permet la formation de la cicatrice cardiaque où il y a eu nécrose des cardiomyocytes (Voir Figure 26) (6, 28, 57, 64, 69, 204-206). Le second type de fibrose, soit la fibrose réactive, est une réponse inadaptée initiée au niveau du myocarde de la région non infarctée qui peut provoquer une dysfonction ventriculaire importante (Voir Figure 26) (110, 204). Contrairement à la fibrose réparative, la fibrose réactive mène à la déposition de collagène fibrillaire dans l'espace interstitiel de manière intercalée entre les cardiomyocytes sains, ainsi qu'à une fibrose réactive périvasculaire où il y a accumulation de collagène au niveau de l'adventice des artères coronaires (110, 204). Cette déposition de collagène est

secondaire aux divers facteurs de croissance et cytokines, tels l'Angiotensine II, l'aldostérone, le TGF- $\beta$ , les catécholamines et le bFGF, qui sont sécrétés de manière compensatoire au niveau du myocarde sain à la suite de la dysfonction myocardique (204, 207, 208). Cette sécrétion de molécules humorales mène à l'activation des fibroblastes de la région non ischémiée, et conséquemment, à la synthèse et à la déposition de collagène de type I et de type III (57, 69, 100, 110, 204). D'ailleurs, le collagène de type I est le type de collagène qui est majoritairement impliqué lors de la fibrose réactive cardiaque interstitielle (Voir Figure 26) (204). Ainsi, la déposition accrue de collagène de type I entre les cardiomyocytes sains provoque une perte d'élasticité du myocarde, car ce type de collagène est reconnu pour sa grande rigidité (113, 204, 206). Ce faisant, l'accumulation de collagène de type I nuit à la fonction ventriculaire systolique et diastolique, en plus d'altérer la conduction électrique des cardiomyocytes (113, 204). En effet, la déposition de collagène sépare les cardiomyocytes les uns des autres, ce qui provoque un remodelage des jonctions communicantes reliant ces cellules (113). Conséquemment, la propagation électrique entre les cardiomyocytes est fragmentée et/ou parfois totalement entravée, ce qui peut mener à des arythmies cardiaques néfastes attribuables à l'hétérogénéité électrique myocardique (113, 204, 206). La fibrose réactive périvasculaire peut quant à elle induire l'hypoxie des cardiomyocytes en augmentant la distance de diffusion à parcourir par l'oxygène au niveau des capillaires coronariens (204, 209).

**Figure 26 : La fibrose réactive et réparative cardiaque à la suite de l'infarctus du myocarde**



La visualisation à la lumière polarisée de coupes de tissu myocardiques colorées au rouge Sirius permet d'observer la déposition de collagène  $\alpha$  de type I en fluorescence jaune.

**A** À la suite d'un infarctus du myocarde chez le rat, il y a formation d'une cicatrice dans la région ischémisée via la fibrose réparative et cette cicatrice est majoritairement formée de collagène.

**B** Dans la zone non ischémisée, le remodelage cardiaque est associé avec une fibrose réactive présente de manière intercalée entre les cardiomyocytes préservés.

**C** Le myocarde de rat témoin ne présente pratiquement pas de collagène au niveau de l'ECM. *Images non publiées.*

### 1.1.3.4 Le diagnostic de l'infarctus du myocarde

Lorsqu'un patient présente comme symptôme une douleur à la poitrine, plusieurs diagnostics sont possibles. En effet, ce symptôme peut témoigner que le patient est atteint d'un syndrome coronarien aigu, tel l'angine instable ou l'infarctus du myocarde, ou encore d'une infection du myocarde ou du péricarde, d'une pneumonie, d'une embolie pulmonaire, de trouble d'anxiété, de maladies gastro-intestinales, etc. (210). Ainsi, les quatre outils diagnostiques suivants permettent de s'assurer de la nature de la pathologie à l'origine du malaise du patient : l'historique clinique et l'examen physique du patient, l'électrocardiogramme, la mesure des biomarqueurs cardiaques dans le sang et, s'il y a lieu, un test à l'effort (210). D'ailleurs, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'*American Heart Association* (AHA) ont défini de manière spécifique les termes permettant le diagnostic de l'infarctus du myocarde, soit la présence de deux des trois conditions suivantes : la modification des biomarqueurs cardiaques, un changement de l'électrocardiogramme (ECG) ou encore la présence de symptômes caractéristiques (48). Cependant, l'avancement des technologies médicales a permis de raffiner les critères diagnostiques, tel que publiés par plusieurs grandes sociétés œuvrant dans le domaine cardiovasculaire (48, 211). Ainsi, le Tableau 2 illustre la définition actuelle d'un infarctus du myocarde (48, 211).

**Tableau 2 : Définition actuelle d'un infarctus du myocarde récent, aigu ou évolutant**

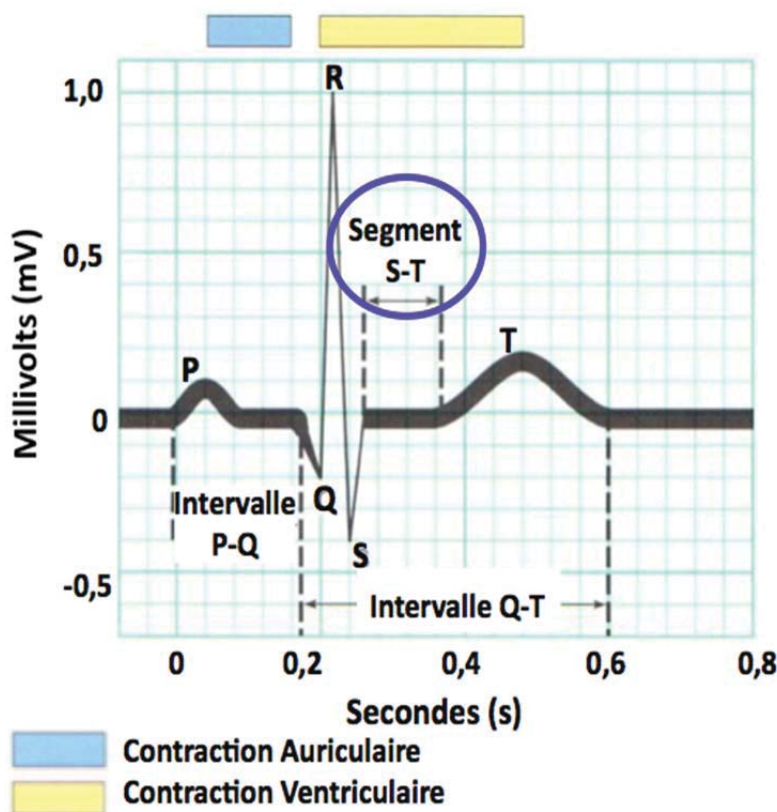
<b>L'un des deux critères suivants révèle la présence d'un infarctus du myocarde récent, aigu ou évolutant :</b>
<b>1- Une montée ou une baisse typique des marqueurs biochimiques de la nécrose myocardique, préférentiellement les Troponines, associée à au moins un des items suivants :</b> <b>A : Symptômes ischémiques</b> <b>B : Développement d'ondes Q pathologiques à l'électrocardiogramme (ECG)</b> <b>C : Changements dans l'ECG qui indiquent une ischémie, soit une élévation ou une dépression du segment ST de l'ECG</b> <b>D : Évidences de nouvelles pertes de myocarde viable ou de nouvelles anomalies régionales de motilité de la paroi visualisées par imagerie.</b>
<b>2- Observation d'anomalies pathologiques d'un infarctus aigu du myocarde</b>

Tableau adapté de (48).



L'historique clinique révèle si le patient est atteint de maladies des artères coronariennes avant l'évènement ischémique, alors que l'examen physique permet de caractériser la localisation temporelle de la douleur éprouvée par le patient (210). De plus, l'examen physique inclus de mesurer le rythme cardiaque et respiratoire, la pression sanguine, mais surtout de réaliser une auscultation cardiaque (48). En effet, l'auscultation cardiaque permet de détecter la présence de murmures systoliques transitoires ou persistants, associés à une régurgitation mitrale, qui sont fréquents chez les patients atteints d'un infarctus du myocarde, plus particulièrement le STEMI (*ST-segment Elevation Myocardial Infarction*) (48). D'ailleurs, il existe trois grandes classes de syndrome coronarien aiguë : l'angine instable (*unstable angina*), l'infarctus du myocarde qui ne présente pas d'élévation du segment ST ((NSTEMI, *Non-ST-segment Elevation Myocardial Infarction*) et l'infarctus du myocarde qui présente une élévation du segment ST sur l'électrocardiogramme (ECG) (Voir Figure 27) (48, 210, 212). L'infarctus STEMI est caractérisé par une occlusion complète d'une artère

**Figure 27 : Une élévation du segment ST sur l'électrocardiogramme est souvent associée à un infarctus STEMI**



Voici un électrocardiogramme normal, soit un tracé de l'activité cardiaque lors des différents battements cardiaques. L'onde P schématise la dépolarisation des oreillettes, qui est suivie de la contraction auriculaire (en bleu). Le complexe QRS correspond à la rapide dépolarisation ventriculaire qui précède la systole du ventricule (en jaune). Le complexe QRS masque l'onde associée à la repolarisation des oreillettes. Le segment ST est associé à la phase de dépolarisation des cardiomyocytes ventriculaires lors du plateau du potentiel d'action. Une élévation du segment ST au-delà de sa valeur initiale est associée à un infarctus STEMI. Enfin, l'onde T correspond à la repolarisation ventriculaire qui précède la diastole des ventricules. (1) avec la permission de Pearson ERPI.



coronaire de l'épicaire par un thrombus riche en fibrine, alors que dans le cas de l'angine instable et de l'infarctus NSTEMI l'occlusion n'est que partielle (212). Quant à eux, l'angine instable et l'infarctus NSTEMI sont plutôt similaires, tant au niveau de leurs présentations cliniques que de leurs origines physiopathologiques, mais elles se distinguent l'une de l'autre principalement de par une sévérité accrue dans le cas de l'infarctus NSTEMI (210). En effet, l'ischémie produite dans le cas de l'infarctus NSTEMI est assez sévère pour provoquer des dommages myocardiques, et conséquemment il y a relâche de biomarqueurs de la nécrose des cardiomyocytes dans le sang des patients qui ont un diagnostic de NSTEMI (210). À l'inverse, les patients qui présentent une douleur à la poitrine secondaire à une angine instable n'ont pas de biomarqueurs cardiaques dans leur sang, et ce, même jusqu'à plusieurs heures à la suite de l'événement cardiaque (210).

Plusieurs biomarqueurs cardiaques sont mesurés afin de diagnostiquer la présence d'un infarctus du myocarde, qu'il soit STEMI ou NSTEMI (Voir Figure 28) (48, 210, 211). Ainsi, suite à l'infarctus du myocarde, la nécrose des cardiomyocytes provoque une rupture de la membrane du sarcolemme des cardiomyocytes, ce qui induit la diffusion de marqueurs sériques cardiaques à l'espace interstitiel cardiaque et éventuellement aux composantes microvasculaires et lymphatiques de la région ischémisée (48, 213, 214). Évidemment, le rythme auquel les différents biomarqueurs cardiaques sont présents dans le sang des patients subissant l'infarctus dépend de plusieurs facteurs, tels que le poids moléculaire de la macromolécule, la circulation sanguine et lymphatique locale, la vitesse d'élimination du marqueur de la circulation sanguine et la localisation intracellulaire de la macromolécule au sein des cardiomyocytes (48, 214, 215). Plusieurs marqueurs sont relâchés par les cardiomyocytes endommagés, soit la myoglobine, les Troponines I et T cardiaques, différentes isoenzymes de la créatine kinase et le lactate déshydrogénase (48, 211, 216). D'ailleurs, la myoglobine et les isoenzymes de la créatine kinase sont les premières macromolécules pouvant être détectées dans le sang des patients subissant un infarctus du myocarde (Voir Figure 28) (48, 210).

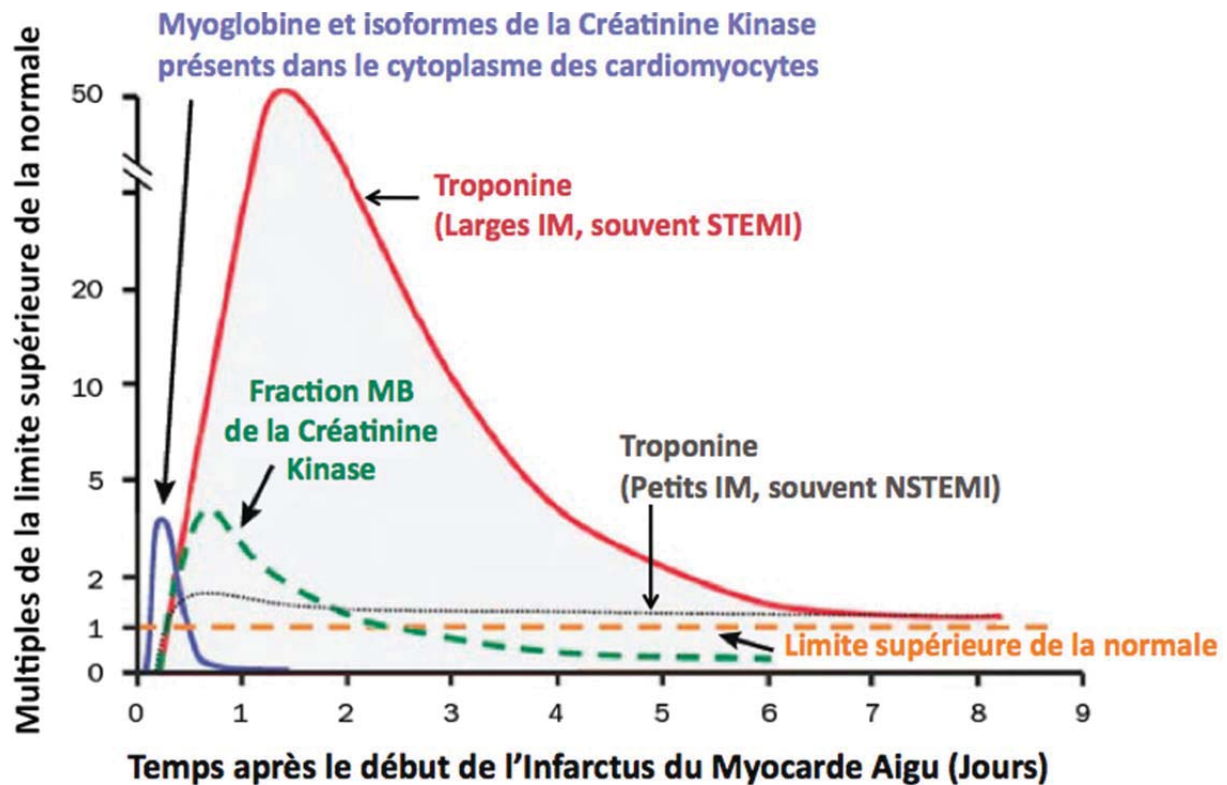
Il existe 2 grandes classes de marqueurs sériques de la nécrose des cardiomyocytes qui sont mesurés pour diagnostiquer un infarctus du myocarde aigu : les isoenzymes de la créatine kinase et les Troponines cardiaques (48, 210, 211). Trois isoenzymes de la créatine kinase sont dénombrés : BB (surtout présente dans le cerveau (*brain*)), MM (surtout présente dans le muscle squelettique (*muscle*)) et le MB (48). Le cœur contient principalement les isoenzymes MM et MB de la créatine kinase (48). Quatre à huit heures à la suite d'un infarctus STEMI, l'activité de la créatine kinase-MB est supérieure à la valeur de référence et elle décline en deçà de cette valeur de 2 à 3 jours à la suite de l'ischémie (Voir Figure 28) (48). Ainsi, sa rapide élimination sérique permet d'évaluer s'il y a présence de seconds infarctus du myocarde, soit à la suite de procédures, soit lors d'une expansion de l'infarctus (210). Cependant, la mesure de l'isoenzyme MB de la créatine kinase n'est pas optimale, car cette isoenzyme peut être présente en grande concentration chez des athlètes d'exception, ou encore à la suite d'un dommage de n'importe quel autre muscle squelettique, chez des patients diabétiques, ou lors d'une intoxication à l'alcool, provoquant un diagnostic de faux positif (48, 217, 218).

La mesure des Troponines T et I est donc favorable, puisque ces marqueurs cardiaques sériques sont plus sensibles en permettant de détecter des nécroses myocardiques microscopiques, quasiment spécifiques au tissu cardiaque et plus précis pour diagnostiquer un dommage myocardique (48, 210, 211, 216). Tel que décrit à la section 1.1.2.1, les Troponines I et T forment un complexe, avec la Troponine-C, la tropomyosine et l'actine, participant au processus de contraction cardiaque dépendant du calcium (1, 48). La plupart des Troponines sont présentes au sein du complexe, mais de 3 à 6% du bassin de Troponine T et I est sous forme libre dans le cytoplasme (48). À la suite de l'ischémie, il y a rupture de la membrane du sarcolemme des cardiomyocytes et une relâche rapide des Troponines T et I cytoplasmiques (48, 211). Par la suite, la relâche provient des Troponines structurellement impliquées dans la formation des myofilaments (48, 211). Ainsi, les niveaux de Troponines T et I commencent à s'élever au-dessus de la valeur de référence normale à partir de 6 heures suivant les premières douleurs à la poitrine, donc le moment optimal pour mesurer cette valeur et obtenir un résultat probant se situe entre 6h et 9h à la suite de l'apparition des symptômes (210, 211). Dû à une relâche progressive provenant de l'appareil contractile des cardiomyocytes nécrosés, une

concentration sanguine de Troponines T et I au-delà de la valeur de référence peut s'étendre jusqu'à 10 à 14 jours et 7 à 10 jours respectivement (48, 210). Ceci explique pourquoi il peut être utile de mesurer l'isoenzyme MB de la créatine kinase pour évaluer l'induction de seconds infarctus (210). Enfin, la mesure de la concentration sanguine des Troponines cardiaques est un outil diagnostique essentiel qui permet de distinguer un infarctus NSTEMI et/ou un petit infarctus, où l'élévation est quelque peu supérieure à la limite supérieure normale, d'un infarctus STEMI et/ou d'un large infarctus, où les niveaux sanguins de Troponines dépassent de 20 à 50 les niveaux normaux (48, 210).

Suite à la réalisation de ces examens (historique clinique, examen physique, ECG, biomarqueurs cardiaques, mais également si nécessaire une échocardiographie ou d'autres techniques d'imagerie médicale) et à l'analyse des résultats qui en découlent, il est possible d'identifier le type de syndrome coronarien aigu et d'établir le traitement adéquat (48, 210). Cependant, il est important de noter que le temps est un élément important dans le traitement des infarctus du myocarde. Ainsi, si un STEMI est suspecté à la suite de l'ECG à 12 dérivations et d'autres tests rapides, les résultats des biomarqueurs cardiaques ne sont pas nécessairement attendus avant de débiter un traitement de reperfusion (48, 212).

Figure 28 : Schématisation temporelle de la relâche de biomarqueurs cardiaques à la suite d'un infarctus du myocarde aigu (STEMI ou NSTEMI)



Tout d'abord, sur ce graphique, on observe en orangé la limite supérieure de la normale (LSN), qui correspond à la mesure des différents biomarqueurs qui incluent 99% d'une population de référence normale, donc qui n'a pas subi de nécrose de cardiomyocytes. Cette valeur est remise à 1 et les concentrations, en fonction du temps suivant l'ischémie en jour, des différents biomarqueurs cardiaques illustrés sont des multiples de cette limite supérieure normale. À la suite de l'ischémie, due à la rupture de la membrane du sarcolemme des cardiomyocytes, il y a une relâche rapide de Troponines, de myoglobine et des isoformes de la créatine kinase présents dans le cytoplasme des cardiomyocytes (en indigo). Par la suite, la fraction MB (*Muscle Brain*) de la créatine kinase est relâchée à des niveaux de 2 à 5 fois supérieurs à la LSN, puis elle revient à des niveaux normaux à 2 à 3 jours suivant l'ischémie (en vert). La mesure de la concentration sanguine des Troponines cardiaques permet de distinguer un infarctus NSTEMI (*Non-ST-segment Elevation Myocardial Infarction*) et/ou un petit infarctus du myocarde (IM) (en gris), où l'élévation est quelque peu supérieure à la LSN, d'un infarctus STEMI (*ST-segment Elevation Myocardial Infarction*) et/ou d'un large infarctus (en rouge), où les niveaux sanguins de Troponines dépassent de 20 à 50 les niveaux normaux. Toutefois, les Troponines demeurent plus longtemps dans le sang, soit durant au moins 7 jours à la suite de l'événement cardiaque. (48) avec la permission d'Elsevier.

### ***1.1.3.5 Les traitements actuels de l'infarctus du myocarde***

#### ***1.1.3.5.1 La reperfusion est instaurée le plus rapidement possible lors d'un infarctus STEMI***

Suite à une obstruction complète d'une artère coronaire (infarctus STEMI), la thérapie devant être initiée le plus rapidement possible après l'événement ischémique est la reperfusion (48, 212). La reperfusion permet de rétablir la circulation sanguine coronaire et l'équilibre entre la demande et l'alimentation en oxygène, pour ainsi préserver le plus de tissu cardiaque (48, 212). Si la reperfusion est effectuée dans des délais appropriés, elle permet de diminuer la taille de la cicatrice, de conserver le maximum de fonction systolique ventriculaire gauche et de fonction diastolique, ainsi que d'améliorer les taux de survie des patients qui subissent l'ischémie (48, 212). Il existe deux stratégies pour tenter de rétablir la perfusion de l'artère coronaire obstruée : une fibrinolyse pharmacologique intraveineuse et une intervention coronarienne percutanée primaire (PCI, *primary percutaneous coronary intervention*) (212, 219). La première consiste à injecter de manière intraveineuse un agent fibrinolytique, tel la streptokinase, la rétépase, l'altépase et la ténectépase (48, 212). Leur mode d'action, à titre d'enzymes, consiste à catalyser la conversion du plasminogène, pour ainsi produire de la plasmine (48, 220). La plasmine a pour fonction de détruire le réseau enchevêtré de fibrine et ainsi détruire/réduire la taille du caillot qui obstrue l'artère coronaire pour rétablir la circulation sanguine (48, 220). La streptokinase est cependant beaucoup moins utilisée actuellement, puisqu'elle est non-fibrine spécifique, c'est-à-dire qu'elle agit sans avoir à se lier à la fibrine, contrairement aux activateurs du plasminogène tissulaire recombinants (rétépase, altépase et ténectépase) qui sont des agents fibrinolytiques spécifiques à la fibrine (48, 220). De plus, cette thérapie fibrinolytique est recommandée chez les patients qui présentent un infarctus STEMI, mais qui ne présentent aucune contre-indication (ex : risque accru/antécédents d'hémorragie cérébrale) et dont l'événement ischémique cardiaque, qui correspond au moment de la douleur à la poitrine, est survenu dans un délai inférieur à 12 heures (212). Enfin, la combinaison d'agents fibrinolytiques à des antagonistes des récepteurs GPIIb/IIIa, qui sont des récepteurs présents sur les plaquettes qui contribuent à l'agrégation plaquettaire, n'est pas recommandée (48, 212, 221). En effet, cette combinaison n'a pas

démonté de supériorité, comparativement à l'utilisation seule d'agents fibrinolytiques lors d'une procédure de reperfusion, à améliorer les bénéfices cliniques sur la survie chez des patients STEMI, tout en augmentant les risques de saignements (212).

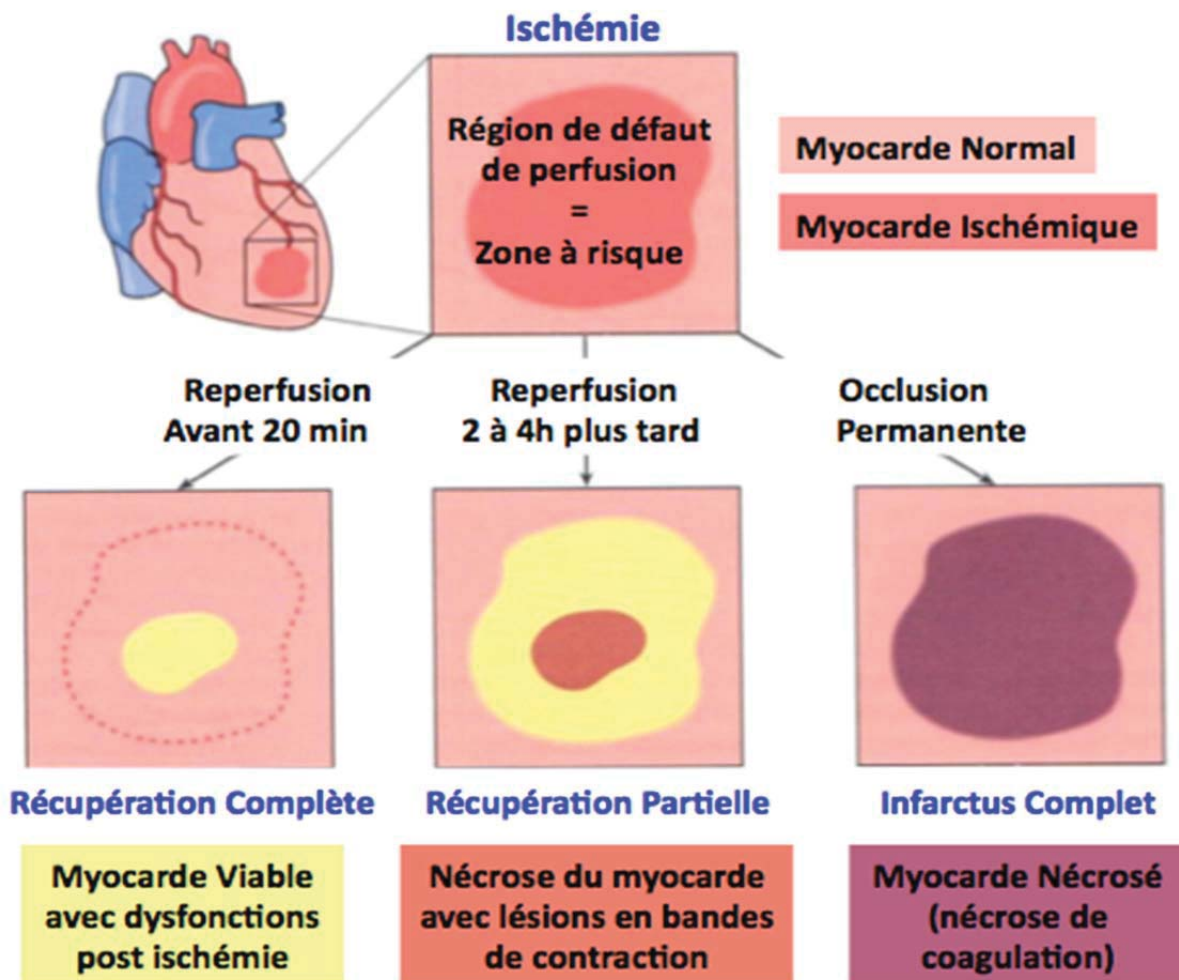
La seconde procédure, la PCI primaire est une procédure d'angioplastie non chirurgicale où un cathéter est introduit afin de réduire la sténose d'une artère, et ce, en ouvrant un ballon au bout du cathéter pour écraser le thrombus sur la paroi du vaisseau (48). Cette procédure peut aussi inclure une pose subséquente de 'stent' (une endoprotèse vasculaire) pour maintenir le vaisseau sous une forme élargie afin de faciliter la circulation sanguine (48). Il a été démontré, via une méta-analyse de 23 études cliniques randomisées, que la procédure PCI est supérieure à la thérapie pharmacologique fibrinolytique, puisque la PCI permet de réduire l'incidence d'évènements indésirables et diminue la mortalité comparativement à la reperfusion pharmacologique (212, 219). Cependant, selon les lignes directrices de l'ACC (*American College of Cardiology*) et l'AHA (*American Heart Association*) le scénario clinique, soit le laps de temps qui sépare le moment de la douleur cardiaque du moment auquel la procédure peut être initiée, est déterminant dans le choix de la procédure (212, 221, 222). Ainsi, s'il est possible de réaliser une procédure PCI en dedans de 90 minutes depuis la première consultation médicale, alors cette avenue est bien souvent sélectionnée et démontre sa supériorité clinique (212). Chose certaine, l'efficacité des deux interventions diminue avec le temps, et cela est encore plus critique dans le cas de la fibrinolyse pharmacologique, puisque le thrombus coronarien s'amplifie avec le temps et est donc plus difficile à réduire/détruire (48, 212).

Pour l'instant, le seul et unique traitement approuvé pour limiter la taille de l'infarctus et permettant ainsi d'améliorer la capacité cardiaque des patients atteints consiste à rétablir promptement le flux coronaire dans le territoire ischémiquement atteint via la reperfusion (48). Ainsi, si la reperfusion survient très rapidement, alors le myocarde ischémié est protégé et ne subit pas de nécrose des cardiomyocytes (Voir Figure 29) (48, 223). Le tissu myocardique est donc préservé et viable, mais une partie de la zone ayant subi l'ischémie, puis reperfusée, peut tout de même présenter des dysfonctions contractiles mais réversibles (48, 223). Cependant, dès que le délai avant la reperfusion surpasse une vingtaine de minutes, le pourcentage de

cardiomyocytes pouvant être préservés, qui correspond au ratio de la taille de l'infarctus divisée par la taille de la zone à risque, est directement proportionnel au temps d'occlusion, à la circulation collatérale et à la consommation d'oxygène au moment de l'ischémie (48, 223, 224). Ainsi, si le délai avant la reperfusion est plus long, soit de 2 à 4 heures suivant l'ischémie, alors une partie du myocarde peut être préservée, mais une bonne partie du myocarde subi des lésions de reperfusion. Ces dommages peuvent être des arythmies de reperfusion, des lésions vasculaires de reperfusion, des anomalies contractiles des cardiomyocytes récupérés et de la nécrose en bandes de contraction (Voir Figure 29) (48, 223). Il s'agit toutefois d'un type de nécrose distinct de la nécrose de coagulation, qui est observée lorsque l'occlusion est permanente (Voir Figure 29) (48, 223). Ainsi, la nécrose en bande de contraction cause la mort de cellules qui étaient encore intactes avant la reperfusion, et donc, les cardiomyocytes cessent de fonctionner dans un état contracté (48). Ce type de nécrose est associé à la présence de myofibrilles en état hypercontracté où l'on peut observer des bandes de contraction, car l'influx calcique est accru au niveau de ces cellules mourantes (Voir Figure 30) (48, 223). De plus, la nécrose en bandes de contraction est caractérisée par des dommages mitochondriaux, de la congestion vasculaire, ainsi que de la calcification (48). Lorsque le délai de reperfusion dépasse 20 minutes, cette thérapie n'est pas parfaite, car la zone ayant subi l'ischémie peut présenter une architecture cellulaire difforme constituée de cellules gonflées, d'un mélange de nécrose de coagulation, de nécrose avec lésions en bandes de contraction et des hémorragies, secondaires aux dommages microvasculaires (Voir Figure 30) (48). Il existe toutefois des approches pour tenter de diminuer les lésions de reperfusion, tel le post-conditionnement, qui récré de courts épisodes d'ischémie/reperfusion, afin de stimuler des mécanismes biologiques protecteurs impliquant des kinases associées à la survie (48, 225, 226). Cette stratégie a démontré des bénéfices cliniques à réduire la taille de la zone infarctée et à améliorer la perfusion myocardique (48, 227). Des approches pharmacologiques, via des antithrombines et des antiplaquettaires, peuvent également permettre d'améliorer la préservation de l'intégrité microvasculaire (48). Cependant, dû à une très courte fenêtre d'efficacité de ces approches, une zone du myocarde ischémié devient tout de même infarctée, ce qui nécessite la formation d'une bonne cicatrice afin de préserver un maximum de fonction ventriculaire (48).



Figure 29 : Impact des délais de reperfusion à la suite de l'ischémie myocardique



Suite à l'ischémie cardiaque, la région de défaut de perfusion constitue la zone à risque. Si le myocarde est reperfusé dans un délai inférieur à 20 minutes, alors il n'y a pas de dommage permanent du tissu cardiaque, mais des dysfonctions contractiles peuvent survenir durant une certaine période (jaune). Une reperfusion à l'intérieur de 2 à 4 heures procure une récupération partielle jumelée à une nécrose en bande de contraction (ocre). Lorsque l'occlusion est permanente sans reperfusion, alors la zone à risque devient totalement nécrosée, sous forme de nécrose de coagulation (bourgogne). (48) avec la permission d'Elsevier.

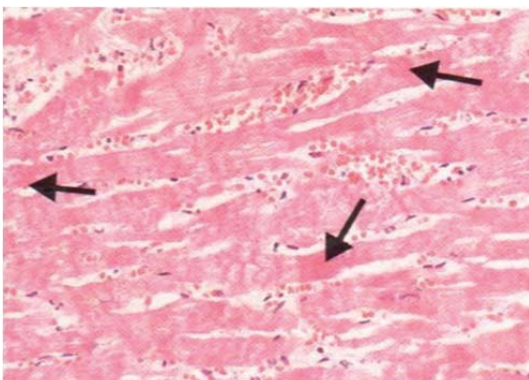


Figure 30 : La reperfusion entraîne des lésions de reperfusion en bandes de contraction

Suite à la reperfusion du myocarde ischémié, il y a présence d'hémorragies (accumulation de cellules sanguines) et de nécroses en bandes contraction (identifiées par des flèches), qui sont reconnaissables dû à leur aspect plus sombre et plus compact. (48) avec la permission d'Elsevier.

### ***1.1.3.5.2 Les traitements à long terme de l'infarctus du myocarde***

Évidemment, les patients ayant subi un infarctus du myocarde STEMI sont très à risque de présenter à nouveau un événement ischémique délétère (48). Ce faisant, la première stratégie pour améliorer le taux de survie chez ces patients consiste à modifier leurs habitudes de vie, pour ainsi diminuer les facteurs de risque ayant contribué à provoquer le premier événement (48). D'ailleurs, une attention particulière doit être consacrée à cesser la consommation tabagique et à atteindre les cibles thérapeutiques de pression sanguine systolique et diastolique, car ce sont les deux modifications des habitudes de vie qui présentent le plus de bénéfice à réduire la mortalité et/ou l'avènement d'évènements ischémiques secondaires (48). Cependant, si les modifications des habitudes de vie ne sont pas suffisantes pour réduire les facteurs de risques, alors une panoplie de thérapies pharmacologiques sont présentes sur le marché pour améliorer la fonction ventriculaire, permettre la vasodilatation des artères coronaires et réduire la formation de caillots sanguins dans le but de prévenir la survenue d'autres syndromes coronariens aigus (STEMI, NSTEMI, angine instable) (48).

#### **1.1.3.5.2.1 Les bêta-bloqueurs**

L'action des  $\beta$ -bloqueurs consiste à inhiber les récepteurs  $\beta$  présents dans le nœud sinusal et au niveau des cardiomyocytes, afin de diminuer la conduction du nœud auriculo-ventriculaire (228). Les antagonistes des récepteurs  $\beta_1$ , tel le Métoprolol, ont une action cardio-sélective et empêchent la noradrénaline, qui est relâchée par l'innervation sympathique cardiaque, de lier son récepteur (228). Ce faisant, l'action de cette drogue consiste à diminuer la fréquence cardiaque, la force de contraction cardiaque, ainsi que le débit cardiaque, et ces actions permettent de diminuer la demande myocardique en oxygène (48, 228). Ainsi, lorsque les  $\beta$ -bloqueurs sont administrés de manière précoce en intraveineuse, ils permettent de réduire la taille de l'infarctus, puisque la taille de l'infarctus est directement proportionnelle à la demande en oxygène (48, 223, 224). De plus, les  $\beta$ -bloqueurs permettent de réduire de 23% la mortalité à long terme, en prévenant la survenue de nouvelles ischémies et en jouant un rôle d'anti-arythmique, ce qui permet d'éviter la mort subite (48, 212, 221). Ainsi, les recommandations de l'ACC/AHA stipulent que, sauf chez les patients présentant des contre-

indications, telle que l'insuffisance cardiaque, un  $\beta$ -bloqueur devrait être administré dans les 24 heures suivant l'infarctus STEMI (212, 222).

#### **1.1.3.5.2.2 Les vasodilatateurs**

Les vasodilatateurs employés dans la stratégie pharmacologique à la suite d'un infarctus STEMI sont la nitroglycérine et les inhibiteurs des canaux calciques (48, 212). Chez les patients ayant eu un infarctus STEMI et pour lesquels les  $\beta$ -bloqueurs sont inefficaces, contre-indiqués ou entraîne trop d'effets secondaires nuisibles, les inhibiteurs des canaux calciques non-dihydropyridiniques, tels le Verapamil et le Diltiazem, sont des vasodilatateurs recommandés selon l'ACC/AHA, car ils permettent de réduire la mortalité et/ou la survenue d'évènements cardiaques (48, 212). Il existe deux grandes classes d'inhibiteurs des canaux calciques, soit les dihydropyridiniques, telle la Nifédipine, qui sont sélectifs aux vaisseaux sanguins, donc contribuent essentiellement à réduire la résistance périphérique totale, et les non-dihydropyridiniques qui agissent à la fois sur le muscle lisse vasculaire et sur les cardiomyocytes (228). Ces molécules ont pour action d'inhiber les canaux calciques voltage-dépendant, ce qui bloque l'entrée de calcium intracellulaire et inhibe la machinerie contractile dépendante du calcium (228). Les inhibiteurs des canaux calciques non-dihydropyridiniques ont donc pour effet de réduire le débit cardiaque, de contrôler les arythmies cardiaques, en plus de permettre la vasodilatation (48, 212, 228). Cependant, il est important de noter que la Nifédipine est quant à elle contre-indiquée aux patients STEMI dû à son effet secondaire de tachycardie (48, 212, 228).

La Nitroglycérine est utile pour gérer les crises d'angine instable en diminuant la douleur qui lui est associée, car cette molécule est transformée par une enzyme mitochondriale, l'aldéhyde déshydrogénase, en monoxyde d'azote, ce qui entraîne une vasodilatation rapide des CML des artères coronaires (228). Cependant, la Nitroglycérine n'a pas démontré de bénéfices cliniques à réduire la mortalité à long terme chez les patients ayant subi un infarctus STEMI (48, 212, 221). Cette molécule présente tout de même des propriétés intéressantes pour favoriser une utilisation aigüe chez cette catégorie de patients (48). En effet, la nitroglycérine permet de réduire les pressions de remplissage et les pressions systoliques et

diastoliques artérielles, de diminuer la pression induite sur la paroi et diminuer le travail cardiaque, tout en améliorant la circulation sanguine coronaire, sans toutefois parvenir à rouvrir totalement l'artère occlusée (48). De plus, il a été démontré que l'utilisation aiguë de la Nitroglycérine permet de réduire la taille de la région infarctée (48).

#### **1.1.3.5.2.3 Les inhibiteurs du système Rénine-Angiotensine-Aldostérone**

Il existe trois grandes classes d'inhibiteurs du système Rénine-Angiotensine-Aldostérone, soit les Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine (IECA), les Antagonistes des Récepteurs de l'Angiotensine (ARA) et les antagonistes des récepteurs minéralocorticoïdes de l'Aldostérone (48, 228). Tout d'abord, les IECA, tel le Captopril, inhibent avec une haute sélectivité l'enzyme qui permet la conversion de l'Angiotensine I en Angiotensine II (228). Or, l'Angiotensine II est une puissante molécule vasoconstrictrice, puisqu'elle induit la contraction des CMLV, tout en favorisant la relâche d'endothéline, ce qui augmente la résistance vasculaire périphérique (229, 230). De plus, l'Angiotensine II stimule la synthèse et la relâche d'aldostérone en liant son récepteur AT<sub>1</sub> (le récepteur de type 1 à l'Angiotensine II) présent sur les glandes surrénales, augmentant ainsi la pression sanguine systémique via une élévation du débit cardiaque et du volume sanguin (229, 231). En plus d'être impliquée dans le système Rénine-Angiotensine-Aldostérone, l'enzyme de conversion de l'Angiotensine II a également un impact sur le système kallikreine-kinine (229). En effet, l'ECA est l'enzyme principale qui métabolise les kinines (229). Conséquemment, l'utilisation d'IECA permet non seulement d'inhiber la synthèse et la relâche de molécules vasoconstrictrices (Angiotensine II, endothéline et Aldostérone), mais empêche également la dégradation de puissantes molécules vasodilatatrices, soient la bradykinine et la kallidine (Lys-bradykinine), contribuant à réduire la pression sanguine, et ce, principalement au niveau des artères périphériques et coronaires (229, 232). D'ailleurs, l'impact vasodilatateur des IECA est davantage attribuable à son effet protecteur sur la dégradation des kinines, plutôt qu'à la réduction de la synthèse d'Angiotensine II (229, 233). Une méta-analyse d'études cliniques a quant à elle démontré que les IECA contribuent à diminuer la survenue d'évènements cardiaques ischémiques, en plus de réduire significativement la mortalité chez les patients ayant subi un infarctus STEMI (48, 212, 221, 234). D'ailleurs, ces bienfaits sur la

survie sont associés à une diminution de la progression de l'infarctus du myocarde vers une insuffisance cardiaque congestive, via une amélioration des valeurs hémodynamiques et à son effet à prévenir le remodelage tardif du ventricule gauche (48).

Les ARA, tel le Valsartan, sont une alternative pharmacologique aux IECA et sont recommandés chez les patients ayant subi un infarctus STEMI (48, 212). Ils ont une affinité sélective pour les récepteurs de type 1 de l'Angiotensine II et bloquent l'interaction entre l'Angiotensine II et son récepteur présent sur les CML des vaisseaux sanguins, ce qui empêche la vasoconstriction (228). Également, les ARA inhibent la relâche d'Aldostérone en liant les récepteurs AT<sub>1</sub> présents sur les glandes surrénales (228). De plus, l'étude clinique VALIANT (*VALsartan In Acute myocardial iNfarcTion*) a démontré que l'utilisation d'un ARA, le Valsartan, est tout aussi efficace que l'utilisation d'un IECA, le Captopril (48, 235). En effet, il n'y avait aucune différence statistiquement significative entre ces deux médications sur les taux de survie et la survenue d'évènements ischémiques secondaires chez des patients ayant subi un infarctus du myocarde et qui présentent des complications, telle que l'insuffisance cardiaque (48, 235).

Les antagonistes des récepteurs minéralocorticoïdes, tels la Spironolactone et l'Éplérénone, agissent à titre de diurétiques en bloquant l'action rénale de l'Aldostérone au niveau du tubule contourné distal et du tube collecteur, ce qui a pour conséquence d'inhiber la réabsorption sodique et hydrique tout en diminuant l'excrétion potassique (228, 236). De plus, les bloqueurs de l'Aldostérone contribuent à diminuer le remodelage cardiaque en prévenant la fibrose réactive interstitielle et périvasculaire du myocarde sain, ce qui permet de réduire le dysfonctionnement systolique et diastolique (207, 208, 236-241). Également, l'antagonisme des récepteurs minéralocorticoïdes permet de diminuer la taille de l'infarctus, de prévenir l'apoptose des cardiomyocytes, ainsi que de protéger le myocarde lors d'une ischémie/reperfusion en favorisant la récupération de la pression ventriculaire gauche (241, 242). Trois études cliniques majeures, soit l'étude RALES (*Randomized Aldactone Evaluation Study*) en 1999, l'étude EPHEsus (*Eplerenone Post-acute myocardial infarction Heart failure Efficacy and SURvival Study*) en 2003 et l'étude EMPHASIS-HF (*Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And Survival Study in Heart Failure*) en 2011 ont démontré que les

antagonistes de l'Aldostérone permettent de diminuer la mortalité et la morbidité chez des patients ayant différents degrés d'insuffisance cardiaque lorsqu'ils sont ajoutés aux thérapies usuelles pour cette maladie (48, 228, 243-245). De plus, dû à sa caractéristique d'améliorer le statut et le pronostic de la pathologie, l'antagonisme des récepteurs minéralocorticoïdes est jugé utile, efficace et recommandé en insuffisance cardiaque modérée à sévère selon les recommandations de l'ACC, l'AHA et la SCC (Société Canadienne de Cardiologie) (246-248). Pour toutes ces raisons, les antagonistes des récepteurs minéralocorticoïdes sont actuellement approuvés chez les patients subissant un infarctus du myocarde aigu, afin de réduire la progression de complications, telles la dysfonction ventriculaire gauche et l'insuffisance cardiaque (48).

#### **1.1.3.5.2.4 Les agents antithrombotiques**

Les agents antithrombotiques, constitués des antiplaquettaires et des anticoagulants, sont utilisés lors de la reperfusion chez les patients ayant subi un infarctus STEMI afin de débloquent l'artère occlusée et ainsi réduire les conséquences néfastes de l'ischémie (212). De plus, ils sont également utilisés à long terme afin d'améliorer la cicatrisation cardiaque et surtout afin de diminuer le risque que d'autres événements ischémiques surviennent (212). L'Aspirine est l'antiplaquettaire standard à utiliser chez tous les patients présentant un infarctus STEMI et son administration doit être débutée le plus rapidement possible, puis de manière quotidienne (212). L'étude clinique ISIS-2 (*Second International Study of Infarct Survival*) a quant à elle démontré de manière non équivoque que l'Aspirine contribue à réduire la mortalité chez les patients ayant un infarctus du myocarde aigu évoluant (212, 249). L'aspirine réalise son action antiplaquettaire en inhibant de manière sélective la COX-1 (Cyclo-Oxygénase-1) lorsqu'administrée à faible dose (48, 228). L'aspirine est un Anti-Inflammatoire Non-Stéroïdien (AINS) qui inhibe la transformation de l'acide arachidonique, ce qui diminue la production de thromboxane-A<sub>2</sub>, une molécule qui stimule l'agrégation plaquettaire (228).



Les thienopyridines, tels la Ticlopidine, le Clopidogrel et le Prasugrel, sont des prodrogues qui doivent d'abord être métabolisées par les cytochrome p450 hépatiques, pour ensuite se lier de manière irréversible au récepteur P2Y<sub>12</sub> de l'ADP (Adénosine DiPhosphate) présents sur les plaquettes (48). Ce faisant, l'ADP ne peut plus produire son action sur le recrutement et l'activation des plaquettes, ce qui bloque l'agrégation plaquettaire (48). Ainsi, des études cliniques ont su démontrer l'efficacité du Clopidogrel, lorsque combiné à l'aspirine, à réduire la mortalité et/ou la survenue d'infarctus secondaire d'environ 20% à 9% chez des patients STEMI (48, 212, 250, 251). Cette combinaison permet de bloquer deux voies distinctes, mais complémentaires, associées à l'agrégation plaquettaire (48). C'est pourquoi les recommandations de AHA/ACC stipulent que le Clopidogrel doit être ajouté à l'Aspirine chez les patients ayant subi un infarctus STEMI, et ce, peu importe qu'ils aient reçu une thérapie de reperfusion ou non (212, 222).

Les anticoagulants peuvent être divisés en deux classes, soit selon leur mode d'administration, soit parentérale pour l'héparine, l'héparine de bas poids moléculaire, le Fondaparinux et la Bivalirudine, ou encore une administration *per os* comme pour la Warfarine (48). L'héparine réalise son action anticoagulante en activant l'antithrombine, en réalisant le pont entre la thrombine et l'antithrombine, et cette enzyme peut alors inhiber plus rapidement les enzymes qui participent à la coagulation sanguine, soit la thrombine et le facteur Xa de la cascade de coagulation (48). Dû à sa difficulté d'utilisation, attribuable principalement au fait que l'héparine se lie à des protéines plasmatiques mais de manière très variable d'un patient à l'autre, l'utilisation de l'héparine a été remplacée par l'héparine à bas poids moléculaire et par le Fondaparinux (48). L'héparine à bas poids moléculaire, une molécule biologique préparée à partir de l'héparine non fractionnée, et le Fondaparinux, un pentasaccharide synthétique, ont une meilleure biodisponibilité, car ils lient moins fortement que l'héparine certaines protéines plasmatiques, et cela permet alors d'obtenir une relation dose-réponse prévisible (48). Cependant, le mécanisme d'action de l'héparine à bas poids moléculaire et du Fondaparinux se distingue légèrement de par leur plus petite taille qui ne permet pas à ces molécules de faire le pont entre l'antithrombine et la thrombine (48). Ce faisant, leur action consiste davantage à activer l'antithrombine afin d'inhiber le facteur Xa, plutôt que d'inhiber directement la thrombine (48). La Bivalirudine inhibe directement la



thrombine et est recommandée par l'AHA et l'ACC pour les patients ayant subi un infarctus STEMI, car cette molécule anticoagulante à administration parentérale permet de réduire la mortalité et les complications de saignements (48, 212, 252). L'anticoagulant oral largement utilisé actuellement est évidemment la Warfarine, mais celle-ci est difficile d'utilisation car elle nécessite un monitoring constant via le test INR (*International Normalized Ratio*) afin d'éviter la survenue de saignements (48). La Warfarine est un antagoniste de la Vitamine K, qui est une vitamine essentielle pour permettre la synthèse hépatique de certains facteurs de coagulation (II, VII, IX et X) (48). Enfin, de nouveaux anticoagulants oraux existent, tels le l'Étexilate de dabigatran, qui inhibe la thrombine, et le Rivaroxaban, qui inhibe le facteur Xa, mais ceux-ci ne sont pas recommandés pour l'instant à long terme à la suite d'un infarctus, mais bien plutôt à court terme pour prévenir la formation de thrombus à la suite de chirurgies des membres inférieurs (48).

#### **1.1.3.5.2.5 Les thérapies émergentes favorisant la régénération des cardiomyocytes**

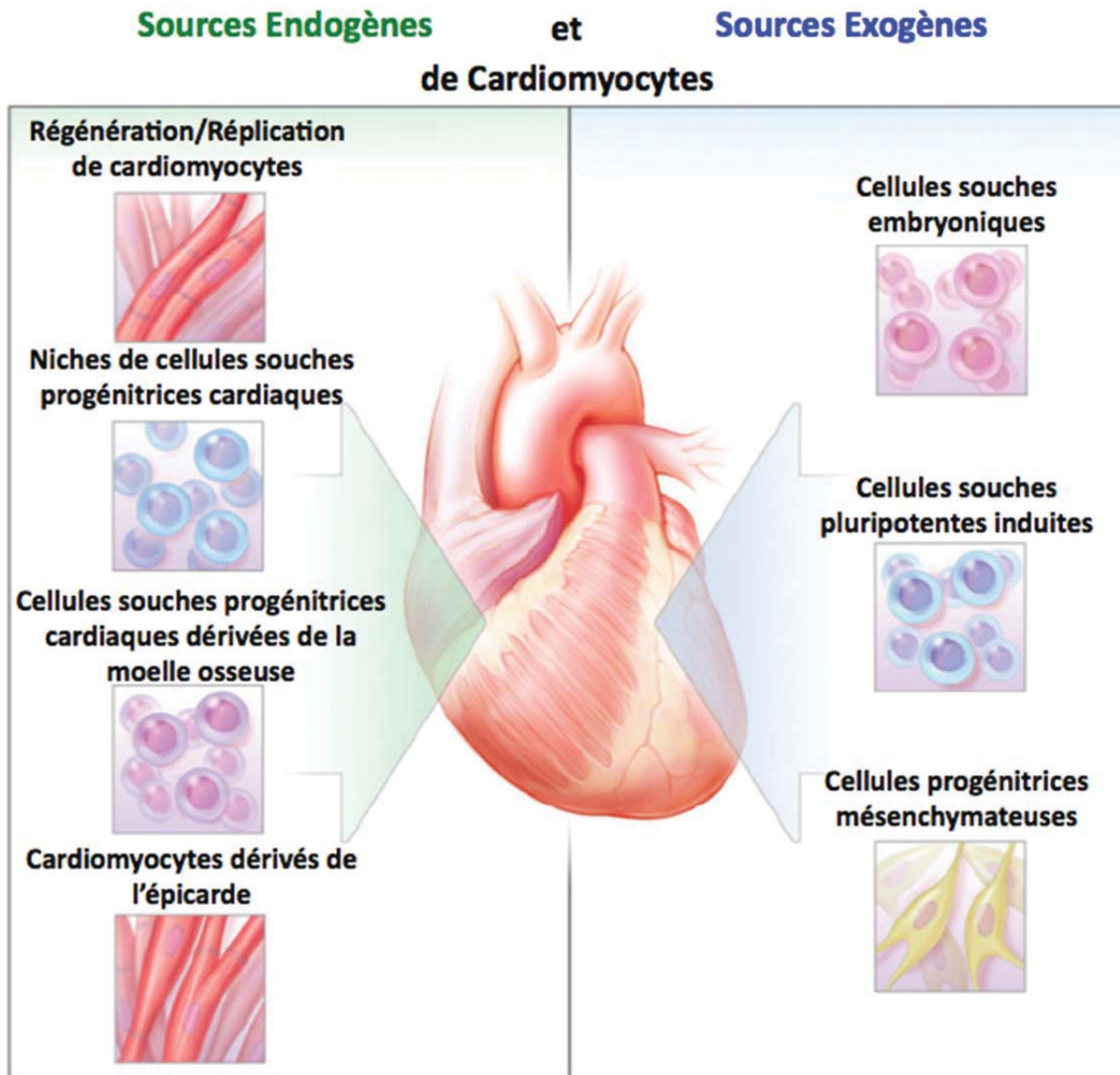
Il est désormais reconnu que le cœur n'est pas totalement différencié de manière terminale et qu'une partie des cardiomyocytes sont donc capables de réentrer dans le cycle cellulaire afin de proliférer et régénérer des cardiomyocytes (9, 48). Toutefois, le cœur de mammifère adulte ne comprend que très peu de cardiomyocytes mononucléés ayant la capacité proliférative, et ce faisant, la régénération cardiaque est un phénomène marginal au niveau du cœur ischémié (9). Ainsi, le remodelage cardiaque post infarctus du myocarde est plutôt associé à la fibrose réparative permettant la formation de la cicatrice cardiaque dans la zone ischémiée, ainsi qu'à l'hypertrophie cardiaque excentrique dans la région intacte du myocarde (Voir Section 1.1.4.2.1) (9). Toutefois, la fibrose réparative peut être entravée et/ou inadéquate, due à une déposition de collagène insuffisante, une réduction de la prolifération des myofibroblastes cardiaques ou à une réponse angiogénique affaiblie (6, 64, 67, 70, 71). Ainsi, un amincissement de la cicatrice, une expansion de la chambre ventriculaire et un remodelage cardiaque néfaste peuvent survenir, et conjointement ces dysfonctionnements peuvent entraîner ultimement une diminution des taux de survie (6, 64, 67, 70, 71). L'hypertrophie cardiaque excentrique, associée avec une augmentation de la longueur des cardiomyocytes, peut quant à elle avoir des effets néfastes lorsque la longueur des

cardiomyocytes dépasse un certain seuil. Les filaments d'actine et de myosine sont trop éloignés pour bien réaliser le processus de contraction, ce qui se traduit cliniquement par une insuffisance cardiaque décompensée associée à des taux réduits de survie. Dans le but de minimiser les impacts délétères de ces mécanismes adaptatifs, une stratégie émergente consiste à identifier de nouvelles sources endogènes et exogènes de cardiomyocytes dans l'optique de remplacer le tissu myocardique lésé par du tissu contractile, pour ainsi réduire les réponses fibrotiques et hypertrophiques (9, 48). Les sources potentielles de cardiomyocytes sont identifiées à la Figure 31 (48, 253).

Il existe plusieurs sources cellulaires endogènes qui contribuent à la régénération *de novo* cardiomyocytes après la naissance (253). Les cardiomyocytes nouvellement formés peuvent provenir d'une sous-population de cardiomyocytes mononucléés qui ont conservé la capacité proliférative, ce qui leur permet de se répliquer (Voir Figure 31) (9, 253). De plus, les cellules souches progénitrices cardiaques dérivées de la moelle osseuse ont elles aussi été identifiées comme étant une source de cardiomyocytes à la suite d'un dommage cardiaque (Voir Figure 31) (253, 254). Également, chez les rongeurs, il a été déterminé que les cellules embryonnaires de l'épicarde peuvent contribuer à la formation de cardiomyocytes (Voir Figure 31) (253, 255). Enfin, des cellules souches progénitrices résidentes cardiaques ont été observées au niveau de cœurs de souris, de rats et d'humains et ces cellules pourraient contribuer à la régénération myocardique via leur aptitude à se différencier en une lignée de cardiomyocytes (Voir Section 1.4.3.2) (6, 9, 19, 20, 253, 256, 257). Cependant, malgré le fait qu'il existe différentes sources endogènes de cardiomyocytes, la régénération myocardique à la suite d'un dommage cardiaque est un phénomène marginal (9, 253).

Afin de palier à cette problématique, une stratégie actuellement à l'étude consiste à reprogrammer des fibroblastes cardiaques en cellules ressemblant à des cardiomyocytes via l'injection d'un cocktail de facteurs de reprogrammation cardiaque (258, 259). Cette stratégie thérapeutique est basée sur le fait que les fibroblastes cardiaques sont abondants dans le myocarde, constituant environ 50% des cellules myocardiques, et que, contrairement aux cardiomyocytes, ils survivent à l'ischémie cardiaque (2-4, 86, 258). La reprogrammation des fibroblastes cardiaques semble donner de bons résultats *in vivo*, puisque l'injection, dans la

Figure 31: Les avenues thérapeutiques émergentes étudiées afin d'améliorer la survie à la suite d'un infarctus du myocarde



De nombreuses sources endogènes et exogènes de cardiomyocytes sont à l'étude dans l'optique de favoriser la régénération des cardiomyocytes, pour ainsi améliorer les taux de survies des patients ayant subi un infarctus du myocarde. (48) *avec la permission d'Elsevier.*

région infarctée du myocarde de souris ayant subi un infarctus du myocarde, de différentes combinaisons de facteurs de reprogrammation et de micro ARN (miR, *micro RNA*) permettent de générer des cellules ressemblant à des cardiomyocytes, ce qui contribue à réduire la taille de la cicatrice et à améliorer la fonction ventriculaire (258-262). Cependant, l'application clinique de cette thérapie de reprogrammation nécessite encore plusieurs études précliniques,

telle la validation chez de plus gros modèles animaux, comme les porcs et les singes (259). De plus, les facteurs permettant la reprogrammation *in vitro* de fibroblastes cardiaques humains en cellules ressemblant à des cardiomyocytes ont été découverts (258, 259, 263, 264). Cependant, une autre limitation de cette approche thérapeutique est que la reprogrammation *in vitro* ne fournit pas l'environnement requis pour que les cardiomyocytes formés soient fonctionnels, alors que la reprogrammation *in vivo* chez la souris est associée avec un microenvironnement cardiaque qui permet la formation de cardiomyocytes matures (258, 259). Puisque les composantes de l'environnement myocardique qui favorise une reprogrammation complète et efficace sont pour l'instant méconnues, nous ne pouvons que spéculer actuellement sur le fait que l'application de cette thérapie de reprogrammation au niveau du myocarde humain fournira, à l'instar de ce qui est observé chez la souris, l'environnement nécessaire à la formation de cardiomyocytes humains fonctionnels (258, 259).

Une autre approche thérapeutique actuellement à l'étude vise à introduire des cellules ayant une très large plasticité au niveau de cœurs endommagés, pour que celles-ci se différencient en un phénotype de cardiomyocyte et qu'elles contribuent à la régénération cardiaque (253). Ainsi, des sources exogènes de cellules pouvant se différencier en cardiomyocytes, tels les cellules souches embryonnaires, les cellules souches pluripotentes, de même que les cellules progénitrices mésenchymateuses, ont été étudiées (Voir Figure 31) (253). Toutefois, l'utilisation thérapeutique de cellules exogènes n'est pour l'instant pas favorisée en raison de l'induction d'une réponse allogénique associée avec la transplantation des cellules pluripotentes non-autologue, ainsi que des débats éthiques entourant l'utilisation des cellules embryonnaires (253). Les thérapies cliniques impliquant des cellules souches mésenchymateuses ont quant à elles été davantage étudiées, puisque ces cellules peuvent être à la fois utilisées lorsqu'elles proviennent d'une origine autologue ou allogénique, dû au fait qu'elles n'induisent que très faiblement une réaction immunitaire lors de leur transplantation (257). Cependant, la thérapie cellulaire cardiaque via les cellules souches mésenchymateuses n'est pas parvenue à démontrer une efficacité certaine, et ce, malgré son effet promoteur sur la régénération cardiaque lors d'études précliniques (257, 265). En effet, cette thérapie utilisée à travers diverses études cliniques a donné lieu à des résultats incohérents sur la condition

cardiaque, à des effets indésirables aux sites d'injection myocardiques, à des difficultés de greffes cellulaires, ainsi qu'à de l'apoptose des cellules de donneurs (257).

Ces considérations ont donc orienté la recherche de la thérapie cellulaire cardiaque sur l'infusion de cellules autologues. Dans un premier temps, l'utilisation des cellules mononucléaires de la moelle osseuse en thérapie cellulaire cardiaque a été étudiée (265-267). Toutefois, cette thérapie n'a pas été efficace à réduire la taille de la cicatrice et les effets sur la fonction ventriculaire étaient variables, donc ces résultats suggèrent que l'infusion de cellules mononucléées de la moelle osseuse n'est pas une thérapie cellulaire optimale pour contribuer à la régénération cardiaque (265-267). Par la suite, des études cliniques de Phase I ont démontré que deux types de cellules souches progénitrices résidentes cardiaques préalablement isolées, puis infusées, contribuent à réduire la taille de la cicatrice cardiaque tout en favorisant la régénération myocardique (9). L'effet thérapeutique d'une infusion de cellules souches cardiaques C-kit<sup>(+)</sup>, qui sont reconnues pour leur importante plasticité et leur capacité à acquérir un phénotype de cardiomyocyte caractérisé par l'expression de facteurs de transcription GATA4 et Nkx2.5, a été mesuré via l'étude SCIPIO (*Stem Cell Infusion in Patients with Ischemic cardiomyopathy*) (9, 268). Pour ce faire, des cellules souches cardiaques C-kit<sup>(+)</sup> ont été isolées, lors d'une chirurgie CABG (*Coronary Artery Bypass Grafting*), au niveau de cœurs de patients souffrant d'insuffisance cardiaque secondaire à un infarctus du myocarde (9, 268). Par la suite, ces cellules ont été mises en culture, puis 4 mois à la suite de la chirurgie CABG, 1 million de cellules C-kit<sup>(+)</sup> autologues ont été infusées au niveau d'une artère coronaire irrigant la zone infarctée (9, 268). Un an à la suite de l'infusion, les cellules C-kit<sup>(+)</sup> ont contribué à la régénération myocardique via une réduction de la taille de la cicatrice et une augmentation de la masse ventriculaire gauche viable (9, 268). De plus, les patients ayant reçu l'infusion de cellules C-kit<sup>(+)</sup> autologue présentaient une amélioration significative de leur fonction ventriculaire gauche, tant régionale que globale (9, 268).

Une autre étude clinique de Phase I, l'étude CADUCEUS (*Cardiosphere-Derived autologous stem Cells to reverse ventricular dysfunction*), a quant à elle mesuré l'effet thérapeutique d'une infusion de cellules dérivées de cardiosphères, qui ont la plasticité requise pour se différencier en une lignée de cardiomyocytes GATA4<sup>(+)</sup>/Nkx2.5<sup>(+)</sup> (9, 265). Lors de

cette étude, les cellules étaient prélevées via une biopsie endomyocardique réalisée dans un délai inférieur à 30 jours suivant la survenue de l'événement ischémique, puis mises en culture (9, 265). De 1.5 à 3 mois suivant la biopsie, soit lorsque les cellules dérivées de cardiosphères étaient formées, les cellules autologues ont été infusées (de 12,5 à 25 millions de cellules) au niveau d'une artère coronaire irrigant la zone infarctée des patients ayant subi l'ischémie cardiaque (9, 265). Cette étude clinique a démontré l'effet thérapeutique des cellules dérivées de cardiosphères à réduire la taille de la cicatrice et à accroître la masse ventriculaire viable en contribuant à la régénération myocardique (9, 265). De plus, cette thérapie cellulaire a permis d'améliorer la contractilité de la région myocardique infusée et d'accroître l'épaississement de la paroi systolique comparativement au groupe contrôle, et donc d'améliorer la fonctionnalité myocardique (265).

En somme, il est démontré cliniquement qu'il est possible de régénérer en partie le myocarde ischémié et cicatrisé via l'infusion de cellules souches progénitrices résidentes cardiaques autologues et qu'il s'agit d'une approche thérapeutique efficace (9). Il est cependant important de garder à l'esprit que ces thérapies innovatrices, tout comme certaines approches pharmacologiques, contribuent à réduire la taille de la cicatrice et non pas à remplacer en totalité le tissu cicatriciel par du tissu myocardique contractile. De plus, parmi la panoplie de stratégies pharmacologiques actuellement utilisées dans le traitement de l'infarctus du myocarde, aucune ne contribue à améliorer la réponse de fibrose réparative. Ainsi, malgré l'existence de thérapies permettant de réduire la taille de la cicatrice cardiaque, il demeure essentiel de bien comprendre les processus impliqués lors de la fibrose réparative, afin de permettre la formation de la meilleure cicatrice possible et alors d'améliorer de manière optimale la fonction ventriculaire et les taux de survie à la suite d'un infarctus du myocarde.



#### **1.1.4 L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE**

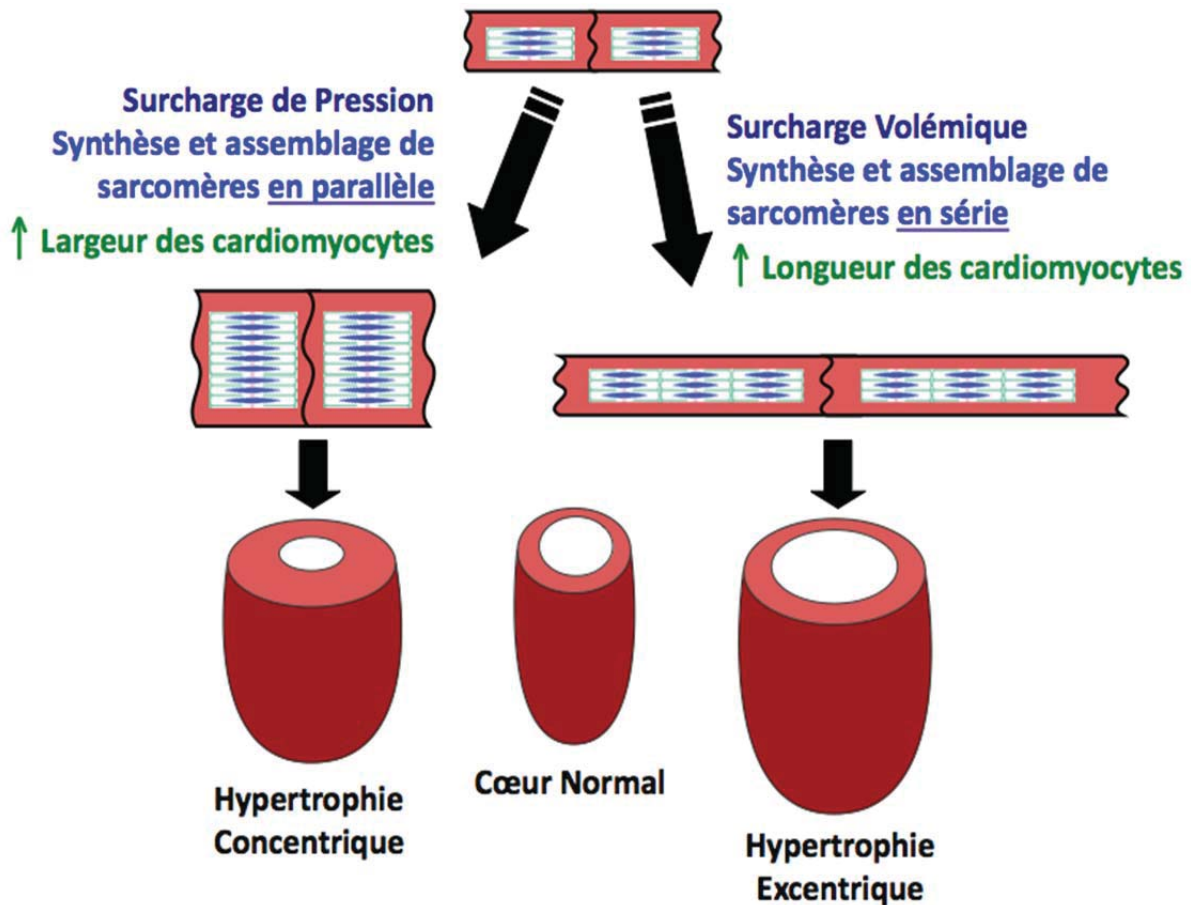
Tout stress hémodynamique aigu, qu'il s'agisse d'une surcharge volémique ou d'une surcharge de pression, a pour conséquence d'initier le mécanisme de Frank-Starling, soit une réponse intrinsèque du cœur qui consiste à modifier la force de contraction afin de normaliser le stress induit sur les parois ventriculaires (9, 269). Cependant, le développement d'un stress hémodynamique progressif ou chronique nécessite quant à lui des modifications structurelles majeures, tant au niveau cellulaire que morphologique, afin de parvenir à maintenir une fonction ventriculaire adéquate (9, 269). Pour ce faire, un processus d'hypertrophie des cardiomyocytes est initié (9, 269). L'hypertrophie des cardiomyocytes implique l'augmentation de la taille des cardiomyocytes de manière individuelle, grâce à la synthèse de nouveaux sarcomères à l'intérieur de chacun des cardiomyocytes (9, 269). L'origine de la surcharge hémodynamique, soit pathologique ou physiologique, a une très grande influence sur l'orientation de l'assemblage des sarcomères, sur la géométrie cardiaque, ainsi que sur la réexpression de certains gènes embryonnaires (9, 269). Voici donc les caractéristiques des différents types d'hypertrophies cardiaques en fonction de leur nature et du type de stress induit sur la paroi.

##### ***1.1.4.1 L'hypertrophie cardiaque physiologique***

L'hypertrophie cardiaque physiologique est principalement attribuable à la réalisation d'un exercice à intensité élevée, mais aussi lors du développement cardiaque suite à la naissance (9, 269). Dans le cas de l'exercice, celui-ci crée une surcharge volémique diastolique intermittente sur la paroi ventriculaire, ce qui initie une synthèse et un assemblage de sarcomère en série et génère alors une hypertrophie cardiaque excentrique associée à une amélioration des performances cardiaques (Voir Figure 32) (9, 269-273). De plus, l'hypertrophie cardiaque physiologique est caractérisée par des taux d'ARNm ventriculaires d'ANP (*Atrial Natriuretic Peptide*) stables ou réduits, et au niveau cellulaire par l'absence de régulation à la hausse des gènes contractiles cardiaques fœtaux et par l'absence de régulation à la baisse du gène SERCA2 (*Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase*), une protéine spécifique au développement adulte (9, 269, 272, 274-276). L'hypertrophie cardiaque

excentrique peut également être induite par des pathologies, mais les motifs moléculaires de l'hypertrophie cardiaque excentrique pathologique et physiologique sont distincts (9, 269).

**Figure 32 : Schématisation de l'hypertrophie cardiaque pathologique excentrique et concentrique, ainsi que de l'hypertrophie cardiaque physiologique excentrique**



L'hypertension artérielle et la sténose aortique sont des pathologies associées à une surcharge chronique de pression. Cela provoque une synthèse *de novo* sarcomères et d'un arrangement de ceux-ci selon un motif en parallèle, ce qui augmente la largeur des cardiomyocytes. Ce faisant, une hypertrophie cardiaque concentrique est induite, où l'on observe une paroi ventriculaire épaissie et une réduction concomitante du diamètre de la chambre ventriculaire. L'infarctus du myocarde et la régurgitation valvulaire mitrale ou aortique sont des pathologies associées à une surcharge volémique chronique. Cela provoque une synthèse *de novo* sarcomères et d'un alignement de ceux-ci selon un motif en série, ce qui augmente la longueur des cardiomyocytes. Ce faisant, une hypertrophie cardiaque excentrique est induite, où l'on observe un élargissement du diamètre de la chambre ventriculaire. La morphologie excentrique est aussi associée à une hypertrophie cardiaque physiologique présente lors de la croissance ou lors d'un exercice à haute intensité. (9) avec la permission d'Elsevier.

### ***1.1.4.2 L'hypertrophie cardiaque pathologique***

#### ***1.1.4.2.1 L'hypertrophie cardiaque pathologique excentrique***

Des pathologies, telles l'infarctus du myocarde, la régurgitation valvulaire mitrale ou aortique, ou encore une fistule artério-veineuse, peuvent donner lieu à une hypertrophie cardiaque excentrique (9, 269). En effet, ces maladies provoquent une surcharge volémique chronique qui entraîne un stress diastolique sur la paroi ventriculaire (9, 269, 277, 278). Cette surcharge volémique initie une synthèse *de novo* de sarcomères ainsi qu'un alignement de ceux-ci selon un motif en série, ce qui augmente la longueur de chacun des cardiomyocytes (Voir Figure 32) (9, 269, 271, 278-280). Ce faisant, une hypertrophie cardiaque excentrique est induite, et cette modification morphologique est associée à un élargissement du diamètre de la chambre ventriculaire (Voir Figure 32) (9, 269). Cet agrandissement de la chambre ventriculaire entraîne à son tour une augmentation modeste du stress systolique sur la paroi ventriculaire, ce qui initie la synthèse de sarcomères et l'arrangement de ceux-ci en un motif en parallèle, afin de normaliser la surcharge de pression (9, 269, 279). Une surcharge volémique chronique mène non seulement à une augmentation du diamètre de la chambre ventriculaire, mais également à un léger épaissement du myocarde ventriculaire secondaire à l'augmentation de stress systolique sur la paroi (9, 269, 279). Toutefois, seul le stress systolique, et non pas le stress diastolique, parvient à être normalisé via le processus d'hypertrophie cardiaque (9, 269, 278, 279).

Chez un modèle de fistule artério-veineuse chirurgical chez le rat, l'augmentation chronique du stress diastolique sur la paroi est associé au niveau moléculaire à une expression accrue d'ARNm de l'ANP (9, 269, 281). Ainsi, les patrons d'expression de l'ANP sont donc constitutivement différents selon le stimulus, physiologique ou pathologique, qui est à l'origine de l'hypertrophie cardiaque excentrique (9, 269). La disparité au niveau moléculaire de ces deux types d'hypertrophies excentriques peut être due à l'intensité et à la durée de la surcharge volémique (9, 269). Toutefois, les conséquences au niveau cellulaire de la fistule artério-veineuse et de l'exercice intense se ressemblent, puisqu'il a été démontré qu'une surcharge volémique chronique n'entraîne pas d'augmentation d'expression d'ARNm des

gènes contractiles cardiaques fœtaux, soit la chaîne lourde  $\beta$  de la myosine et l' $\alpha$ -actine squelettique, et n'est pas non plus associée avec une réduction de l'expression de l'ARNm de SERCA2 (9, 269, 281).

Cependant, il est important de faire une distinction concernant les hypertrophies cardiaques pathologiques excentriques (9). En effet, l'infarctus du myocarde, qui entraîne un stress volémique diastolique chronique sur la paroi ventriculaire et conséquemment une hypertrophie cardiaque pathologique excentrique, provoque également, à l'instar de la fistule artério-veineuse, une expression accrue des peptides natriurétiques (9). Toutefois, à l'inverse de la fistule artério-veineuse, l'infarctus du myocarde induit la réexpression des protéines contractiles cardiaques fœtales, tout en étant associé à une réduction d'expression de la SERCA2, soit le profil moléculaire observé lors d'une hypertrophie cardiaque concentrique secondaire d'une surcharge de pression (9). Donc, l'infarctus du myocarde est un cas particulier où l'hypertrophie cardiaque pathologique est qualifiée d'excentrique impure, c'est-à-dire que le phénotype morphologique correspond au profil d'une hypertrophie excentrique, mais le remodelage cellulaire correspond quant à lui au motif observé lors d'une hypertrophie concentrique (9).

#### ***1.1.4.2.2 L'hypertrophie cardiaque pathologique concentrique***

Des pathologies, telles l'hypertension artérielle (qu'elle soit d'origine pulmonaire ou systémique) et la sténose aortique, peuvent donner lieu à une hypertrophie cardiaque concentrique (9, 269). En effet, ces maladies provoquent une surcharge chronique de pression qui entraîne un stress systolique sur la paroi ventriculaire (9, 269, 278). Cette surcharge de pression initie une synthèse *de novo* de sarcomères ainsi qu'un alignement de ceux-ci selon un motif en parallèle, ce qui augmente la largeur de chacun des cardiomyocytes (Voir Figure 32) (9, 269, 271, 278, 280, 282). Ce faisant, une hypertrophie cardiaque concentrique est induite et cette modification morphologique est associée à un épaissement du myocarde ventriculaire et à une réduction concomitante du diamètre de la chambre ventriculaire (Voir Figure 32) (9, 269). L'hypertrophie cardiaque concentrique parvient à normaliser le stress systolique sur la paroi ventriculaire, et ce mécanisme d'adaptation permet de générer une boucle de rétro-

inhibition afin d'arrêter la synthèse de sarcomères lorsque le stress systolique sur la paroi est normalisé (9, 269, 278, 279).

Chez un modèle de constriction aortique chirurgical chez le rat, la surcharge de pression systolique sur la paroi ventriculaire est associée avec une réexpression de gènes embryonnaires cardiaques (9, 269). Ainsi, l'expression de l'ARNm des gènes contractiles cardiaques fœtaux, tels l'isoforme  $\beta\beta$  de la chaîne lourde de la myosine et l' $\alpha$ -actine squelettique, ainsi que l'expression de l'ARNm de l'ANP et du BNP (*Brain Natriuretic Peptide*) sont régulés à la hausse, alors que l'expression de l'ARNm de la protéine SERCA2 et de l'isoforme  $\alpha\alpha$  de la chaîne lourde de la myosine sont réduits significativement (9, 269, 283-287). Ces résultats témoignent dans un premier temps que l'ANP est réexprimé de manière spécifique lorsque le stimulus de stress est pathologique, et non pas physiologique (9, 269). Dans un deuxième temps, on constate que les profils d'expression de la protéine SERCA2 et des protéines contractiles sont différents chez les deux types d'hypertrophies cardiaques pathologiques, selon l'origine mécanique du stress induit sur la paroi ventriculaire (surcharge volémique ou de pression) (9, 269).

Enfin, l'implication de la plupart des modifications cellulaires et moléculaires observées en situation d'hypertrophie cardiaque pathologique concentrique ont été élucidées. Il a été déterminé que chez le modèle de surcharge de pression systolique sur la paroi, le remodelage ventriculaire cellulaire, consistant à modifier l'isoforme de la chaîne lourde de la myosine, a pour objectif de réduire l'activité ATPase de la myosine (9, 269, 286). Cette réponse adaptative contribue à réduire la contractilité cardiaque, ce qui permet de préserver les réserves d'ATP, malgré une demande d'oxygène et un travail myocardique accru (9, 269, 288). De plus, l'augmentation d'expression d'ANP et de BNP au niveau des cardiomyocytes contribue à réduire la réponse hypertrophique de ces cellules et à diminuer la prolifération des myofibroblastes cardiaques, ce qui limite la réponse fibrotique (9, 269, 289, 290). La réduction d'expression de la pompe SERCA2, associée à l'hypertrophie cardiaque concentrique, a quant à elle des effets délétères en entravant la relaxation myocardique (9, 269, 284, 291). Toutefois, aucune explication révélant les conséquences associées à une modification d'expression de l' $\alpha$ -actine squelettique lors d'une surcharge de pression chronique n'a été proposée (9, 269).

## **1.2 LES POUMONS**

Le système respiratoire participe activement au maintien de l'homéostasie. Ainsi, il permet un apport constant en oxygène sous forme de dioxygène (O<sub>2</sub>), un gaz essentiel aux diverses cellules corporelles pour produire de l'énergie à partir d'un substrat, tout en assurant l'élimination rapide du gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) produit lors de ces réactions et pouvant être toxique à trop haute concentration. Ces échanges gazeux se produisent plus particulièrement à deux endroits, soit dans un premier temps entre l'air atmosphérique et le sang au niveau de la membrane alvéolocapillaire pulmonaire, puis entre les capillaires systémiques et les cellules des organes. La contribution du système respiratoire à l'homéostasie s'étend également à son rôle dans le maintien du pH sanguin, à la filtration de l'air inspiré et à rejeter de la vapeur d'eau et de la chaleur lors de l'expiration (1).

### **1.2.1 PHYSIOLOGIE PULMONAIRE**

L'être humain possède deux poumons. Le poumon droit est constitué de trois lobes, alors que le poumon gauche est constitué de deux lobes. Les poumons sont situés dans la cage thoracique qui permet la protection de ceux-ci. La protection des poumons est également assurée par la plèvre, qui est formée de deux feuillets de séreuse qui tapissent la cage thoracique ou qui enrobe les poumons. Ainsi, la plèvre pariétale est accolée à la paroi de la cavité thoracique, alors que la plèvre viscérale enveloppe directement les poumons (Voir Figure 34). La plèvre est aussi constituée de la cavité pleurale qui contient une sérosité pleurale. Ce liquide est sécrété par la séreuse et est essentiel à la respiration, car il s'agit d'un lubrifiant diminuant la friction entre les deux feuillets et facilitant le glissement de ceux-ci. De plus, la sérosité pleurale est essentielle à l'inspiration, car elle permet de maintenir la tension superficielle qui assure une adhérence entre les deux feuillets de la plèvre (1).

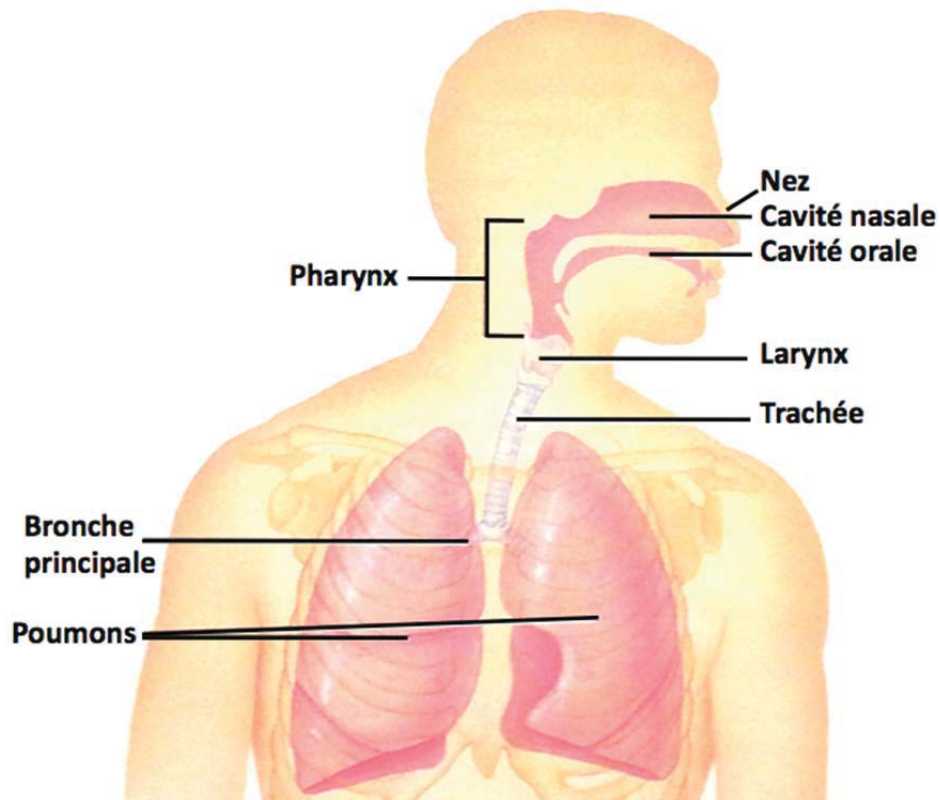
#### ***1.2.1.1 Les zones de conduction et respiratoire du système respiratoire***

Sur un plan fonctionnel, la physiologie du système respiratoire se divise en deux sections bien distinctes, soit la zone de conduction et la zone respiratoire (1, 292). La zone de



conduction du système respiratoire est constituée du nez, du pharynx, du larynx et de l'arbre bronchique (Voir Figures 33 et 34) (1, 292). Cet arbre bronchique constitue les ramifications des voies respiratoires de la zone de conduction. Il débute à la trachée, puis se poursuit dans les bronches principales, les bronches lobaires, les bronches segmentaires, les bronchioles et se termine aux bronchioles terminales (1). Ces structures ont pour fonction d'acheminer l'oxygène inspiré à la zone respiratoire, en plus de filtrer, humidifier et réchauffer cet air inspiré (1, 292). De plus, la partie supérieure du système respiratoire, constituée du nez, du pharynx et de leurs structures associées, possède aussi d'autres fonctions distinctes de son apport à la respiration, soit la phonation et l'olfaction. La zone respiratoire est quant à elle constituée des bronchioles respiratoires, des conduits alvéolaires, des sacs alvéolaires et des alvéoles pulmonaires (Voir Figure 35). Ces structures constituent les unités fonctionnelles pulmonaires et permettent les échanges gazeux entre l'air atmosphérique et le sang désoxygéné en provenance de la circulation systémique via le ventricule droit (1).

**Figure 33 : La zone de conduction du système respiratoire**

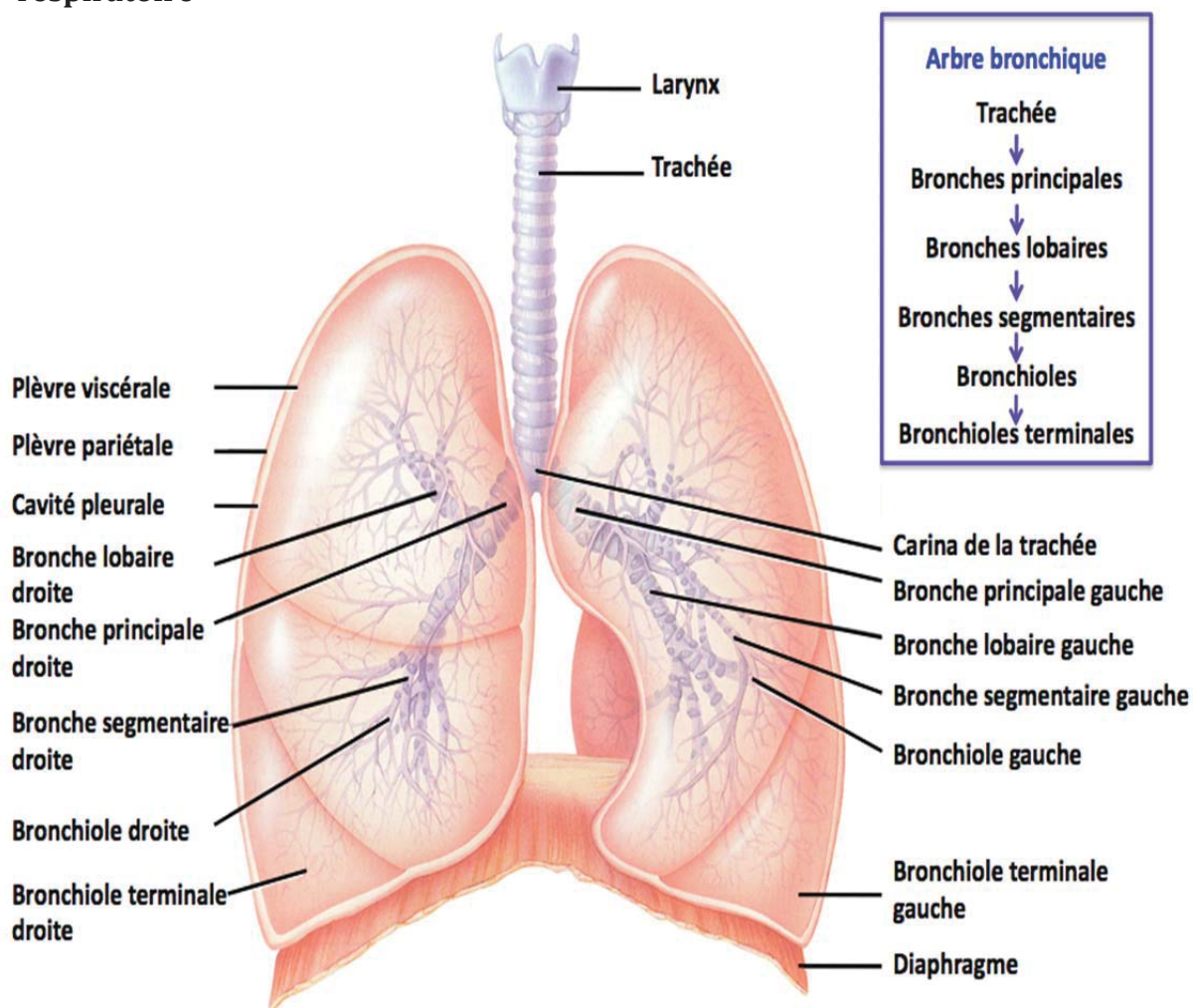


La zone de conduction du système respiratoire est constituée du nez, du pharynx, du larynx, de la trachée et de l'arbre bronchique pulmonaire. (1) avec la permission de Pearson ERPI.

### 1.2.1.1.1 L'arbre bronchique de la zone de conduction du système respiratoire

L'arbre bronchique est constitué de multitudes de ramifications qui débutent où la trachée se subdivise en bronches principales droite et gauche, plus particulièrement au niveau de la *carina* de la trachée (Voir Figure 34). Par la suite, les bronches principales se subdivisent à leur tour en bronches lobaires, à raison d'une bronche par lobe pulmonaire. Ensuite, les bronches lobaires se divisent en bronches segmentaires, qui réduisent alors leur calibre sous forme de bronchioles. De nombreuses ramifications subséquentes donneront naissance aux

**Figure 34 : L'arbre bronchique de la zone de conduction du système respiratoire**



L'arbre bronchique de la zone de conduction du système respiratoire est constitué de la trachée, des bronches principales, des bronches lobaires, des bronches segmentaires, des bronchioles et des bronchioles terminales. (1) avec la permission de Pearson ERPI.

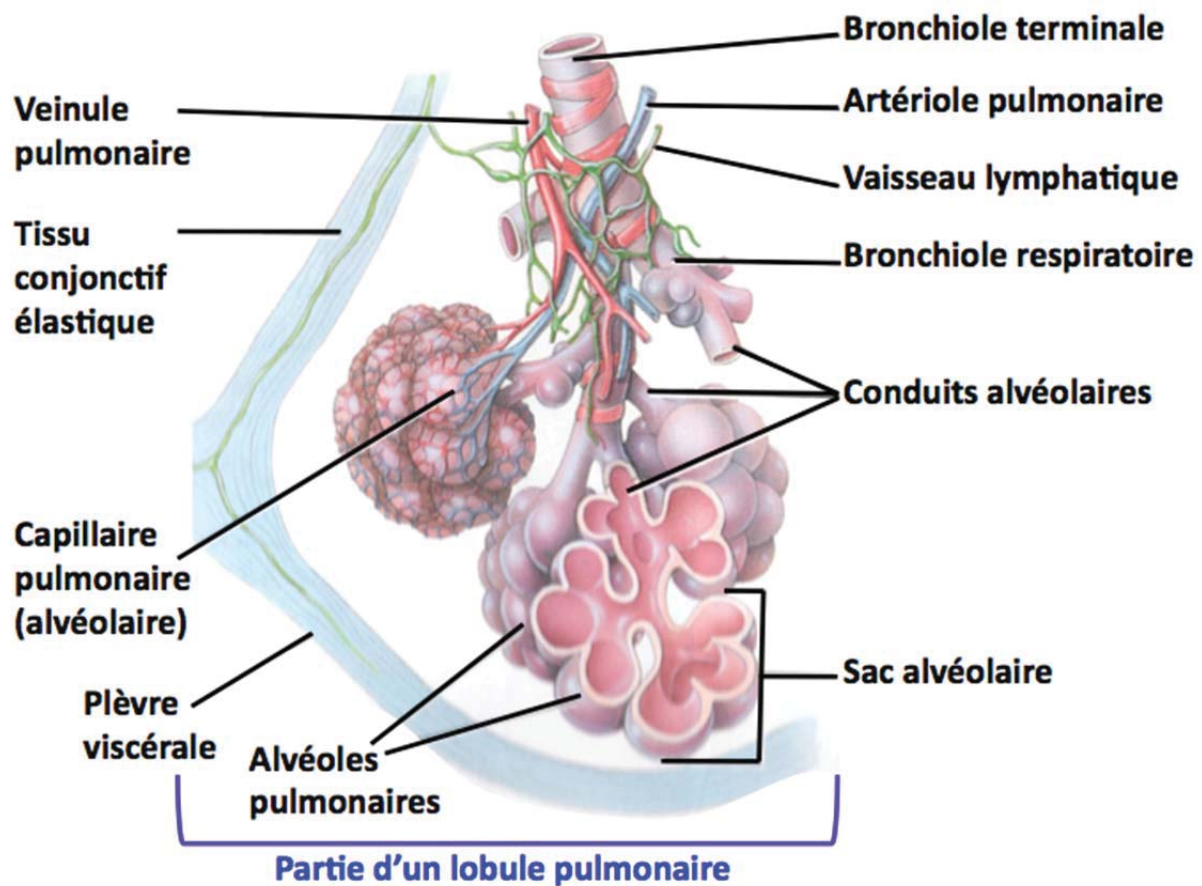
bronchioles terminales. Tout au long des ramifications de l'arbre bronchique, des modifications structurelles surviennent concernant l'épithélium, le cartilage et le tissu musculaire lisse. Ainsi, l'épithélium de la trachée, des bronches principales, lobaires et segmentaires est pseudostratifié prismatique et cilié afin de permettre, via l'action des cils, la sécrétion et la propulsion de mucus qui emprisonne les particules indésirables. Puis, dans les bronchioles de grande dimension, l'épithélium est simple prismatique et cilié, et passe ensuite à simple cubique et cilié au niveau des bronchioles de petite dimension. Cependant, l'épithélium est simple cubique et non cilié dans les bronchioles terminales, ce sont donc des macrophagocytes qui éliminent les particules indésirables à ce niveau dans l'arbre bronchique. Quant au cartilage, celui-ci est sous forme d'anneaux au niveau de la trachée, puis se transforme en anneaux incomplets au niveau des bronches principales. Par la suite, le cartilage se retrouve progressivement sous forme de plaques de cartilage dans les autres bronches et bronchioles, pour finalement être absent des petites bronchioles et des bronchioles terminales. Le tissu musculaire lisse est quant à lui l'élément substituant à la perte de cartilage au niveau des bronchioles et des bronchioles terminales (1).

#### ***1.2.1.1.2 Les lobules et les alvéoles pulmonaires de la zone respiratoire du système respiratoire***

Chacune des bronches segmentaires ventile une partie de tissu pulmonaire qui lui est propre, soit son segment bronchopulmonaire. Un segment bronchopulmonaire est constitué d'une multitude de petits compartiments nommés les lobules pulmonaires. Les lobules pulmonaires sont enveloppés de manière individuelle de tissu conjonctif élastique et contiennent chacun un vaisseau lymphatique, une artériole pulmonaire, une veinule pulmonaire et une bronchiole terminale (Voir Figure 35). Ces bronchioles terminales se ramifient ensuite en bronchioles respiratoires, où l'épithélium simple cubique non cilié laisse progressivement sa place à un épithélium simple pavimenteux favorisant les échanges gazeux (1, 292). Les bronchioles respiratoires se ramifient ensuite en 2 à 11 conduits alvéolaires, qui sont eux-mêmes entourés de sacs alvéolaires formés de deux à trois alvéoles pulmonaires (1). D'ailleurs les poumons d'un homme mature comptent jusqu'à 500 millions d'alvéoles (292, 293). Les alvéoles pulmonaires sont de petites cavités sphériques appuyées sur une mince

membrane basale élastique. La paroi des alvéoles pulmonaires est constituée de deux types d'épithélium : les cellules alvéolaires épithéliales de type I (CAEI), qui constituent la membrane alvéolocapillaire, et les cellules alvéolaires épithéliales de type II (CAEII), qui sécrètent le surfactant et qui sont considérés comme étant les cellules souches épithéliales pulmonaires (Voir Section 1.2.2.1). On y retrouve également les fibroblastes pulmonaires (Voir Section 1.2.2.2), qui produisent de l'ECM, ainsi que des macrophages alvéolaires, qui éliminent les fines particules indésirables présentes dans l'espace alvéolaire (1).

**Figure 35 : La zone respiratoire du système respiratoire**



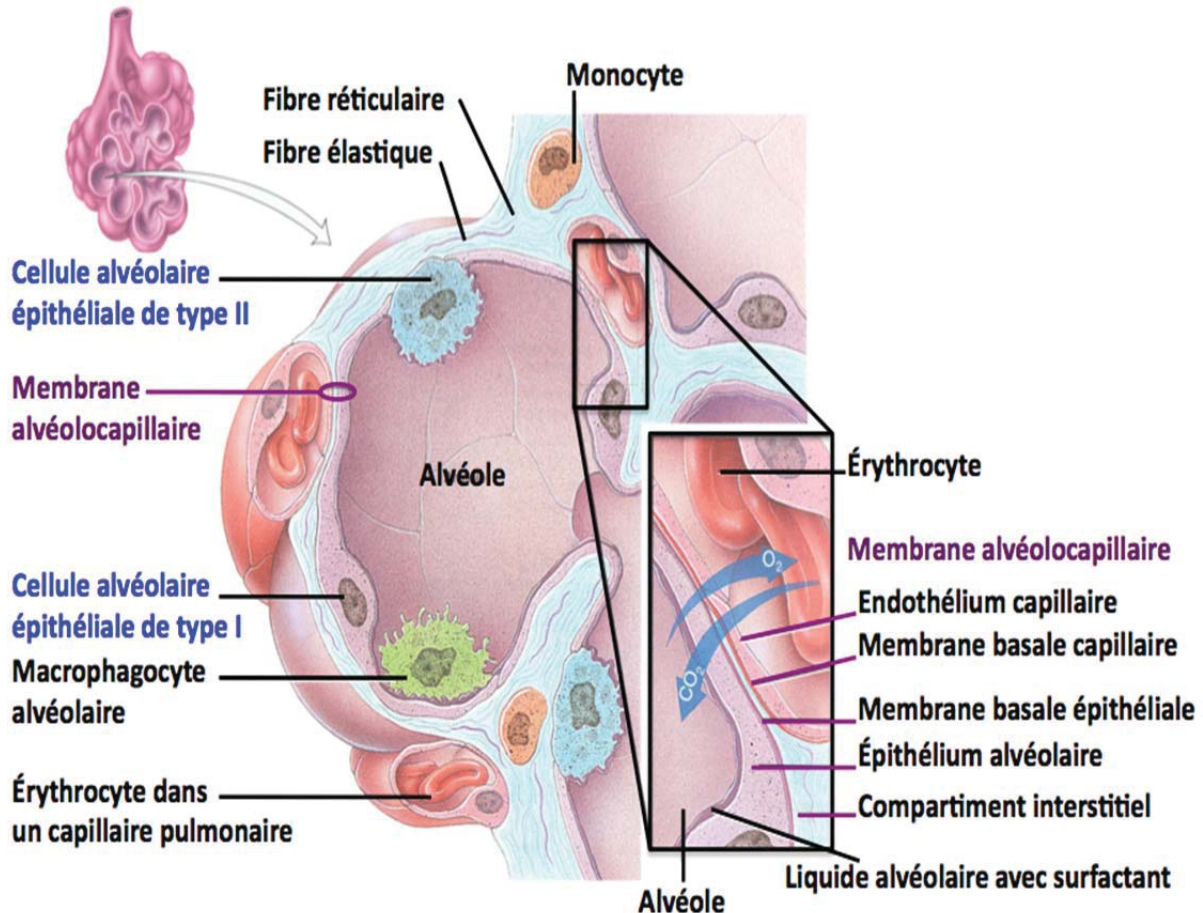
La zone respiratoire débute à la fin d'une bronchiole terminale et est située à l'intérieur d'un lobule pulmonaire. Chaque lobule pulmonaire présente une artériole pulmonaire, qui transporte le sang désoxygéné, une veinule pulmonaire, qui transporte le sang oxygéné, un vaisseau lymphatique et une bronchiole terminale. La zone de respiratoire est constituée des bronchioles respiratoires, des conduits alvéolaires, des sacs alvéolaires et des alvéoles pulmonaires. (1) avec la permission de Pearson ERPI.



### 1.2.1.1.3 Les échanges gazeux pulmonaires se font au niveau de la membrane alvéolocapillaire en fonction de la pression partielle de chacun des gaz

La membrane alvéolocapillaire est le lieu où les échanges gazeux de dioxygène et de dioxyde de carbone s'effectuent (Voir Figure 36). Physiologiquement, la raison de ces échanges consiste à faire parvenir de l'oxygène de l'air atmosphérique/alvéolaire à travers la membrane alvéolocapillaire jusqu'au sang des capillaires pulmonaires. De cette façon, l'oxygène est acheminé via la circulation systémique jusqu'aux cellules des organes qui utilisent l'oxygène et des substrats pour produire de l'énergie. Cependant, ces réactions produisent également en parallèle du dioxyde de carbone qui doit être éliminé, afin d'éviter

**Figure 36 : Constituants d'une alvéole et de la membrane alvéolocapillaire**



L'alvéole présente des cellules alvéolaires épithéliales de type I et de type II, ainsi que des macrophagocytes et des fibroblastes alvéolaires. La membrane alvéolocapillaire est constituée d'un endothélium capillaire, de la membrane basale capillaire, d'un compartiment interstitiel, de la membrane basale épithéliale et de l'épithélium alvéolaire d'une cellule alvéolaire épithéliale de type I. (1) avec la permission de Pearson ERPI.

une toxicité cellulaire. Ainsi, le dioxyde de carbone diffuse des cellules vers les capillaires systémiques pour rejoindre la circulation pulmonaire. Il diffuse ensuite des capillaires pulmonaires vers les alvéoles pulmonaires au niveau de la membrane alvéolocapillaire pour permettre son élimination en étant rejeté dans l'air expiré. Il est à noter que de manière exceptionnelle, les artérioles pulmonaires permettent le transport de sang désoxygéné, alors que les veinules pulmonaires transportent le sang oxygéné (1).

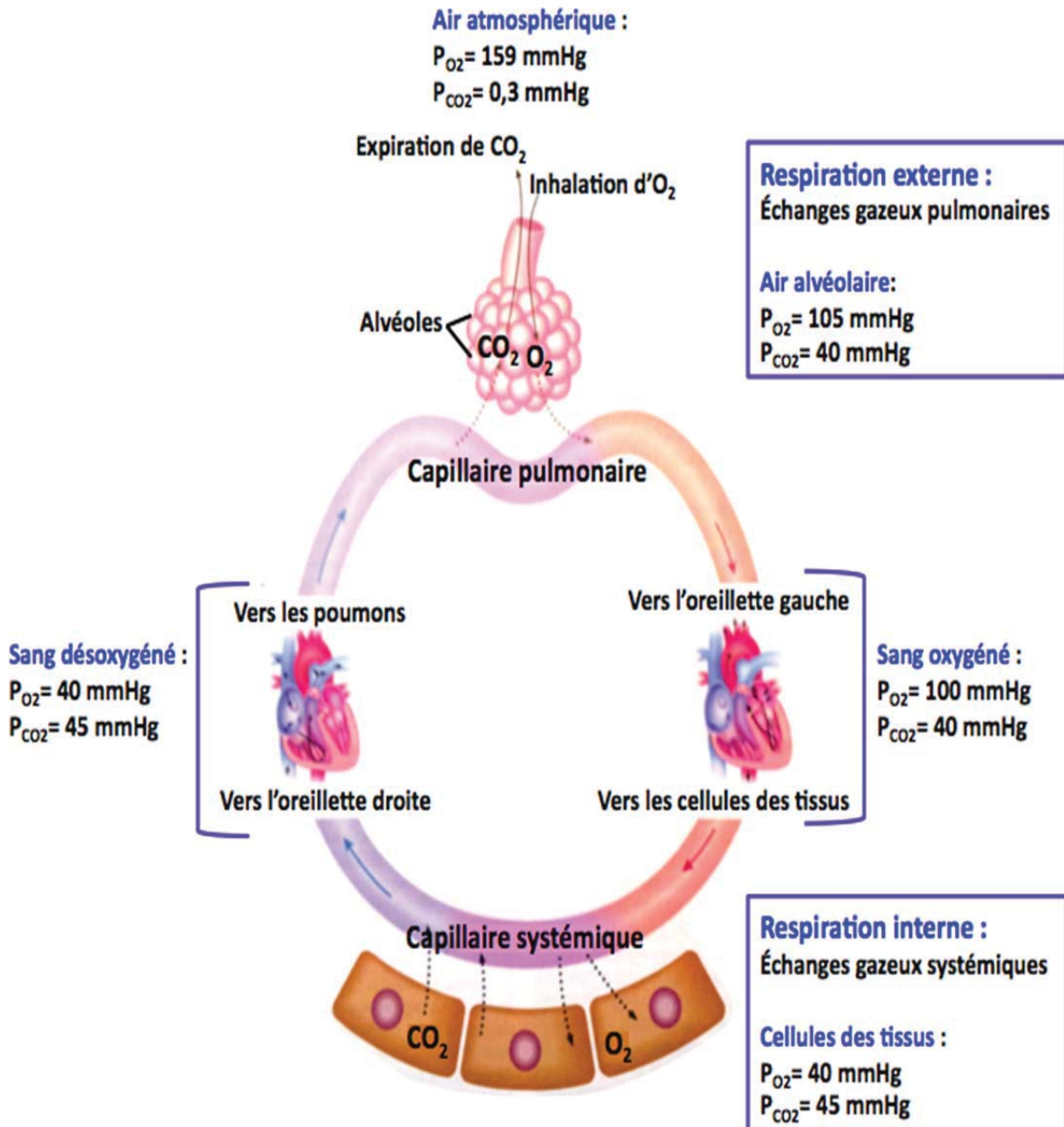
La membrane alvéolocapillaire possède des caractéristiques bien particulières pour favoriser l'échange des gaz. En effet, les CAEI ont un épithélium simple pavimenteux, et donc très mince, pour faciliter la diffusion passive des gaz des alvéoles vers les capillaires. Cette couche épithéliale repose sur une membrane basale épithéliale élastique qui entre en contact avec un compartiment interstitiel très mince (Voir Figure 36). De plus, à la surface externe des alvéoles se présentent les ramifications des artérioles pulmonaires et des veinules pulmonaires en capillaires sanguins pulmonaires. Ces capillaires pulmonaires ne présentent qu'une simple couche de cellules endothéliales et une membrane basale qui entre en contact avec le compartiment interstitiel. Ainsi, malgré le fait que la membrane alvéolocapillaire présente quatre couches, celle-ci demeure tout de même très mince, puisque son épaisseur totale n'est que de  $0,5\mu\text{m}$ , soit uniquement le 16<sup>ième</sup> du diamètre d'un globule rouge qui transporte l'oxygène et le dioxyde de carbone (1, 293). De cette façon, la distance de diffusion des gaz est réduite, augmentant la vitesse de diffusion de l'oxygène et du dioxyde de carbone. Cependant, le liquide alvéolaire (Voir Sections 1.2.1.2.1 et 1.2.2.1.3.1) peut modifier la distance de diffusion des gaz au niveau de la membrane alvéolocapillaire (1).

Le phénomène des échanges gazeux  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  s'effectue en respectant la loi des pressions partielles des gaz. Donc, concrètement, il n'y a pas un échange entre dioxygène et dioxyde de carbone, on constate plutôt que chacun des gaz diffuse de manière indépendante, et ce, des régions où leur pression est élevée vers la région où leur pression est plus faible. Par exemple, le dioxygène ( $\text{O}_2$ ) en provenance de l'air atmosphérique pourra se rendre jusqu'aux alvéoles pulmonaires lors de l'inspiration, car sa pression partielle est de 159 mmHg ( $\text{P}_{\text{O}_2}$ ) au niveau de l'air atmosphérique, alors qu'elle n'est que de 105 mmHg au niveau de l'air alvéolaire (Voir Figure 37). De plus, la diffusion du dioxygène des alvéoles vers les capillaires



pulmonaires sera possible au niveau de la membrane alvéolocapillaire, car sa pression partielle (105 mmHg) est supérieure à sa pression partielle au niveau du sang désoxygéné présent dans les capillaires pulmonaires (40 mmHg). Le sang désoxygéné pourra quant à lui rejeter le

**Figure 37 : L'oxygène et le dioxyde de carbone suivent leurs variations de pressions partielles lors de la respiration externe et interne**



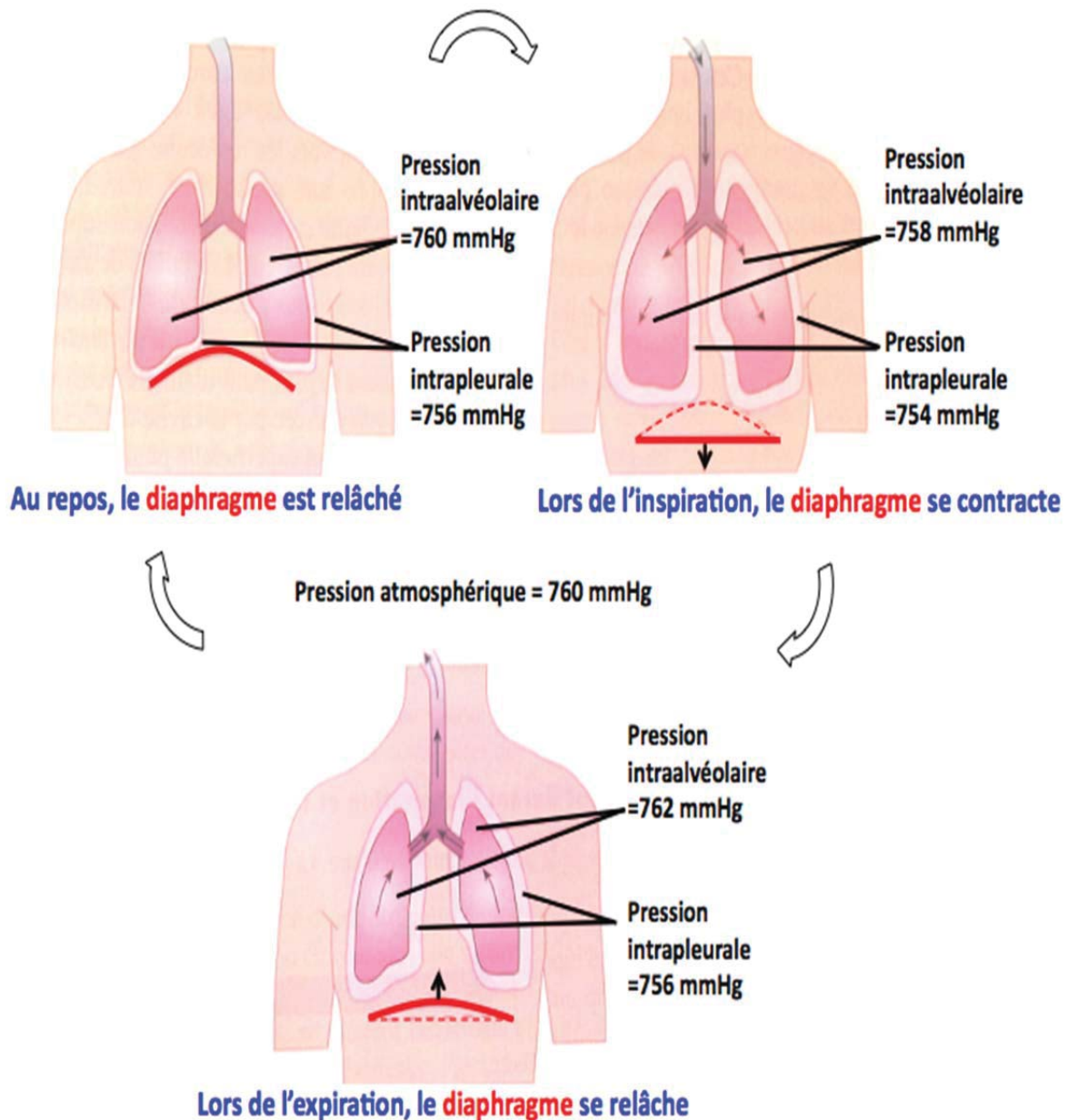
Les gaz, soit l'oxygène ( $O_2$ ) et le dioxyde de carbone ( $CO_2$ ), diffusent des régions où leur pression partielle est la plus élevée vers la zone où elle est plus faible. Ces diffusions permettent la respiration externe, entre les alvéoles et les capillaires pulmonaires, et la respiration interne, entre les capillaires systémiques et les cellules de l'organisme. (1) avec la permission de Pearson ERPI.

dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) dans l'air expiré, car sa pression partielle ( $P_{\text{CO}_2}$ ) est de 45 mmHg dans le sang désoxygéné, alors qu'elle est de 40 mmHg au niveau de l'air alvéolaire et de 0,3 mmHg dans l'air atmosphérique (Voir Figure 37). Ainsi, le  $\text{CO}_2$  suivra constamment son propre gradient de pression en quittant le sang désoxygéné des capillaires pulmonaires pour diffuser à travers la membrane alvéolocapillaire vers les alvéoles pulmonaires, pour ensuite être expiré vers l'air atmosphérique. Une fois réoxygéné, le sang quitte la circulation pulmonaire via le ventricule gauche pour atteindre la circulation systémique. L'oxygène et le dioxyde de carbone suivent alors leur gradient de pression respectif lors de la respiration interne au niveau des cellules des tissus. Ainsi, l' $\text{O}_2$  passe des capillaires systémiques ( $P_{\text{O}_2} = 100$  mmHg) vers les cellules ( $P_{\text{O}_2} = 40$  mmHg) afin de contribuer à la production d'énergie à partir d'un substrat. Alors que le  $\text{CO}_2$ , produit à titre de déchet lors de ces réactions, quittera les cellules ( $P_{\text{CO}_2} = 45$  mmHg) pour rejoindre le sang oxygéné présent dans les capillaires systémiques ( $P_{\text{CO}_2} = 40$  mmHg) et ultimement le ventricule droit et les poumons pour recommencer le cycle (Voir Figure 37). Évidemment, plus les différences de pressions partielles d'un gaz sont grandes, plus la vitesse de diffusion de ce gaz est élevée (1).

### ***1.2.1.2 La ventilation pulmonaire***

En plus de la différence de pressions partielles de l'oxygène entre l'air atmosphérique et l'air alvéolaire, les variations de pressions présentes lors de la ventilation pulmonaire influencent l'arrivée de l'oxygène au niveau des alvéoles lors de l'inspiration. En effet, la contraction des muscles inspiratoires, soit le diaphragme et les muscles intercostaux externes, permet l'augmentation du volume de la cage thoracique et conséquemment la diminution de la pression intrapleurale passant de 756 mmHg au repos, à 754 mmHg lors de l'inspiration (Voir Figure 38). La pression intrapleurale est la pression du liquide de la cavité pleurale située entre les deux feuillets de plèvre qui assure un lien entre la cage thoracique et les poumons (Voir Figure 34). Cette pression intrapleurale demeure en tout temps négative par rapport à la pression intraalvéolaire. Ainsi, lorsque la pression intrapleurale diminue, cela permet la dilatation des poumons et conséquemment une augmentation du volume intraalvéolaire. Donc, suivant la loi de Boyle-Mariotte, une augmentation de volume intraalvéolaire induit nécessairement une diminution de la pression intraalvéolaire. La pression intraalvéolaire passe ainsi de 760 mmHg au repos, à 758 mmHg lors de l'inspiration (Voir Figure 38). Puisque cette pression alvéolaire est désormais en deçà de la pression atmosphérique (760 mmHg), alors un mouvement de l'air est induit en direction des alvéoles, soit vers la plus basse pression. Il en va de même lors de l'expiration. Ainsi, en plus des différences de pression partielles du dioxyde de carbone, la sortie de CO<sub>2</sub> dans l'air expiré sera permise dû au relâchement du diaphragme et des muscles intercostaux externes, provoquant une réduction du volume de la cavité thoracique et alors une augmentation de la pression intrapleurale qui passe alors de 754 mmHg à 756 mmHg. Cela permet la rétraction passive des poumons, donc la diminution du volume intraalvéolaire, et alors l'augmentation de pression intraalvéolaire à 762 mmHg, soit au-delà de la pression atmosphérique de 760 mmHg (Voir Figure 38). Ce faisant, les différences de pressions induisent un mouvement de l'air vers l'atmosphère lors de l'expiration (1).

Figure 38 : Schématisation de la ventilation pulmonaire



Les variations de pression permettent la ventilation pulmonaire. Lors de l'inspiration, la contraction du diaphragme et des muscles intercostaux externes contribue à augmenter le volume de la cavité thoracique. Il y a alors diminution des pressions intraalvéolaire et intrapleurale, permettant le mouvement de l'air vers les poumons. Lors de l'expiration, le relâchement des muscles inspiratoires induit une diminution du volume de la cage thoracique et une augmentation des pressions intraalvéolaire et intrapleurale, contribuant à l'expulsion de l'air par les poumons. (1) avec la permission de Pearson ERPI.

La ventilation pulmonaire est elle-même influencée par divers facteurs, soit la tension superficielle du liquide alvéolaire, la compliance pulmonaire, ainsi que la résistance des conduits aériens, qui conjointement déterminent la vitesse d'écoulement de l'air lors de l'inspiration et de l'expiration (1).

#### ***1.2.1.2.1 La tension superficielle du liquide alvéolaire affecte la ventilation pulmonaire***

Le liquide alvéolaire recouvre en une mince couche la face de la lumière des alvéoles afin d'humidifier les parois des alvéoles qui sont en contact direct avec l'air. Cependant, la forte polarité des molécules d'eau présentes dans ce liquide induit une tension de surface importante et conséquemment une force dirigée vers l'intérieur qui pousse les alvéoles à se collapsier lors de l'expiration (1, 293, 294). Afin d'éviter ce phénomène délétère, les CAEII (Voir Section 1.2.2.1.2) produisent du surfactant (Voir Section 1.2.2.1.2.1), soit un mélange de phospholipides et de lipoprotéines qui permet d'abaisser la tension superficielle du liquide alvéolaire (1, 292-294). En effet, ces constituantes permettent d'abaisser la tension de surface en deçà de celle de l'eau, puisqu'elles diminuent la polarité du liquide alvéolaire. En somme, plus la tension superficielle du liquide alvéolaire est abaissée via le surfactant, meilleure est la ventilation pulmonaire (1, 294). D'ailleurs, le syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né est caractérisé par un manque de production de surfactant. Ce manque augmente alors la tension superficielle du liquide alvéolaire, provoquant alors l'affaissement et la fermeture d'alvéoles lors de l'expiration, entraînant une grande difficulté respiratoire (1, 294).

#### ***1.2.1.2.2 La compliance pulmonaire influence la ventilation pulmonaire***

La compliance pulmonaire détermine la capacité des poumons à l'étirement. Ainsi, plus les poumons sont aptes à bien se dilater, meilleure est la compliance pulmonaire et conséquemment, meilleure est la ventilation pulmonaire. Normalement, chez un individu sain, la compliance pulmonaire est bonne, puisque les poumons présentent des fibres élastiques en quantité suffisante pour conférer une très bonne élasticité pulmonaire et présentent également du surfactant qui réduit la tension superficielle du liquide alvéolaire. De cette façon, toute pathologie entraînant la formation de tissu cicatriciel, diminuant la production de surfactant ou

diminuant l'effet du surfactant en augmentant la quantité de liquide alvéolaire, a pour conséquence de diminuer la compliance pulmonaire et ainsi d'entraver la ventilation pulmonaire. Par exemple, un modèle d'hypertension pulmonaire secondaire à l'induction chirurgicale d'un infarctus du myocarde chez le rat est caractérisé par un remodelage pulmonaire important et une déposition de collagène au niveau des cloisons alvéolaires (295-297). Chez ce modèle, il y a absence d'œdème pulmonaire, une importante réduction de la compliance pulmonaire, ainsi qu'un abaissement de la courbe respiratoire pression-volume, ce qui témoigne d'un syndrome respiratoire restrictif et d'une altération de la capacité respiratoire de ces rats (295-297).

#### ***1.2.1.2.3 La résistance des conduits aériens a un impact sur la ventilation pulmonaire***

La ventilation pulmonaire dépend nécessairement de la vitesse d'écoulement de l'air dans les conduits aériens. Or cette dernière est quant à elle caractérisée par la différence de pression entre l'air atmosphérique et l'air alvéolaire, le tout divisé par la résistance des conduits aériens. Ce faisant, la vitesse d'écoulement de l'air est élevée lorsque la différence de pression est grande et/ou que la résistance est faible. Évidemment, les bronches de petit calibre, tel que les bronchioles, offrent une plus grande résistance que les bronches de plus grand calibre. Cependant, le diamètre des bronchioles résulte également du degré de contraction ou de relaxation des CML entourant la couche de cellules épithéliales bronchiques. Par exemple, chez les personnes atteintes d'asthme, l'inflammation chronique des voies aériennes provoque une constriction des CML, ce qui augmente la résistance et conséquemment diminue la ventilation pulmonaire chez les patients atteints (1).



## **1.2.2 TYPES CELLULAIRES PRÉSENTS AU NIVEAU DES ALVÉOLES PULMONAIRES**

Les alvéoles pulmonaires sont le lieu de la respiration externe qui permet de réoxygéner le sang tout en le débarrassant du surplus de dioxyde de carbone. Afin que ces échanges soient efficaces, différents types cellulaires ayant des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles distinctes sont présents au sein des alvéoles (Voir Figure 36) (292). Ainsi, les alvéoles sont constituées des CAEI, des CAEII et des fibroblastes pulmonaires.

### ***1.2.2.1 Les cellules alvéolaires épithéliales***

#### ***1.2.2.1.1 Les cellules alvéolaires épithéliales de type I***

Les CAEI sont des cellules simples pavimenteuses, et donc très mince, ce qui favorise les échanges  $O_2/CO_2$  au niveau de la membrane alvéolocapillaire (1, 292, 293, 298, 299). D'ailleurs, parfois leurs extensions cytoplasmiques ne sont que de 50 nm d'épaisseur (298). Les CAEI, ou pneumocytes de type I, ont un diamètre de 50 à 100  $\mu m$  (1, 292, 298). Ainsi, les CAEI couvrent 95% de la surface interne des alvéoles et assurent ainsi une surface de diffusion très grande d'environ  $70m^2$  chez l'homme adulte, ce qui contribue à l'échange d'environ 12 000 litres d'air par jour (1, 292, 293, 298). Cette très grande superficie disponible pour les échanges gazeux favorise également une bonne vitesse de diffusion des gaz (1). Cependant, les CAEI nécessitent d'être remplacées à l'occasion en raison de leur grande sensibilité au stress oxydatif ainsi qu'aux dommages pouvant être induits par des particules indésirables toxiques (299). De plus, les pneumocytes de type I expriment fortement la protéine aquaporine 5, un canal d'eau spécifique à ce type cellulaire et permettant le transport de l'eau à travers l'épithélium alvéolaire (298-301) (Voir Figure 39). Via la présence de ce canal à leur membrane apicale, les CAEI possèdent la plus grande perméabilité hydrique parmi tout type cellulaire de mammifère (292, 298, 300). De manière spécifique, les aquaporines 5 des CAEI et les aquaporines 1 des cellules endothéliales des capillaires pulmonaires contribuent à la majeure partie du transport osmotique hydrique à travers la membrane alvéolocapillaire (301). Ainsi, la délétion de l'expression de l'aquaporine 5 réduit

de 10 fois la perméabilité osmotique à l'eau au niveau de la membrane alvéolocapillaire (301-303). Néanmoins, une délétion de l'expression des aquaporines n'a pas d'impact sur la clairance du liquide alvéolaire (301, 302). La clairance du liquide alvéolaire est plutôt dépendante des voies paracellulaires ou encore d'autres canaux aqueux transcellulaires (302).

#### ***1.2.2.1.2 Les cellules alvéolaires épithéliales de type II***

Les CAEII, ou pneumocytes de type II, sont des cellules cuboïdes recouvertes de microvillosités à leur surface apicale et qui présentent des corps lamellaires cytoplasmiques. (1, 293, 294, 298). Les CAEII sont de petit diamètre, soit environ 10µm, ainsi elles ne recouvrent qu'environ 5% de la surface interne des alvéoles (292, 293, 298). Malgré le fait que les CAEI couvrent pratiquement uniformément la surface des alvéoles, les CAEII sont retrouvées en nombre pratiquement égale, et ce, de manière intercalée entre les CAEI (293). Une des fonctions reconnues des pneumocytes de type II est son potentiel à titre de cellule souche, ce qui permet aux CAEII de participer au développement pulmonaire ainsi qu'à la réparation à la suite de lésions (292-294). En effet, les CAEII ont la capacité de réintégrer le cycle cellulaire et de se diviser (293). Les CAEII sont donc des cellules progénitrices possédant une grande plasticité et qui ont la capacité de s'auto-renouveler pour former de nouvelles CAEII en plus d'être aptes à se transdifférencier en CAEI pour remplacer les cellules lésées (292, 293, 299, 304). Pour ce faire, les pneumocytes de type II se transdifférencient d'abord en un phénotype intermédiaire où les cellules perdent leur caractère prolifératif, sont dépourvues de corps lamellaires, augmentent graduellement leur surface et leur volume cellulaire afin d'arborer une forme aplatie avec un noyau central (293). Enfin, ces cellules vont progressivement exprimer les marqueurs phénotypiques spécifiques des CAEI, soit l'aquaporine 5 et la podoplanine (293). Toutefois, il est à noter que les CAEII ne sont pas les seules cellules souches présentes au niveau alvéolaire. Les cellules souches bronchoalvéolaires résidentes de la jonction du conduit bronchoalvéolaire peuvent être elles aussi une source de CAEI et CAEII dû à leur phénotype de cellules progénitrices (293). De plus, les CAEII sont reconnues pour leur rôle consistant à produire, sécréter et recycler le surfactant, une composante essentielle qui diminue la tension de surface du liquide alvéolaire (1, 292-294, 298, 299).

### 1.2.2.1.2.1 Le surfactant

Le surfactant produit par les CAEII est essentiel à la fonction respiratoire (1, 293, 294, 298, 299). Il s'agit d'un mélange complexe formé de 90% de lipides, dont les principaux sont les phospholipides, tel la phosphatidylcholine et le phosphatidylglycérol, auxquels sont associées des protéines (293, 294). Les constituants lipidiques ainsi que les quatre composés protéiques principaux qui forment le surfactant, nommés SP-A (*Surfactant Protein-A*), SP-B, SP-C et SP-D, sont synthétisés par les CAEII, puis ils sont stockés dans de larges corps lamellaires intracellulaires des CAEII avant d'être sécrétés dans le liquide alvéolaire (292-294). Les quatre protéines du surfactant sont différentes, tant en structure qu'en fonction, et contribuent ensemble à la régulation de la fonction, du métabolisme et à la structure du surfactant, en plus de participer à la défense innée de l'hôte contre divers agents pathogènes pulmonaires (293, 294). Les combinaisons de protéines et de lipides détermineront la structure du surfactant qui se retrouve ainsi sous diverses formes physiques au sein du liquide alvéolaire, tel que de manière très abondante sous forme de myéline tubulaire hautement ordonnée ou encore sous forme de petites vésicules lipoprotéiques (294). Évidemment, les forces générées par la ventilation pulmonaire, ainsi que les procédés de consommation ou de dégradation du surfactant, peuvent avoir des conséquences importantes sur la structure du surfactant (294). D'ailleurs, afin de maintenir l'homéostasie alvéolaire, le surfactant est constamment recyclé par les CAEII, en plus d'être catabolisé par les macrophagocytes pulmonaires présents au sein des alvéoles (293, 294).

Les SP-B et SP-C sont des protéines hydrophobes de bas poids moléculaire et ont pour fonction d'accroître l'effet de réduction de la tension superficielle induit par les lipides (293, 294). Pour ce faire, les SP-B et SP-C interagissent étroitement avec les lipides du surfactant en modifiant l'emballage et l'étalement lipidique, en plus de contribuer à la stabilisation des couches lipidiques lors de la ventilation pulmonaire (294). Les SP-A et SP-D sont quant à eux de larges protéines hydrophiles oligomériques du surfactant dont la structure est comparable à celle de la famille des collectines (*collagen-containing C-type lectine*) (293, 294). Ils ont cependant des fonctions distinctes. Ainsi, le SP-A n'a pas d'effet sur la tension de surface ni sur le métabolisme du surfactant, mais contribue plutôt à la formation de myéline tubulaire et à

la défense innée de l'hôte en favorisant la clairance de pathogènes bactériens pulmonaires (293, 294). Quant à lui, le SP-D influence la structure du surfactant, régule les réserves et la recapture de surfactant, contribue à la suppression de l'inflammation pulmonaire en plus d'agir dans la défense innée de l'hôte en contrôlant les pathogènes viraux, fongiques et bactériens (293, 294). Enfin, certaines mutations génétiques des SP-A, SP-B et SP-C ont pour conséquence l'induction de graves pathologies pulmonaires, tel le syndrome aigu de détresse respiratoire du nourrisson ainsi que la maladie pulmonaire interstitielle (294).

#### ***1.2.2.1.3 Les fonctions supplémentaires des CAE***

En plus d'assurer leurs fonctions principales respectives, les CAE sont également impliquées à différents niveaux à la protection de l'organisme et au maintien de l'homéostasie du liquide alvéolaire. Ainsi, l'épithélium alvéolaire constitue plus de 99% des surfaces d'échanges internes au niveau pulmonaire, ce qui permet la réabsorption de fluides et l'échange des gaz (293, 298).

##### **1.2.2.1.3.1 Le transport d'ions et de fluides pour assurer le maintien de l'homéostasie du liquide alvéolaire**

Les CAE ont un rôle fondamental dans l'homéostasie du liquide alvéolaire (293, 298, 299). Ce liquide alvéolaire recouvre en totalité l'épithélium alvéolaire et est attribuable à une infiltration de liquide dû à un gradient de pression créé entre l'espace aérien des alvéoles et les capillaires sanguins (292, 293). Cependant, afin que la diffusion des gaz soit optimale au niveau de la membrane alvéolocapillaire, la couche de fluide alvéolaire doit demeurer suffisamment mince, soit d'environ  $0,2\mu\text{m}$ , et la quantité de liquide doit être contrôlée (298). De cette façon, la distance de diffusion des gaz est optimale, car elle est réduite le plus possible, tout en permettant aux alvéoles de conserver un certain degré d'humidité (292, 298). L'homéostasie du liquide alvéolaire a pour objectif de limiter la diffusion aqueuse dans l'espace aérien alvéolaire et est maintenue de deux manières (292, 293). Tout d'abord, des jonctions serrées font un joint continu entre les membranes apicales des CAE, ce qui permet de contrôler le passage paracellulaire de molécules (292, 293). De plus, des canaux ioniques

sont présents à la membrane apicale des CAE, alors que des pompes et des co-transporteurs sont présents à la membrane basale (Voir Figure 39) (292, 293). Ceux-ci transportent des cations et/ou des anions, ce qui crée un gradient osmotique qui contribue à la réabsorption du liquide alvéolaire et permet ainsi d'éviter la formation d'œdème au niveau du tissu pulmonaire sain (292, 298, 305, 306). La clairance du liquide alvéolaire est principalement induite via le transport actif de sodium ( $\text{Na}^+$ ) et de manière secondaire par l'absorption de chlore ( $\text{Cl}^-$ ) (306). Le transport de  $\text{Na}^+$  transcellulaire est fait au niveau de la membrane basale des CAE par la pompe NaK-ATPase (Sodium-Potassium Adénosine Triphosphatase) et via les canaux  $\text{Na}^+$  présents à la membrane apicale (Voir Figure 39) (298, 305). Les principaux canaux  $\text{Na}^+$  des 2 types de CAE sont les canaux ENaC (*Epithelial  $\text{Na}^+$  Channel*) qui comprennent des canaux  $\text{Na}^+$  hautement sélectifs (HSC, *Highly Selective  $\text{Na}^+$  Channel*) et des canaux non-sélectifs au  $\text{Na}^+$  (NSC, *Non-Selective  $\text{Na}^+$  Channel*) (Voir Figure 39) (292, 298). Également, la membrane apicale des CAE présente des canaux liant des nucléotides cycliques (CNG, *Cyclic Nucleotide-Gated channel*) qui transportent le  $\text{Na}^+$  (298). Une multitude de canaux transporteurs de potassium ( $\text{K}^+$ ) ont aussi été détectés à la membrane apicale des CAE, et ce, afin de permettre la sortie de  $\text{K}^+$  à la lumière alvéolaire qui provient de la pompe NaK-ATPase (à la membrane basale), tout en assurant le maintien du potentiel membranaire et du liquide alvéolaire (292, 293, 298). Enfin, les CAE possèdent aussi des canaux transporteurs de  $\text{Cl}^-$  à leur membrane apicale afin de conserver une neutralité des charges, tels les CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Receptor*), les  $\text{GABA}_A$  (*Ionotropic  $\gamma$ -aminobutyric acid type A*) et les  $\text{ClC5/ClC2}$ , soit des canaux  $\text{Cl}^-$  voltages dépendants (292, 298). Néanmoins, l'action de l'ensemble des transporteurs crée un transport ionique net en direction du liquide interstitiel, qui induit un gradient osmotique et favorise ainsi la réabsorption d'eau du liquide alvéolaire via la voie transcellulaire (aquaporines 5) et via la voie paracellulaire (298, 302).

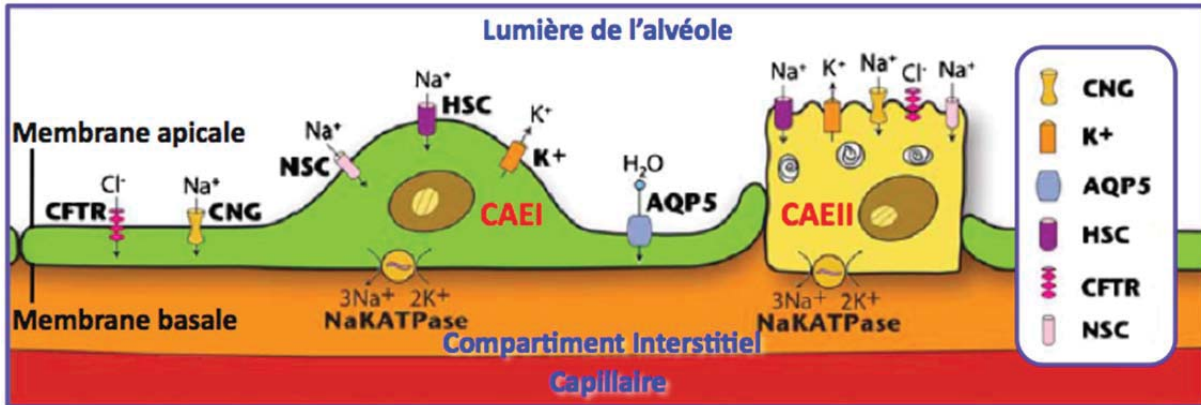
La littérature révèle que les CAEI sont davantage responsables, que les CAEII, de la création de l'influx sodique essentiel à la réabsorption du liquide alvéolaire, de par l'expression supérieure de certains canaux et leur plus grande superficie (298). Ainsi, les CAEI sont les cellules qui présentent la plus grande quantité de canaux  $\text{Na}^+$ , plus particulièrement les canaux CNG, et expriment de manière exclusive l'isotype  $\alpha 2$  de la pompe

NaK-ATPase (298). De plus, les CAEI transportent 2,5 fois plus de  $\text{Na}^+$  que les CAEII, dont 30% de l'absorption de  $\text{Na}^+$  est inhibée par l'amiloride, le bloqueur des ENaC (298). Le canal ENaC est quant à lui un canal sodique essentiel, puisque le modèle de souris transgénique dont le gène a été invalidé pour  $\alpha$ -ENaC est létal, alors que l'inhibition de  $\alpha$ -ENaC est associée à une réduction de la clairance du liquide alvéolaire (298, 307).

Il est à noter qu'initialement lors de la grossesse, la présence de liquide alvéolaire dans les alvéoles est bénéfique pour le fœtus, car il fournit un support nécessaire à la croissance en plus de favoriser le développement pulmonaire via une augmentation de la pression intrapulmonaire (298, 308). La sécrétion de fluides par les CAE vers la lumière des alvéoles est permise via un transport actif de  $\text{Cl}^-$  allant à l'encontre de son gradient électrochimique (308). Ceci est induit avec les CFTR et les  $\text{ClC}2$  à la membrane apicale, ainsi que les pompes NaK-ATPase, les co-transporteurs  $\text{NaK}2\text{Cl}$  et les canaux potassiques présents à la membrane basale (Voir Figure 40) (307, 308). De cette façon, la sortie de  $\text{Cl}^-$  vers la lumière des alvéoles crée un gradient osmotique qui induit la sortie de  $\text{Na}^+$  et d'eau par les voies paracellulaires (307, 308). Peu de temps avant la naissance, un changement majeur doit s'effectuer au niveau des CAE, car, tel que mentionné plus haut, la quantité de liquide alvéolaire doit être contrôlée pour permettre une diffusion optimale des gaz. Ainsi, les CAE passent rapidement d'un phénotype de sécrétion à un phénotype de réabsorption liquidienne (Voir Figure 40) (308, 309). Afin de bloquer la sécrétion de  $\text{Cl}^-$ , il y a une augmentation de l'expression des ENaC qui permettent une réabsorption active de  $\text{Na}^+$  à la membrane apicale (307, 308). Ces canaux travaillent de concert avec la pompe NaK-ATPase présente à la membrane basale des CAE pour permettre l'absorption du  $\text{Na}^+$  (Voir Figure 40) (308, 309). Le gradient osmotique créé induit l'absorption de  $\text{Cl}^-$  au niveau des voies paracellulaires, ainsi qu'une absorption d'eau via les voies transcellulaires et paracellulaires (298, 302). Le phénomène observé en phase périnatale est ensuite maintenu de manière post-natale avec l'âge adulte (308). Toutefois, en condition pathologique, tel qu'en présence d'œdème pulmonaire cardiogénique, l'épithélium alvéolaire peut passer d'un phénotype absorbant à sécrétoire (306). Alors, la clairance du fluide alvéolaire est renversée et est associée avec l'inhibition des canaux ENaC et la sécrétion de fluides et de  $\text{Cl}^-$  par les CFTR, les  $\text{NaK}2\text{Cl}$  et la pompe NaK-ATPase (306).

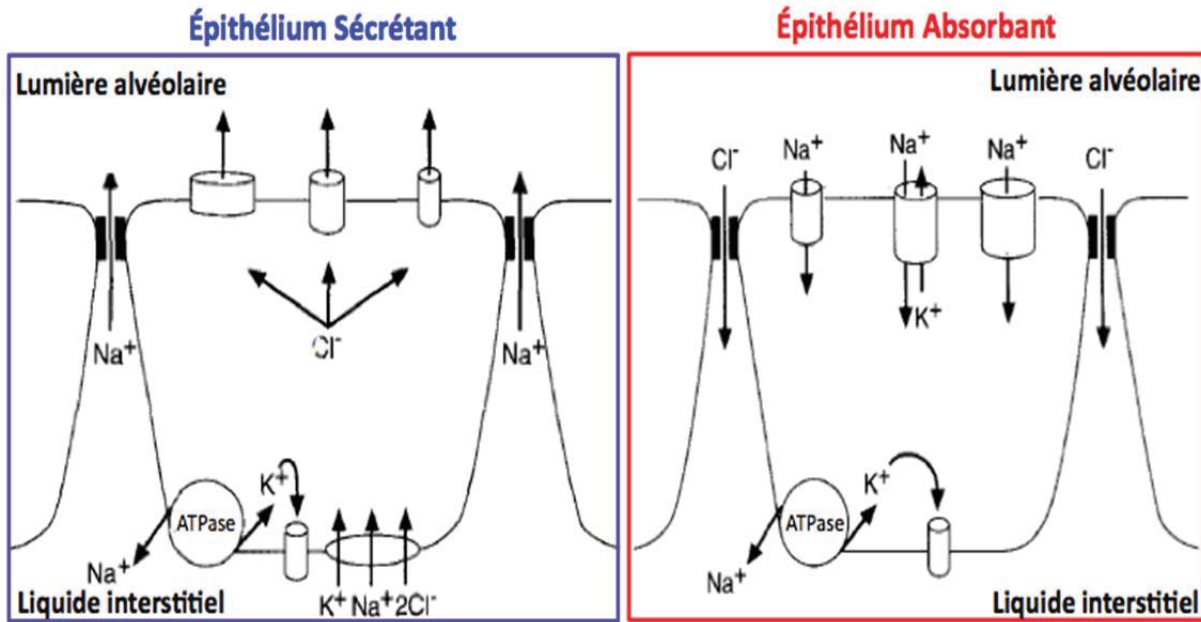


Figure 39 : Les canaux exprimés par les CAEI et CAEII



Les CAEI et CAEII (Cellules Alvéolaires Épithéliales de type I en vert et de type II en jaune) expriment toutes deux à leur membrane apicale les canaux sodiques CNG (*Cyclic Nucleotide-Gated channel*), HSC (*Highly Selective sodium Channel*) et NSC (*Non-Selective sodium Channel*), les canaux potassiques K<sup>+</sup>, les canaux chloriques CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Receptor*) et, à leur membrane basale, la pompe NaK-ATPase (Sodium-Potassium Adénosine Triphosphatase). Seule les CAEI expriment l'AQP5 (l'aquaporine 5) à leur membrane apicale. (298) avec la permission de la Royal Society of Chemistry.

Figure 40 : Phénotype prénatal et périnatal de l'épithélium alvéolaire



Avant la naissance, l'épithélium alvéolaire a un phénotype sécréteur, via la présence de canaux chloriques à la membrane apicale et de pompes NaK-ATPase, de co-transporteurs NaK2Cl et de canaux potassiques à la membrane basale. À la naissance, l'épithélium alvéolaire passe en mode absorbant via la présence de canaux sodiques à la membrane apicale. (308) avec la permission de Taylor & Francis.

#### **1.2.2.1.3.2 Les mécanismes de défense de l'organisme par les CAE**

L'épithélium des voies respiratoires et des CAE forme une barrière essentielle à la protection de l'organisme contre des agents pathogènes nuisibles provenant de l'air inhalé, tels les virus, les bactéries et les allergènes (292, 293). Ainsi, les cellules épithéliales ciliées présentes au niveau du système de conduction des voies respiratoires contribuent à l'immunité innée de l'organisme, car le mouvement oscillatoire des cils induit la sécrétion et la propulsion de mucus qui emprisonne et transporte les particules indésirables (292). Également, les CAE contribuent activement à réguler la défense immunitaire innée pulmonaire (292, 293). Les pneumocytes de type I sont reconnus pour participer à la réponse inflammatoire, puisqu'ils sécrètent abondamment des cytokines pro-inflammatoires et que leur très grande surface de contact leur permet d'interagir avec les macrophages présents au niveau de la lumière alvéolaire (293). De plus, les CAEII peuvent agir à titre de cellule présentatrice d'antigène en envoyant des signaux stimulants aux cellules T (292). Également, les CAEII peuvent moduler la réponse immunitaire innée, de par leur capacité à produire des cytokines, ou encore peuvent induire le recrutement de cellules inflammatoires en sécrétant des MCP-1 (292).

## ***1.2.2 Les myofibroblastes pulmonaires***

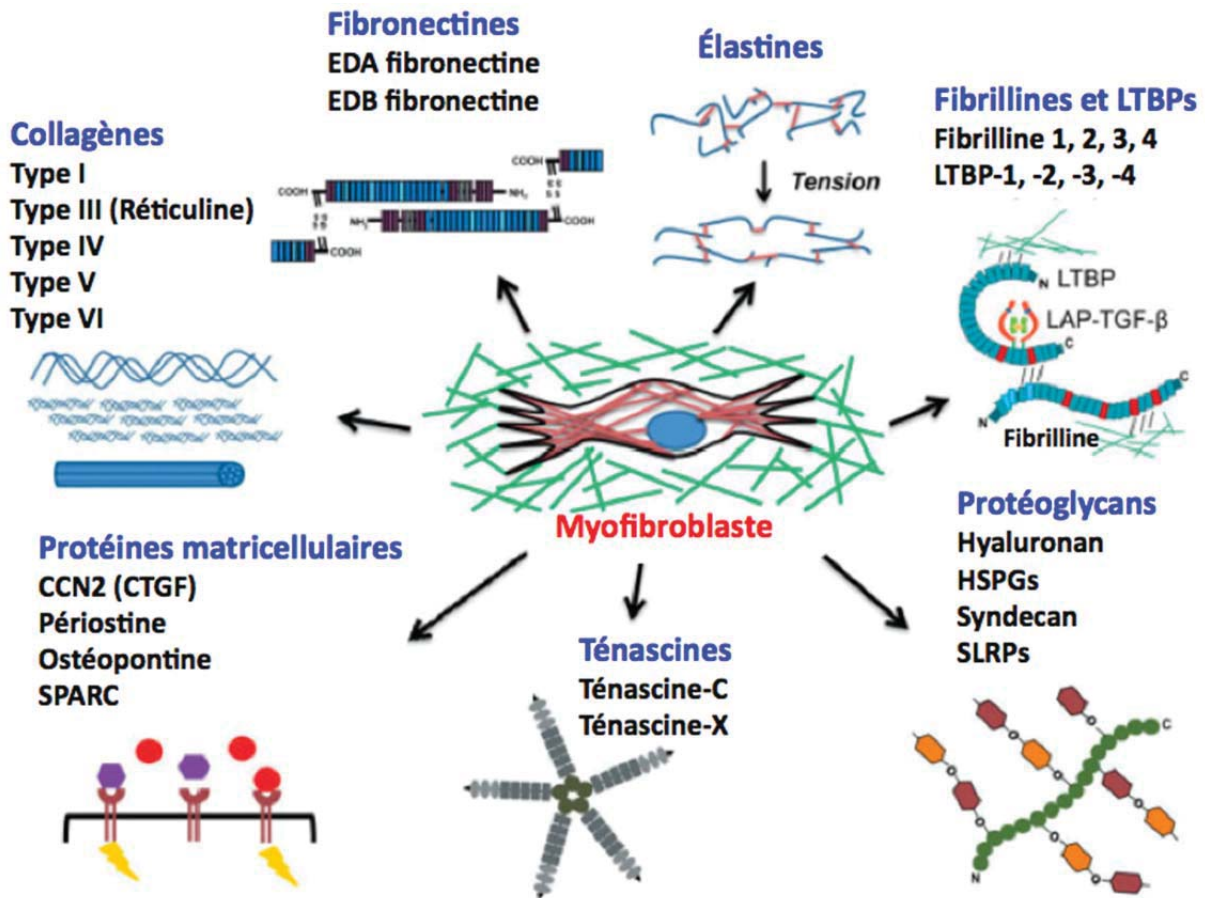
### ***1.2.2.1 Les myofibroblastes à travers l'organisme***

Les myofibroblastes sont des cellules en forme d'étoile qui sont présentes dans plusieurs tissus de l'organisme (108, 310). Malgré le fait que leur l'origine est très hétérogène, leur apparence, leur morphologie et leur fonction sont semblables, et ce, indépendamment du tissu d'où ils proviennent (108, 114, 310, 311). Ces cellules ont été nommées «myofibroblastes» en 1971 par Majno et décrites pour la première fois au niveau de plaies dermiques par Gabbiani et ses collaborateurs comme étant des fibroblastes, dont la principale caractéristique consiste à sécréter du collagène et possédant un phénotype modifié via l'ajout de la capacité de contraction des CML (23, 106-109, 114, 312-314). Ainsi, les myofibroblastes possèdent le phénotype parfait pour participer à la réparation des tissus via la cicatrisation physiologique, en fournissant une certaine contractilité à la cicatrice (312). Ils contribuent aussi de façon délétère à la fibrose pathologique (312). Les myofibroblastes ont un rôle physiologique dans la cicatrisation, la phagocytose, la synthèse et la réparation de l'ECM, la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules endothéliales, la régulation du flux sanguin, l'angiogenèse, la perméabilité vasculaire, l'inflammation, la fibrose, la croissance et le développement des tissus et des organes (108, 109, 310, 311, 315-318). D'ailleurs, certains types de myofibroblastes sont présents au niveau des valves cardiaques et des alvéoles pulmonaires (108). De plus, l'activation ou la prolifération des myofibroblastes induit de nombreuses maladies affectant différents organes, tel la fibrose myocardique, l'athérosclérose, les microvasculopathies, la resténose des artères coronaires, l'hypertension pulmonaire, la fibrose interstitielle pulmonaire, la sarcoïdose, la fibrose tubulointerstitielle rénale ou encore la glomérulonéphrite proliférative et sclérosante (108, 114, 318). L'activation des myofibroblastes est induite via la relâche de cytokines, dont le principal est le TGF- $\beta_1$ , par les cellules inflammatoires et les cellules locales du tissu endommagé, mais également suite à une induction de contraintes mécaniques (3, 114, 314). Dans le tissu sain, les fibroblastes sont habituellement protégés de ces contraintes mécaniques par une structure de protection qui est créée via un réseau enchâssé d'ECM extrêmement stable (3, 114). Cependant, lors d'un dommage myocardique par exemple, l'intégrité structurelle du myocarde est détruite et l'ECM

ne parvient plus à protéger les fibroblastes des tensions mécaniques puisqu'elle est constamment remodelée (3, 114).

Lorsqu'ils sont activés, les myofibroblastes expriment des protéines filamenteuses intermédiaires, soit la Vimentine et la Desmine, ainsi que l' $\alpha$ -actine des muscles lisses ( $\alpha$ -SMA) et il s'agit des trois types de filaments les plus étudiés pour permettre l'identification des myofibroblastes en culture (108, 109, 311, 315, 317, 319). Cependant, pour permettre l'identification des myofibroblastes, la simple expression de l' $\alpha$ -SMA n'est pas suffisante : il est nécessaire que les filaments d' $\alpha$ -SMA se retrouvent sous forme de faisceaux regroupés de microfilaments afin de conférer l'activité contractile des myofibroblastes (312). De plus, l'expression d' $\alpha$ -SMA n'est pas non plus essentielle pour caractériser un myofibroblaste, car d'autres fibres peuvent lui conférer une activité contractile, on parle alors de proto-myofibroblastes et qui sont décrits à la Section 1.2.2.2.2 (314). Dépendamment des filaments exprimés par ces cellules, une classification des myofibroblastes est faite. En effet, les myofibroblastes qui expriment la Vimentine sont nommé V-type ; la Desmine, D-type ; l' $\alpha$ -SMA, A-type. En plus de ces trois filaments principaux, les myofibroblastes expriment la lamine, la myosine, le GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*), les actines  $\beta$  et  $\gamma$ , les molécules d'adhésion, les intégrines  $\alpha$  et  $\beta$  et les tubulines des microtubules (108, 109, 160, 311). De plus, les myofibroblastes activés produisent des molécules de l'ECM qui sont schématisés à la Figure 41, tels les fibres de collagène, dont principalement les types I et III (réticuline) ; les fibres d'élastine ; les glycoprotéines, telles la fibronectine, les fibrillines et les LTBP (*Latent TGF- $\beta$  Binding Protein*) ; les protéoglycanes ; les ténascines C et X et les protéines matricellulaires, telles l'ostéopontine et la périostine (108, 109, 312, 315, 317, 320, 321).

Figure 41 : Les myofibroblastes produisent de nombreuses molécules de la matrice extracellulaire



Les myofibroblastes produisent : des fibrillines et des LTBPs (*Latent TGF- $\beta$  Binding Proteins*); des protéoglycans dont le HSPGs (*Heparan Sulfate Proteoglycans*) et le SLRPs (*Small Leucine-Rich Proteoglycans*); des ténascines; des protéines matricellulaires dont la CCN2 [famille protéique comprenant le *Cysteine-rich 61*, le CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*) et le *Nephroblastoma overexpressed*] et le SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*); des collagènes; les fibronectines et les élastines. (312) avec la permission de John Wiley and Sons.

Afin de répondre aux signaux environnant, les myofibroblastes nécessitent la présence de multiples récepteurs et des protéines d'adhésion exprimés à leur surface, qui sont inventoriés dans le Tableau 3 (108). Évidemment, afin d'exécuter leurs rôles physiologiques et pathologiques, les myofibroblastes vont sécréter divers médiateurs solubles, tels que les chimiokines, les cytokines, les facteurs de croissance ou les médiateurs inflammatoires qui sont énumérés dans le Tableau 4 (108, 311, 318).

**Tableau 3 : Les myofibroblastes expriment de nombreux récepteurs de médiateurs solubles ainsi que des protéines d'adhésion**

<b>Cytokines</b>	<b>Facteurs de Croissance</b>	<b>Médiateurs Inflammatoires</b>	<b>Neurotransmetteurs et médiateurs paracrines</b>	<b>Protéines d'adhésion</b>
IL-1 IL-6 IL-8 IL-11 TNF- $\alpha$	aFGF bFGF C-kit FGF-II IGF-I PDGF- $\alpha$ PDGF- $\beta$ TGF- $\alpha$ /EGF TGF- $\beta$ I et II Thrombine	HETEs Prostaglandine	Acétylcholine Aldostérone Angiotensine II Bradykinine Endothéline Facteur Natriurétique A Histamine Sérotonine	CD18 ICAM-1 Intégrine $\alpha_1\beta_1$ MCP-1 NCAM VCAM-1

Tableau adapté de (108).

**Tableau 4 : Les médiateurs solubles sécrétés par les myofibroblastes**

<b>Chimiokines</b>	<b>Cytokines</b>	<b>Facteurs de Croissance</b>	<b>Médiateurs Inflammatoires</b>
ENA-78 GRO-1 $\alpha$ IL-8 MCP-1 MIP-1 $\alpha$ MIP-2 RANTES	IL-1 IL-6 IL-10 TNF- $\alpha$	bFGF CSF-1 GM-CSF HGF IGF-I IGF-II KGF NGF PDGF-AA SCF TGF- $\beta$	CO HETEs H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> NO O <sup>-</sup> PAF PGE <sub>2</sub> Prostacycline Protéine Activatrice PLA <sub>2</sub>

Tableau adapté de (108).

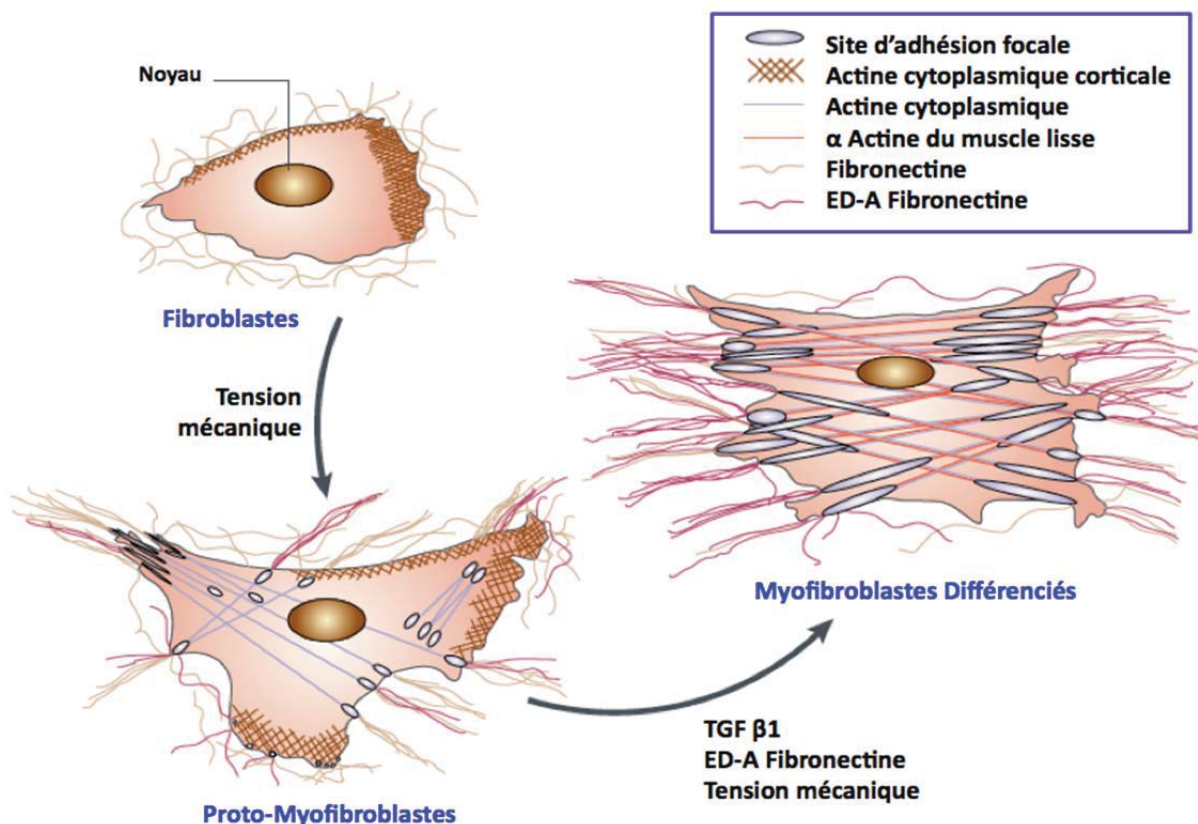
Pour une définition complète des abréviations des récepteurs exprimés et des médiateurs sécrétés par les myofibroblastes, voir la liste des sigles et des abréviations à la page XXII.



### 1.2.2.2.2 L'origine des myofibroblastes pulmonaires

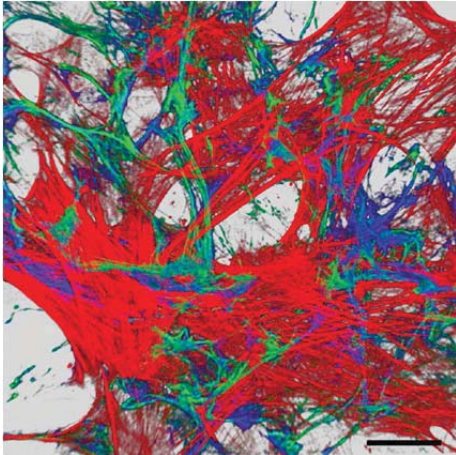
De manière basale, les cloisons alvéolaires contiennent une petite population de fibroblastes pulmonaires  $\alpha$ -SMA<sup>(-)</sup> ( $\alpha$ -Smooth Muscle Actin,  $\alpha$ -actine du muscle lisse) (23). Ces fibroblastes pulmonaires sont reconnus pour exprimer de l'actine cytoplasmique au niveau cortical, alors qu'aucune fibre de tension n'est présente au sein de ce type cellulaire, voir Figure 42 (109). Également, les fibroblastes pulmonaires sont incapables de former des complexes d'adhésion avec de l'ECM, et ce, malgré le fait qu'ils expriment de la fibronectine extracellulaire (109, 114). De plus, au niveau du tissu alvéolaire basal de rats témoins, les myofibroblastes pulmonaires Desmine<sup>(+)</sup>/ $\alpha$ -SMA<sup>(+)</sup> sont absents, car ceux-ci ne sont recrutés qu'à la suite de lésions (23, 311). Néanmoins, le tissu pulmonaire sain présente également un

**Figure 42 : La formation des myofibroblastes différenciés**



Les fibroblastes se différencient sous contraintes mécaniques en proto-myofibroblastes. La présence de contraintes mécaniques et de TGF- $\beta$ 1 (*Transforming Growth Factor  $\beta$ 1*), qui augmente l'expression du variant d'épissage ED-A (*ExtraDomain-A*) de la fibronectine au sein des proto-myofibroblastes, promouvoit la différenciation de ceux-ci en myofibroblastes. (109) avec la permission du Nature Publishing Group.

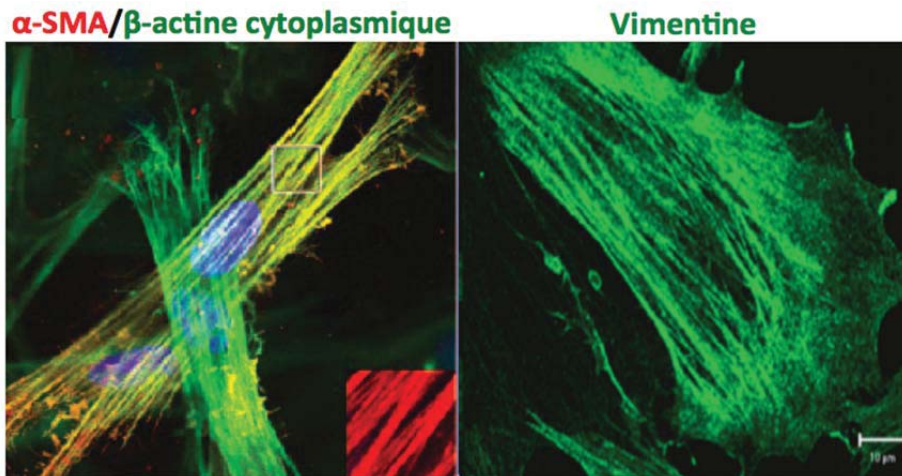
nombre limité de proto-myofibroblastes pulmonaires au niveau des cloisons alvéolaires (114). Ces proto-myofibroblastes sont en fait un type cellulaire intermédiaire entre les fibroblastes et les myofibroblastes (Voir Figure 42) (109, 114, 314). Ainsi, sous contrainte mécanique, les fibroblastes se différencient en proto-myofibroblastes, qui sont des myofibroblastes qui n'expriment pas l' $\alpha$ -actine des muscles lisses, mais qui sont malgré tout capables de générer de la force contractile (109, 114, 314). Ces proto-myofibroblastes présentent, en plus de l'actine cytoplasmique au niveau cortical, de l'actine cytoplasmique qui contient des fibres de tension et qui se terminent en complexes d'adhésion, ainsi que de la fibronectine et de la ED-A fibronectine à la surface cellulaire (109). Ensuite, le TGF- $\beta_1$ , une cytokine produite de manière autocrine et par les plaquettes des tissus lésés, augmente l'expression du variant d'épissage ED-A de la fibronectine, puis ces deux facteurs s'allient aux contraintes mécaniques pour promouvoir la transdifférenciation des proto-myofibroblastes en myofibroblastes différenciés (Voir Figure 42 et 43) (3, 23, 108, 109, 114, 115, 315, 316, 320, 322). Les myofibroblastes pulmonaires différenciés expriment alors *de novo* des fibres de tension  $\alpha$ -SMA<sup>(+)</sup>, qui interagissent avec des fibres de tension de  $\beta$ -actine cytoplasmique considérablement mieux développées, en plus d'exprimer la Vimentine (Voir Figure 44) (109, 114, 310, 312). De plus, ces cellules peuvent générer une force de contraction nettement supérieure à celle des proto-myofibroblastes, dû au fait qu'elles expriment davantage d'ED-A fibronectine et de fibronectine extracellulaire, et surtout que celles-ci s'organisent désormais sous forme de fibrilles (109). Également, les myofibroblastes différenciés produisent davantage de protéines de l'ECM et présentent de plus larges et plus nombreuses adhésions focales (*in vitro*) et d'avantage de complexes d'adhésion (*in vivo*) (109, 114). De cette façon, les fibres de tension  $\alpha$ -SMA<sup>(+)</sup> des myofibroblastes différenciés peuvent entrer en contact avec l'ECM, via les adhésions focales supermatures, et les myofibroblastes différenciés peuvent se joindre l'un à l'autre via des jonctions adhérentes et des jonctions communicantes (Voir Figure 45) (108, 109, 114, 315). Enfin, l'apparition de fibres de tension  $\alpha$ -SMA<sup>(+)</sup> chez les myofibroblastes pulmonaires différenciés est non seulement importante pour assurer la contractilité et la compliance du tissu pulmonaire, mais permet également de moduler la transduction de signal et de réguler l'expression des gènes lors de la synthèse d'ECM (114).



**Figure 43 : Interactions entre le TGF-β1 et l'ECM chez les myofibroblastes pulmonaires**

Les myofibroblastes pulmonaires en culture depuis 7 jours, révélés par l'immunofluorescence rouge des fibres de tension  $\alpha$ -SMA(+), présentent la protéine latente d'entreposage du TGF-β1 (*Transforming Growth Factor-β-binding protein-1*) en vert, ainsi que le variant d'épissage ED-A (*Extra Domain-A*) de la fibronectine en immunofluorescence bleue. (23) avec la permission de l'*American Thoracic Society* © 2015 *American Thoracic Society*.

**Figure 44 : Les myofibroblastes pulmonaires en culture expriment l'α-SMA, la β-actine cytoplasmique et la Vimentine**



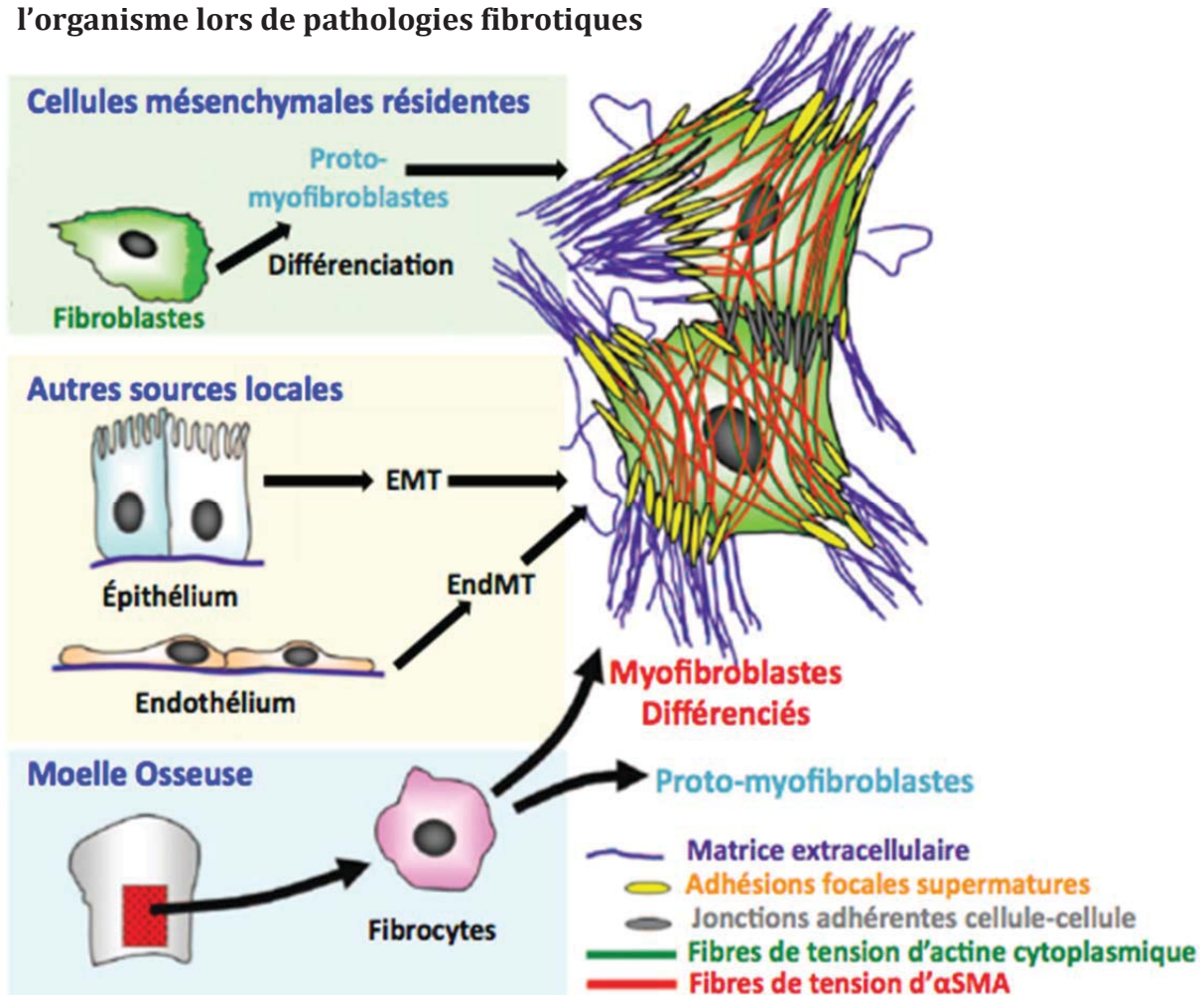
**(Image de gauche)** Lorsque soumis à une tension mécanique induite par une concentration de 3,5 mg/ml de collagène dans un gel, les myofibroblastes pulmonaires isolés de rats présentent des fibres de tension  $\alpha$ -SMA(+)<sup>+</sup> (en rouge) et de la  $\beta$ -actine cytoplasmique (en vert) Les noyaux sont en immunofluorescence bleue. (114) avec la permission d'*Elsevier*. **(Image de droite)** Les myofibroblastes pulmonaires isolés de rats adultes expriment la Vimentine en immunofluorescence verte. (310) avec la permission de *NRC Research Press*.

À travers l'organisme, de nombreux précurseurs des myofibroblastes différenciés et activés ont été identifiés lors du développement de pathologies fibrotiques (Voir Figure 45) (23, 114). Évidemment, les cellules stromales résidentes, soit les cellules qui constituent le tissu connectif des organes et dont le type le plus commun est les fibroblastes, sont la source majeure de myofibroblastes activés au niveau des tissus fibrotiques, incluant la fibrose pulmonaire (23, 109, 114, 314, 323-325). De plus, il est reconnu que des mécanismes d'EMT et d'EndMT contribuent au recrutement de fibroblastes activés (Voir Figure 45 et Section 1.5)



(114, 323, 326). Des fibrocytes circulants dérivés de la moelle osseuse peuvent aussi être une source de myofibroblastes différenciés (Voir Figure 45) (114). Toutefois, la provenance exacte des myofibroblastes pulmonaires activés recrutés lors de pathologies pulmonaires fibrotiques, ainsi que la contribution respective des populations cellulaires qui sont à leur origine, nécessitent encore quelques approfondissements, puisque des résultats contradictoires ont été publiés (Voir Section 1.5.1.1.2 et Chapitre 4) (23, 327, 328).

**Figure 45 : Les cellules progénitrices des myofibroblastes activés à travers l'organisme lors de pathologies fibrotiques**



Les cellules mésenchymateuses résidentes (fibroblastes), l'épithélium et l'endothélium local, via les processus d'EMT (*Epithelial-Mesenchymal Transition*) et d'EndMT (*Endothelial-Mesenchymal Transition*) respectivement et les cellules de la moelle osseuse (fibrocytes) donnent naissance aux myofibroblastes différenciés lors de pathologies fibrotiques. (114) avec la permission d'Elsevier.

### ***1.2.2.2.3 La fonction des fibroblastes pulmonaires en situation physiologique et des myofibroblastes pulmonaires lors de la fibrose pulmonaire***

Les fibroblastes pulmonaires contribuent de manière bénéfique à la compliance pulmonaire lorsqu'ils sont recrutés en situation physiologique (321). En effet, ce sont les principaux responsables de la synthèse et de la maintenance d'ECM alvéolaire qui constitue l'échafaudage essentiel à la prolifération et à la différenciation cellulaire alvéolaire (321). De plus, les fibroblastes pulmonaires sécrètent de l'élastine, qui est essentielle pour conférer une élasticité suffisante aux poumons lors de la ventilation respiratoire (321). Également, ce type cellulaire participe à la croissance et à la régénération des alvéoles fœtales et matures, de par son interaction avec les cellules endothéliales et épithéliales, et via la sécrétion d'élastine (321). Ces interactions sont évidemment prodiguées via la sécrétion paracrines de molécules, mais également par les extensions cytoplasmiques des fibroblastes pulmonaires qui atteignent les membranes basales des cellules endothéliales, des CAEI et des CAEII (321, 329).

Dû à leur capacité à synthétiser fortement le collagène, les fibroblastes pulmonaires activés, ou myofibroblastes pulmonaires, sont quant à eux le principal type cellulaire impliqué dans les processus de fibrose réactive initiés lors de dommages pulmonaires (23, 311, 327). Une autre caractéristique qui distingue spécifiquement les myofibroblastes pulmonaires qui participent à la fibrose réactive pulmonaire est leur aptitude à résister à l'apoptose cellulaire (327). De plus, lors de la progression de la fibrose pulmonaire, le TGF- $\beta_1$  est un des principaux facteurs qui stimule le recrutement, l'hyperactivité et la prolifération des myofibroblastes pulmonaires (23, 323). Ainsi, une étude réalisée par Hoyles et ses collaborateurs a démontré que la perturbation de la signalisation du TGF- $\beta_1$  module la réponse fibrotique initiée par les fibroblastes pulmonaires résidents (323). De plus, l'activité des myofibroblastes pulmonaires est proportionnelle à la déposition de collagène de type I dans les cloisons alvéolaires (23). En effet, les myofibroblastes pulmonaires différenciés sont reconnus pour leur caractère prolifératif, ainsi que pour leur capacité à produire et sécréter de manière excessive du collagène, de la réticuline et de l'élastine, ce qui entraîne des dépôts denses, désorganisés et significatifs d'ECM dans les cloisons alvéolaires (23, 295, 296, 310, 311, 330-332). Lorsque les myofibroblastes pulmonaires différenciés sécrètent une trop grande quantité

de protéines de l'ECM et que leurs fibres de tensions  $\alpha$ -SMA<sup>(+)</sup> provoquent une trop grande contraction, alors un cercle vicieux est enclenché, ce qui entraîne une augmentation des contraintes mécaniques et induit conséquemment une augmentation du recrutement des myofibroblastes pulmonaires (23, 114). Ainsi, le recrutement massif et la prolifération des myofibroblastes pulmonaires sont associés avec une déposition d'ECM dans les cloisons alvéolaires, conduisant à l'épaississement des cellules de la membrane basale de l'endothélium capillaire et de l'épithélium alvéolaire (formant la barrière alvéolocapillaire), menant respectivement à une augmentation de la résistance vasculaire et à une réduction de la compliance pulmonaire (23, 114, 295, 297, 310, 311, 331-334). Ce remodelage structurel pulmonaire peut entraîner un syndrome respiratoire restrictif qui affecte les mécaniques pulmonaires et les échanges gazeux (295, 334). Ces manifestations pulmonaires sont fréquemment observées chez les insuffisants cardiaques et contribuent à la perte de capacité fonctionnelle de ces patients qui ont développé une hypertension pulmonaire secondaire aux maladies du cœur gauche (295, 332-334).



### 1.2.3 L'HYPERTENSION PULMONAIRE

#### 1.2.3.1 Définition, diagnostic et classification de l'hypertension pulmonaire

L'hypertension pulmonaire est reconnue comme étant un problème de santé majeur et est définie par une pression pulmonaire artérielle moyenne (mPAP, *mean pulmonary arterial pressure*) supérieure ou égale à 25 mmHg lorsque mesurée au repos via un cathéter au niveau du cœur droit (48, 335-340). La présence d'hypertension pulmonaire peut être observée lors des phases ultimes de développement des maladies pulmonaires interstitielles chroniques (341). L'utilisation du cathétérisme via le ventricule droit demeure l'outil essentiel permettant le diagnostic de l'hypertension pulmonaire (336, 338). Cependant, malgré l'utilisation de cet outil diagnostique, il demeure encore difficile de distinguer hypertension artérielle pulmonaire (Groupe 1) et hypertension pulmonaire associée à des maladies du cœur gauche (Groupe 2), voir plus loin pour le descriptif de ces classes d'hypertension pulmonaire (338, 340). D'ailleurs, le diagnostic de l'hypertension pulmonaire demeure complexe, car encore aujourd'hui la présence d'hypertension pulmonaire est établie tardivement dans le développement de la pathologie, si bien que l'âge moyen des patients diagnostiqués est très élevé et que ces patients présentent de nombreuses comorbidités qui affectent le pronostic de l'hypertension pulmonaire (338).

Une classification initiale des types d'hypertension pulmonaire a été réalisée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à Genève en 1973 lors du tout premier symposium mondial sur l'hypertension pulmonaire (335, 336). Celle-ci ne distinguait alors que deux catégories d'hypertension pulmonaire, à savoir l'hypertension pulmonaire primaire et l'hypertension pulmonaires secondaire à une autre pathologie et/ou un facteur de risque (336, 337). Cependant, cette classification a été modifiée afin de refléter les avancées obtenues via la progression de la science et les recherches cliniques réalisées sur le sujet, car l'hypertension pulmonaire regroupe des maladie très hétérogènes, et ce, tant au niveau de la physiopathologie que de la stratégie thérapeutique à adopter (340). Ainsi, en 1998, 5 groupes ont été créés pour rassembler des maladies ayant des caractéristiques pathologiques et hémodynamiques ainsi que des approches pharmacologiques similaires (336, 337). Le 5<sup>ième</sup>

symposium mondial sur l'hypertension pulmonaire a eu lieu à Nice en France en 2013 et a permis de revoir la définition, les mesures diagnostiques ainsi que de remodeler la classification déjà existante (Voir Tableau 5) (336-338). Lors de cet événement, la définition de l'hypertension pulmonaire est demeurée la même (338). Ainsi, il a été décidé de ne pas inclure aux critères diagnostiques de l'hypertension pulmonaire la notion de pression artérielle pulmonaire élevée à l'exercice chez des patients ayant des valeurs hémodynamiques normales au repos (338). Cette décision a été basée sur le fait qu'actuellement aucune valeur seuil n'a réussi à être déterminée et qu'en plus peu d'études sont parvenues à démontrer une corrélation entre la diminution de la capacité à l'exercice et le taux de survie (338).

De plus, lors de ce symposium, une attention particulière a été mise sur la restructuration du groupe 1, soit l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), dans le but de distinguer les pathologies n'ayant pas suffisamment de similitudes avec les autres HTAP, soit le Groupe 1'' (Voir Tableau 5) (336, 337). Les hypertensions artérielles pulmonaires se définissent par une mPAP  $\geq$  25 mmHg, mais aussi par une pression capillaire pulmonaire, aussi connue cliniquement sous le terme LVEDP (*Left Ventricular End Diastolic Pressure*), inférieure à 15 mmHg et une résistance vasculaire pulmonaire (PVR, *Pulmonary Vascular Resistance*) supérieure à 3 unités Wood (336, 340). De plus, malgré les origines diverses, les hypertensions artérielles pulmonaires présentent toutes du remodelage artériel pulmonaire caractérisé par des lésions au niveau des artérioles pulmonaires dont le diamètre est plus petit que 500 $\mu$ m, une hypertrophie de la média, une prolifération et un épaissement de l'intima, un épaissement de l'adventice, la formation de lésions plexiformes, ou encore des infiltrats de cellules inflammatoires au niveau périvasculaire (336, 342).

**Tableau 5 : Classification actualisée en 2013 de l'hypertension pulmonaire**

<p><b><i>Groupe 1. Hypertension Artérielle Pulmonaire (HTAP)</i></b></p> <p><b>1.1 Idiopathie</b></p> <p><b>1.2 Héritable</b></p> <p>    <b>1.2.1 BMPR2</b></p> <p>    <b>1.2.2 ALK1, ENG, SMAD-9, CAV1, KCNK3</b></p> <p>    <b>1.2.3 Inconnue</b></p> <p><b>1.3 Induite par une drogue ou une toxine</b></p> <p><b>1.4 Associée à :</b></p> <p>    <b>1.4.1 des maladies du tissu conjonctif ;</b></p> <p>    <b>1.4.2 une infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ;</b></p> <p>    <b>1.4.3 une hypertension portale ;</b></p> <p>    <b>1.4.4 une cardiopathie congénitale ;</b></p> <p>    <b>1.4.5 une schistosomiase.</b></p>
<p><b><i>Groupe 1'. Maladie veino-occlusive pulmonaire et/ou hémangiomasose capillaire pulmonaire (HCP)</i></b></p>
<p><b><i>Groupe 1''. Hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né</i></b></p>
<p><b><i>Groupe 2. Hypertension pulmonaire associée à des maladies du cœur gauche</i></b></p> <p><b>2.1 Dysfonction systolique du ventricule gauche</b></p> <p><b>2.2 Dysfonction diastolique du ventricule gauche</b></p> <p><b>2.3 Maladies valvulaires</b></p> <p><b>2.4 Obstructions congénitales ou acquises au niveau du tract d'éjection ou de remplissage du ventricule gauche et cardiomyopathies congénitales</b></p>
<p><b><i>Groupe 3. Hypertension pulmonaire associée à des maladies pulmonaires et/ou une hypoxie</i></b></p> <p><b>3.1 Broncho-pneumopathie chronique obstructive</b></p> <p><b>3.2 Maladie pulmonaire interstitielle (MPI)</b></p> <p><b>3.3 Autres maladies pulmonaires avec pattern restrictif et obstructif mixte</b></p> <p><b>3.4 Troubles respiratoires du sommeil</b></p> <p><b>3.5 Hypoventilation alvéolaire</b></p> <p><b>3.6 Exposition chronique aux hautes altitudes</b></p> <p><b>3.7 Anomalies du développement</b></p>
<p><b><i>Groupe 4. Hypertension pulmonaire thromboembolique chronique</i></b></p>
<p><b><i>Groupe 5. Hypertension pulmonaire ayant des mécanismes multifactoriels incertains</i></b></p> <p><b>5.1 Troubles hématologiques : anémie hémolytique chronique, syndrome myéloprolifératif, splénectomie</b></p> <p><b>5.2 Troubles systémiques : sarcoïdose, histiocytose à cellules de Langerhans pulmonaires, lymphangioléiomyomatose</b></p> <p><b>5.3 Troubles métaboliques : glycogénose, maladie de Gaucher, dysthyroïdie</b></p> <p><b>5.4 Divers : Obstruction tumorale, médiastinite fibrosante, insuffisance rénale chronique, hypertension pulmonaire segmentaire</b></p>

BMPR2, *Bone Morphogenetic Protein Receptor type II* ; ALK1, *Activin-Like receptor Kinase-1* ; ENG, *Endogline* ; SMAD-9, *Mothers Against Decapentaplegic homolog 9* ; CAV1, *Caveolin* ; KCNK3, *Potassium Channel subfamily K member 3*. Tableau adapté de (336, 337).

Le Groupe 2, soit l'hypertension pulmonaire associée à des maladies du cœur gauche, a quant à lui eu pour modification, lors du 5<sup>ième</sup> symposium, l'ajout de la catégorie 2.4 concernant les obstructions congénitales cardiaques (Voir Tableau 5) (336). L'hypertension pulmonaire associée aux maladies du cœur gauche est la forme d'hypertension pulmonaire la plus fréquente et qui présente une morbidité importante (48, 336, 340, 343). D'ailleurs, la cause la plus fréquente de tous les types d'hypertension pulmonaire est l'insuffisance cardiaque, une importante maladie du cœur gauche (296, 335, 339, 344-346). Ainsi, 70% des patients atteints d'insuffisance cardiaque et dont la fraction d'éjection est normale développent une hypertension pulmonaire (346). Plusieurs types de maladies peuvent mener au développement de ce type d'hypertension pulmonaire. Pour ce faire, celles-ci doivent induire une élévation significative de la pression auriculaire gauche durant une période suffisamment longue, tel que lors de dysfonctions ventriculaires gauches systoliques et diastoliques, de maladies des valves mitrales et aortiques ou en présence d'une cardiomyopathie (48, 340). Il arrive aussi qu'une chirurgie cardiaque puisse provoquer une hypertension pulmonaire (340). Cependant, la plupart des hypertensions pulmonaires associées aux maladies du cœur gauche sont déclenchées suite à une élévation chronique de la pression de remplissage diastolique du ventricule gauche, tel qu'en cas d'insuffisance cardiaque (48, 336, 339, 340, 344, 346). Conséquemment, il y a une augmentation de la pression dans l'oreillette gauche qui provoque à son tour un accroissement passif de la pression dans le système veineux pulmonaire (48, 336, 339, 340, 346). En somme, l'hypertension pulmonaire associée aux maladies du cœur gauche est une hypertension pulmonaire veineuse, aussi nommée hypertension pulmonaire post-capillaire, mais ce phénomène peut aussi déclencher une vasoconstriction dans le lit artériel pulmonaire (48, 343, 346).

Hémodynamiquement, l'hypertension pulmonaire associée aux maladies du cœur gauche est définie par une mPAP  $\geq$  25 mmHg, mais également une pression capillaire pulmonaire (LVEDP) supérieure à 15 mmHg et un gradient de pression diastolique inférieur à 7 mmHg (336, 339, 340). Les pressions pulmonaires accrues peuvent entraîner une conséquence néfaste qui fait progresser davantage la pathologie, soit le développement d'une hypertrophie ventriculaire droite (48, 295, 296, 311). En effet, la surcharge de pression en aval du ventricule droit entraîne une hypertrophie cardiaque concentrique (Voir Section 1.1.4.2.2).

De plus, l'hypertension pulmonaire, plus particulièrement lorsqu'elle est associée à une dysfonction ventriculaire droite, est l'un des facteurs de mauvais pronostic de l'insuffisance cardiaque et de l'infarctus du myocarde, en plus d'avoir pour conséquence de réduire significativement la capacité à l'exercice (295, 296, 340, 344, 345, 347). Ainsi, un modèle sévère d'infarctus du myocarde chez le rat mène au développement d'une hypertension pulmonaire (160, 295, 311). Chez ce modèle, des myofibroblastes pulmonaires  $\alpha$ -SMA<sup>(+)</sup> ont été identifiés au sein des cloisons alvéolaires, alors que chez des rats témoins, un plus faible nombre de ces cellules ont été détectés au niveau des cloisons alvéolaires (160, 295, 311). Des résultats similaires ont également été observés chez l'humain par Kapanci et ses collaborateurs (160, 348). En effet, ils ont aussi remarqué la présence d'une importante population de myofibroblastes  $\alpha$ -SMA<sup>(+)</sup> au niveau des cloisons alvéolaires de patients atteints d'une hypertension pulmonaire post-capillaire secondaire à une insuffisance cardiaque gauche (160, 348). Ces résultats témoignent de l'implication des myofibroblastes  $\alpha$ -SMA<sup>(+)</sup> dans le développement de la fibrose réactive pulmonaire lors de l'hypertension pulmonaire (160, 295, 296, 310, 311, 331-333). Toutefois, la nature exacte de la provenance des myofibroblastes, ainsi que la contribution respective des populations cellulaires qui sont à l'origine des myofibroblastes pulmonaires activés dans le développement des pathologies fibrotiques pulmonaires, nécessitent encore quelques approfondissements (Voir Chapitre 4) (23, 327). Chose certaine, les fibroblastes pulmonaires activés sont reconnus pour leur importante prolifération, contribuant ainsi à une forte déposition d'ECM dans les cloisons alvéolaires, ce qui provoque alors l'épaississement de la membrane alvéolocapillaire (23, 160, 295, 296, 310, 311, 330-333, 349, 350). Ce mécanisme de remodelage vise initialement à prévenir l'avènement d'œdème alvéolaire, cependant il induit plutôt une conséquence néfaste, soit la réduction de la compliance pulmonaire combinée à une augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire (48, 295, 296, 311, 330-333, 349, 350). Ainsi, ces mécanismes adaptatifs induisent un syndrome respiratoire restrictif délétère qui affecte alors la mécanique pulmonaire et les échanges gazeux au niveau de la membrane alvéolocapillaire, ce qui conduit à une perte considérable des capacités fonctionnelles des patients atteints d'insuffisance cardiaque et d'hypertension pulmonaire (295, 296, 310, 311, 332, 333, 350). Évidemment, la

réduction de la capacité pulmonaire totale est proportionnelle à la gravité de la pathologie cardiaque, tel que mesuré à partir de tests sur la fonction pulmonaire à l'exercice (349).

Finalement, le groupe 3 rassemble les hypertensions pulmonaires associées à des maladies pulmonaires ou une hypoxie et témoigne que la présence d'hypertension pulmonaire peut être observée lors des phases ultimes de développement des maladies pulmonaires interstitielles chroniques (Voir Tableau 5) (336, 337, 351). Le groupe 4, représente l'hypertension pulmonaire thromboembolique chronique, alors que le groupe 5 est constitué des hypertensions pulmonaires ayant des mécanismes multifactoriels incertains (Voir Tableau 5) (336, 337).

### ***1.2.3.2 Les thérapies actuelles de l'hypertension pulmonaire***

#### ***1.2.3.2.1 Les thérapies actuelles de l'hypertension artérielle pulmonaire***

Les thérapies approuvées actuellement pour le traitement de l'hypertension pulmonaire ont été développées principalement pour le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire (Groupe 1) (352). En effet, il existe présentement plusieurs médicaments développés, déjà commercialisés ou prochainement disponibles, pour le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire, et qui agissent sur 3 systèmes bien distincts, soit la voie de l'endothéline, la voie du NO-GMPc (*Nitric Oxide-cyclic Guanosine Monophosphate*) et la voie de la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) (Voir Figure 46) (352). Les traitements développés ont pour objectif de contrecarrer la dysfonction endothéliale artérielle pulmonaire qui provoque des effets nuisibles, tels la vasoconstriction, ainsi que le remodelage et la thrombose, qui induisent collectivement une obstruction vasculaire pulmonaire (352). Physiologiquement, cette dysfonction endothéliale a plusieurs causes factérielles. Tout d'abord, elle peut être attribuable à une baisse de production de prostacycline, à partir de l'acide arachidonique, par les cellules endothéliales artérielles pulmonaires (352). Ce faisant, il y a une diminution de l'activation des récepteurs IP (*prostaglandin I<sub>2</sub> receptor*) de la prostacycline au niveau de la membrane des CML, et donc une diminution de l'activation de l'adénylate cyclase qui transforme l'ATP en AMPc (Adénosine Monophosphate cyclique), ce qui provoque une vasoconstriction (Voir Figure 46)



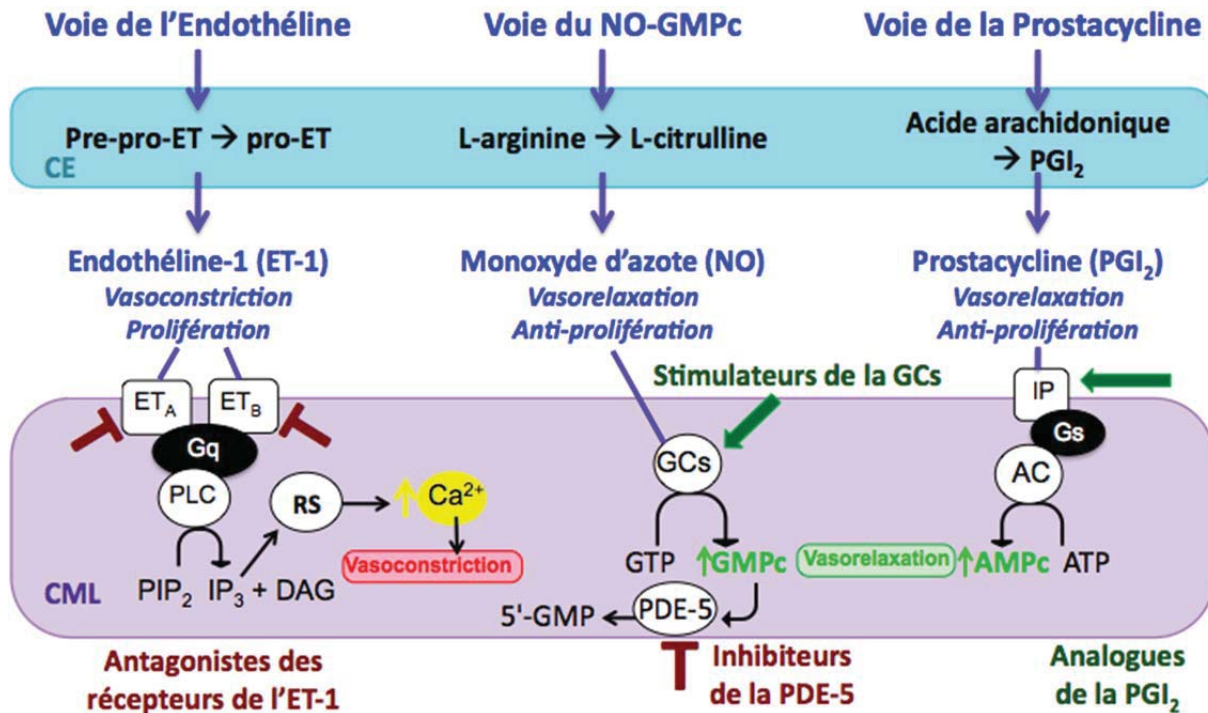
(352). Ainsi, l'approche thérapeutique consiste à utiliser des analogues de la prostacycline, tel l'Époprosténol, le Tréprostinil, l'Iloprost et le Sélexipag, afin d'augmenter les niveaux intracellulaires d'AMPc, et ainsi produire une vasorelaxation (352). Les agonistes des récepteurs IP de la prostacycline ont aussi un deuxième mécanisme d'action pour contrer la dysfonction endothéliale, soit leur effet antiprolifératif sur les CML, permettant ainsi d'inhiber le remodelage vasculaire (352).

De plus, la dysfonction endothéliale peut être induite via une diminution de synthèse de monoxyde d'azote (NO), lors de la transformation de la L-arginine en L-citrulline, par l'eNOS des cellules endothéliales artérielles pulmonaires. Cela a alors pour conséquence une diminution de l'activation de la guanylate cyclase soluble (GCs) des CML qui produit de GMPc à partir de GTP, et donc, une vasoconstriction (Voir Figure 46) (352). Il existe deux stratégies pharmacologiques pour favoriser la vasodilatation dans la voie du monoxyde d'azote et du GMPc. La première consiste à inhiber l'enzyme qui hydrolyse le GMPc en 5'GMP, soit la phosphodiesterase 5 (PDE5) (352). Ainsi, l'utilisation du Sildénafil ou du Tadalafil permet d'augmenter les niveaux de GMPc, ce qui produit une vasorelaxation des CML artérielles pulmonaires (352). La deuxième stratégie consiste à stimuler directement la guanylate cyclase soluble, via le Riociguat, afin d'induire la production de GMPc et la vasorelaxation (352).

Également, une augmentation de relâche d'endothéline par les cellules endothéliales artérielles pulmonaires peut provoquer une dysfonction endothéliale (352). En effet, lorsque l'endothéline lie ses récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$  couplés à une protéine  $G_q$  au niveau de la membrane des CML artérielles pulmonaires, cela active la phospholipase C (PLC) (353). La PLC clive alors le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate ( $PIP_2$ ) en diacylglycérol (DAG) et en inositol 1,4,5-triphosphate ( $IP_3$ ) (353). L' $IP_3$  produit lie son récepteur au niveau du réticulum sarcoplasmique de la CML pour induire la sortie de calcium et augmenter la concentration intracellulaire calcique, ce qui provoque la vasoconstriction et l'augmentation du tonus vasculaire pulmonaire (Voir Figure 46) (352). De plus, l'endothéline induit la prolifération des CML artérielles pulmonaires, ce qui a pour conséquence d'hypertrophier les parois artérielles pulmonaires (352). Ainsi, la stratégie thérapeutique consiste à réaliser l'antagonisme des

récepteurs ET<sub>A</sub> et/ou ET<sub>B</sub> de l'endothéline, via le Bosentan, l'Ambrisentan, ou le Macitentan, pour ainsi bloquer la vasoconstriction (352).

**Figure 46: Voies responsables des dysfonctions endothéliales lors d'hypertension artérielle pulmonaire et les solutions pharmacologiques de cette pathologie**



Les voies de l'endothéline (ET-1), du NO-GMPc et de la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) sont responsables des dysfonctions endothéliales lors de l'hypertension artérielle pulmonaire. L'ET-1 lie les récepteurs de l'endothéline (ET<sub>A/B</sub>) couplés à la Protéine G<sub>q</sub> (G<sub>q</sub>). Cela active la Phospholipase C (PLC) qui clive le Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) en Diacylglycérol (DAG) et en Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>). L'IP<sub>3</sub> contribue à la relâche de calcium (Ca<sup>2+</sup>) par le Réticulum Sarcoplasmique (RS), favorisant la vasoconstriction des cellules musculaires lisses (CML). Le monoxyde d'azote (NO) est généré au niveau des cellules endothéliales (CE) via la conversion de la L-arginine en L-citrulline. Le NO diffuse vers les CML et active la Guanylate Cyclase soluble (GCs) qui convertit la Guanosine Triphosphate (GTP) en Guanosine Monophosphate cyclique (GMPc), induisant la vasorelaxation des CML. Toutefois, la phosphodiesterase 5 (PDE5) peut hydrolyser le GMPc en 5'GMP, ce qui réduit l'action vasodilatatrice. La PGI<sub>2</sub> est générée à partir d'acide arachidonique au sein des CE. La PGI<sub>2</sub> lie sur la CML son Récepteur de la prostacycline (IP) couplé à une Protéine G stimulatrice (G<sub>s</sub>), activant l'Adénylate Cyclase (AC). L'AC transforme l'Adénosine Triphosphate (ATP) en Adénosine Monophosphate cyclique (AMPc), favorisant la vasorelaxation des CML. Les antagonistes des récepteurs de l'ET-1 inhibent la vasoconstriction en agissant sur la voie de l'endothéline. Les inhibiteurs de la PDE-5 et les stimulateurs de la GCs agissent sur la voie NO-GMPc. Les analogues de la PGI<sub>2</sub> favorisent la vasodilatation sur la voie de la prostacycline. *Image inspirée de (352).*

Évidemment, des médicaments visant à induire une vasodilatation artérielle pulmonaire, tels que les inhibiteurs des canaux calciques, font également partie de la thérapie pour contrer la vasoconstriction présente en situation d'hypertension artérielle pulmonaire, mais ceux-ci n'ont pas d'impacts sur le remodelage vasculaire (352). Fait important à noter, les thérapies pharmacologiques décrites ne parviennent pas à guérir les patients présentant une hypertension artérielle pulmonaire, mais ont plutôt pour objectif d'améliorer la qualité de vie des gens atteints (352). Ainsi, seule la transplantation pulmonaire permet une guérison totale, mais n'est malheureusement offerte qu'aux patients jeunes, ne présentant aucune comorbidité et ne répondant pas à l'approche pharmacologique (352).

#### ***1.2.3.2.2 Les thérapies actuelles de l'hypertension pulmonaire associée aux maladies du cœur gauche***

Malgré le fait que l'hypertension pulmonaire associée aux maladies du cœur gauche est de loin le type d'hypertension pulmonaire le plus fréquent, il n'existe malheureusement pas de thérapie qui soit actuellement approuvée pour cette pathologie (336, 339, 340). Dans l'optique de découvrir des thérapies spécifiques et efficaces pour l'hypertension pulmonaire associée aux maladies du cœur gauche, divers traitements utilisés en hypertension artérielle pulmonaire ont été testés cliniquement dans de petites cohortes de patients ayant développé de l'hypertension pulmonaire consécutive à l'insuffisance cardiaque (336). Cependant, jusqu'à présent, aucune de ces études n'a démontré de résultats probants et d'évidences cliniques suffisantes permettant la recommandation de ces thérapies pour les patients souffrant d'hypertension pulmonaire associée aux maladies du cœur gauche (336, 339, 340). Dans certains cas, les thérapies proposées ont parfois même provoqué une dégradation de la condition clinique des patients atteints (340). Voici donc un résumé des études cliniques réalisées.

Tout d'abord, en 1997 l'étude FIRST (*Flolan International Randomized Survival Trial*), où le traitement employé était l'Époprosténol, a été entreprise chez des patients ayant une insuffisance cardiaque sévère. Des bénéfices ont été observés sur la fonction hémodynamique des patients recevant ce traitement additionnel, cependant, l'étude a dû être

arrêtée de manière prématurée en raison d'une augmentation de la mortalité de 12% après 6 mois d'utilisation (48, 339, 340, 343, 346, 354). Cette mortalité était attribuable pour la plupart des patients à une insuffisance cardiaque congestive progressive (354). Ensuite, des études avec les antagonistes des récepteurs de l'Endothéline ont été réalisées. Ainsi, l'étude REACH-1 (*Research on Endothelin Antagonists in Chronic Heart failure*) a été réalisée chez des insuffisants cardiaques avancés. Le traitement de Bosentan a toutefois dû être arrêté prématurément en raison du taux élevé des transaminases chez les patients (339, 343, 355). Par la suite, l'étude ENABLE (*Endothelin Antagonist Bosentan for Lowering cardiac Event in heart failure*) a étudié l'effet du Bosentan chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque. Cependant, aucun bénéfice n'a pu être démontré et en plus il y a eu une augmentation des risques d'exacerbation des insuffisances cardiaques (48, 340, 343, 346, 356). Toutefois, l'administration de Bosentan a été bénéfique chez des patients qui étaient inadmissibles pour une transplantation cardiaque, puisque cette administration a permis de résorber une hypertension pulmonaire sévère et irréversible. Ainsi, les patients ont pu recevoir leur transplantation, et ce, avec succès. Un dernier médicament a été étudié pour le traitement de l'hypertension pulmonaire consécutive à une insuffisance cardiaque, soit le Sildénafil, un inhibiteur de la phosphodiesterase-5. Trois études ont été menées durant de courtes durées, dans un seul centre d'étude, chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque congestive et d'hypertension pulmonaire. Ces études ont démontré que le Sildénafil est bien toléré à des doses utilisées qui sont supérieures à celles recommandées pour le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire, améliore les fonctions hémodynamiques et le pic VO<sub>2</sub> (volume de dioxygène) et permet une vasodilatation pulmonaire au repos et à l'exercice (48, 339, 340, 343, 357-359). Cependant, ces résultats encourageants ont par la suite été contredits par l'étude RELAX (*phosphodiesterase-5 inhibition to improve clinical status And exercise capacity in diastolic heart failure*) réalisée chez une plus grande cohorte de patients atteints d'insuffisance cardiaque gauche et d'hypertension pulmonaire (340, 360, 361). Ainsi, dans cette étude, ni la capacité à l'exercice, ni le statut clinique des patients ne s'est amélioré (340, 361).

Actuellement, aucune médication prescrite pour le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire n'est approuvée pour traiter de manière spécifique et efficace

l'hypertension pulmonaire associée à des maladies du cœur gauche, parce que cette médication pourrait nuire à la sécurité des patients, et ce, en induisant de l'hypotension, de la congestion veineuse pulmonaire ou encore de l'œdème pulmonaire (339, 340). Ainsi, le traitement recommandé chez ces patients consiste plutôt à traiter en priorité la pathologie cardiaque gauche induisant l'hypertension pulmonaire, en s'assurant que la médication cardiaque est optimale pour stabiliser la pathologie cardiaque, tout en maîtrisant les facteurs de risques qui y sont associés (48, 336, 339, 346). D'ailleurs, il est reconnu que de diminuer l'ampleur de l'insuffisance cardiaque permet de restreindre la gravité de l'hypertension pulmonaire. Néanmoins, dû à l'augmentation faramineuse du risque de mortalité et de morbidité lors de la concomitance de ces deux pathologies, la quête d'un traitement spécifique et efficace pour l'hypertension pulmonaire associée aux maladies du cœur gauche s'avère d'autant plus importante. Enfin, puisque les études cliniques réalisées chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque et d'hypertension pulmonaire n'ont pas donné les résultats escomptés avec les diverses thérapies recommandées pour l'hypertension artérielle pulmonaire, il est donc clair que les mécanismes physiopathologiques impliqués en situation d'hypertension pulmonaire associée aux maladies du cœur gauche sont totalement distincts de ceux en HTAP. Ainsi, il s'avèrerait pertinent de cibler de nouvelles voies, autres que celles portant sur dysfonction endothéliale pulmonaire, tel que de bloquer la fibrose réactive pulmonaire, afin d'améliorer le pronostic des patients souffrant d'insuffisance cardiaque et d'hypertension pulmonaire.

### 1.3 LE DIABÈTE

Le diabète sucré (*diabetes mellitus*) est une pathologie métabolique caractérisée par une hyperglycémie sanguine qui provoque de nombreuses complications et qui accroît les risques de morbidité et de mortalité (1, 48, 362-364). Il est possible de diagnostiquer le diabète via un échantillon sanguin prélevé en condition à jeun. Les critères diagnostiques du diabète ont été établis par l'ADA (*American Diabetes Association*) et ils sont résumés dans le Tableau 6 (48, 362). Épidémiologiquement, le diabète est la pathologie chronique la plus fréquente à travers le monde, si bien qu'en 2008 l'Organisation Mondiale de la Santé rapportait qu'environ 347 millions de personnes en étaient atteintes, soit 9,5% de la population adulte (363, 364). De plus, les projections estiment que le nombre de patients atteints mondialement doublera d'ici à 2030 (363, 364). Le diabète touche principalement les populations des pays développés, cependant cette affirmation est de moins en moins véridique dû à la mondialisation actuelle (364). Ainsi, il est prévu que d'ici à 2030, ce seront les populations des pays en voie de développement de l'Afrique, de l'Asie, de l'Europe de l'est et de l'Amérique du sud, plus particulièrement le Brésil, qui subiront la plus grande augmentation de l'incidence de cette maladie (364). Le diabète est une maladie qui est induite soit via une incapacité à produire de l'insuline adéquatement (Diabète de type 1, DT1) ou encore via une réponse inefficace et insuffisante à l'insuline (Diabète de type 2, DT2) (1, 48, 362-364). Afin de bien comprendre l'étiologie des différents types de diabètes, voici d'abord des précisions concernant le métabolisme du glucose.

**Tableau 6 : Les critères diagnostiques du diabète**

<b>Ou</b>	<b>Glucose plasmatique à jeun (FPG) <math>\geq</math> à 7.0 mmol/L (FPG, <i>Fasting Plasma Glucose</i>)</b>
<b>Ou</b>	<b>Glucose plasmatique à 2 heures <math>\geq</math> à 11.1 mmol/L lors d'un test standardisé (OGTT, <i>75g Oral Glucose Tolerance Test</i>)</b>
<b>Ou</b>	<b>Symptômes d'hyperglycémie combinés à un glucose plasmatique non à jeun <math>\geq</math> à 11.1 mmol/L</b>
	<b>Hémoglobine Glycosylée (A1c) <math>\geq</math> 6,5%</b>

Tableau adapté de (48).



### 1.3.1 LE MÉTABOLISME DU GLUCOSE

Le pancréas est une glande principalement exocrine, composé à 99% d'*acinus* qui produisent les enzymes digestives, mais également une glande endocrine, composée à 1% d'îlots de Langerhans qui permettent, entre autres, de réguler la concentration plasmatique de glucose via la sécrétion d'hormones (1). Les îlots de Langerhans sont principalement constitués, à 70%, de cellules  $\beta$  qui sécrètent de l'insuline, dont le rôle consiste à réduire la glycémie sanguine (Voir Figure 47) (1). Les îlots pancréatiques sont également constitués de cellules  $\alpha$ , qui sécrètent l'hormone hyperglycémiant, le glucagon (Voir Figure 47) (1). Enfin, les îlots de Langerhans contiennent aussi les cellules  $\delta$ , qui sécrètent de la somatostatine, et les cellules PP, qui sécrètent des polypeptides pancréatiques (1).

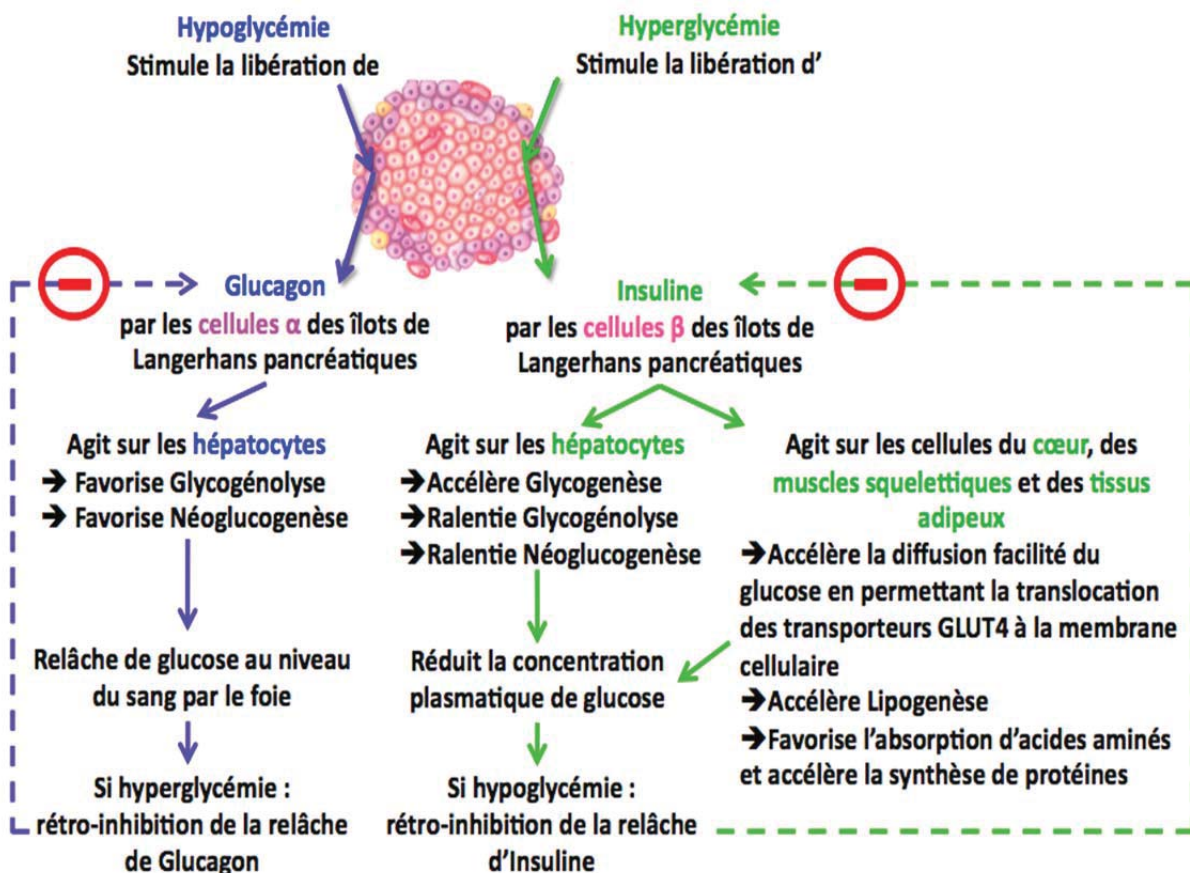
En situation d'hypoglycémie, ou de jeûne, il y a stimulation de la relâche de glucagon par les cellules  $\alpha$  des îlots de Langerhans (Voir Figure 47) (1). Le glucagon peut alors réaliser son action endocrine au niveau des hépatocytes pour favoriser la libération de glucose par ces cellules (Voir Figure 47) (1). Ainsi, le glucagon induit la glycogénolyse, soit la dégradation de glycogène en glucose, tout en stimulant la formation de glucose via la néoglucogenèse, soit la conversion d'acide lactique et d'acides aminés en glucose (Voir Figure 47) (1, 365). Il y a alors augmentation de la relâche de glucose au niveau sanguin, ce qui accroît la glycémie (Voir Figure 47) (1). Une augmentation de la concentration plasmatique de glucose au-delà des niveaux de glycémie normale provoque alors une boucle de rétro-inhibition où la sécrétion de glucagon est arrêtée (Voir Figure 47) (1). De plus, la relâche de somatostatine et d'insuline contribue aussi à inhiber la relâche de glucagon (1). Enfin, il n'y a pas que l'hypoglycémie qui stimule la relâche de glucagon. En effet, cette relâche est également induite via l'exercice physique, qui active le système nerveux sympathique, ainsi que via une augmentation de la concentration sanguine en acides aminés suite à la prise d'un repas riche en protéines (1).

En situation d'hyperglycémie, tel qu'à la suite de la consommation d'un repas, les cellules  $\beta$  des îlots pancréatiques relâchent de l'insuline dans le sang (Voir Figure 47) (1, 365). L'insuline est une hormone pléiotropique qui réalise de nombreuses fonctions afin de réaliser son action hypoglycémiant (Voir Figure 47) (1, 365, 366). L'action principale de l'insuline

consiste à favoriser la capture du glucose sanguin par les muscles squelettiques, les adipocytes et le cœur, tout en inhibant au niveau du foie la synthèse de glucose (glycogénolyse et néoglucogenèse) et la synthèse de VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) (1, 365). Pour faciliter la consommation du glucose par les cellules, l'insuline lie son récepteur tyrosine kinase, ce qui induit la translocation du transporteur de glucose sensible à l'insuline (GLUT4, *Glucose Transporter type 4*) du cytosol intracellulaire vers la membrane plasmique au niveau du muscle, du cœur et des adipocytes (365-369). En effet, le glucose étant une molécule hydrophile, il a absolument besoin de transporteurs pour traverser les membranes cellulaires (365, 368). Donc, en migrant à la surface cellulaire sous l'action de l'insuline, le transporteur GLUT4 permet le transport du glucose à l'intérieur de la cellule via diffusion facilitée (Voir Figure 47) (1, 365, 367, 368). D'ailleurs, les myocytes squelettiques et les adipocytes sont reconnus pour être des types cellulaires sensibles à l'insuline, dont la réponse à l'insuline est associée avec un transport rapide et transitoire de glucose (367). En somme, une fois le glucose à l'intérieur des cellules, il est consommé par celles-ci pour produire de l'énergie sous forme d'ATP (1, 365). De plus, l'insuline contribue à l'absorption d'acides aminés par les cellules pour favoriser la synthèse de protéines, et participe aussi à la lipogenèse, soit la synthèse d'acides gras et la formation de triglycérides à partir de glucose (Voir Figure 47) (1, 365, 366). Puis au niveau du foie, la glycogénèse, soit la conversion du glucose en glycogène, est favorisée par l'insuline afin d'emmagasiner le surplus de glucose (Voir Figure 47) (1, 365, 366). Si toutefois il demeure encore des excès de glucose au niveau du foie, et ce, malgré le métabolisme et le stockage de celui-ci sous forme de glycogène, alors l'insuline a pour effet de convertir le glucose résiduel en acides gras libres (365). Ces derniers sont alors transportés sous forme de triglycérides emmagasinés à l'intérieur des VLDL via la circulation sanguine jusqu'aux tissus adipeux, et enfin stockés, ce qui augmente la masse grasseuse de manière délétère (365). L'insuline réalise aussi d'autres actions que l'on peut qualifier d'antiathérogéniques, telles que d'inhiber la relâche d'acides gras libres par les tissus adipeux, accroître la production de monoxyde d'azote par les cellules vasculaires pour favoriser la vasodilatation et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (365). L'insuline est donc une hormone essentielle à un métabolisme adéquat du glucose et ses effets pléiotropiques permettent de protéger l'organisme. Enfin, à l'instar de ce qui est observé avec le glucagon, lorsque la concentration plasmatique de glucose atteint des niveaux normaux, une boucle de

rétro-inhibition est initiée pour arrêter la sécrétion d'insuline (Voir Figure 47) (1). La sécrétion de somatostatine contribue elle aussi à inhiber la relâche d'insuline, alors que le glucagon la stimule (1). De plus, la relâche d'acétylcholine via l'innervation parasympathique des îlots de Langerhans contribue à la sécrétion d'insuline, tout comme l'augmentation sérique d'arginine et de leucine, soit des acides aminés présents dans le sang à la suite de l'ingestion d'un repas contenant des protéines (1, 370-372). Finalement, la sécrétion d'insuline est également stimulée par les incrétines, soit le GLP-1 (*Glucagon-Like Peptide-1*) et le GIP (*Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide*), qui sont les hormones gastro-intestinales qui sont relâchées par les cellules exocrines de l'intestin grêle à la suite de l'augmentation de la glycémie postprandiale dans le tube digestif (1, 373, 374).

**Figure 47 : Le métabolisme du glucose**



L'hyperglycémie stimule la libération d'insuline, qui agit sur les hépatocytes. L'hypoglycémie induit la relâche de glucagon, qui agit sur les hépatocytes, les cellules du cœur, les muscles squelettiques et les tissus adipeux. (1) avec la permission de Pearson ERPI.

### **1.3.2 LES TYPES DE DIABÈTE**

En plus des deux types classiques de diabète largement documentés et décrits plus bas, le diabète peut être induit par une condition particulière ou encore via des défauts génétiques. Ainsi, le diabète peut être provoqué chez la femme lors de la grossesse, ou encore peut être secondaire à des défauts génétiques responsables de la fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques, à des défauts génétiques entourant l'action de l'insuline, à des maladies de la partie exocrine du pancréas, à des endocrinopathies, à l'action de drogues ou de produits chimiques, à des infections, à des syndromes génétiques associés avec le diabète ou encore à des formes non communes de diabète induit par des réponses immunes (362, 364).

#### ***1.3.2.1 Le diabète de type 1***

Le DT1, ou diabète insulino-dépendant, ou diabète juvénile, est la forme de diabète la moins fréquente, ne touchant que de 5 à 15% de la population diabétique (1, 362, 364). Ce type de diabète est caractérisé comme étant juvénile, puisqu'il touche majoritairement des enfants, des adolescents ou de jeunes adultes de 20 ans et moins, mais il peut également survenir chez toutes les catégories d'âge et même chez les personnes octogénaires (1, 362, 364). Le DT1 est caractérisé par une destruction auto-immune des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans pancréatiques, ce qui résulte en une incapacité à sécréter de l'insuline proportionnellement à l'atteinte des cellules  $\beta$  (1, 362, 364). D'ailleurs, le rythme de destruction des cellules  $\beta$ , et conséquemment l'atteinte globale du patient, est très variable d'un DT1 à l'autre (362). En effet, ce rythme peut être beaucoup plus rapide, principalement chez les enfants, alors qu'il peut être plus lent chez d'autres, soit principalement chez les adultes (362). Puisque les cellules ont absolument besoin de l'insuline pour favoriser la diffusion facilitée du glucose à l'intérieur des cellules, alors le manque d'insuline force les cellules à utiliser une source d'énergie différente du glucose. Ainsi, les acides gras sont consommés par les cellules afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP (1). Ce faisant, un des symptômes possibles associé avec le développement d'un DT1 est une perte de poids importante. Cependant, cette caractéristique de perte pondérale n'est pas *sine qua non* chez les patients diabétiques de type 1, car une faible proportion de patients peuvent présenter cette

forme de diabète et être à la fois obèse (362). De plus, la dégradation des acides gras pour produire l'ATP est associée avec la synthèse de corps cétoniques, qui peuvent engendrer une acidocétose pouvant parfois être létale si elle n'est pas traitée rapidement (1, 362, 364). Le DT1 présente de nombreux signes biologiques caractéristiques, tel qu'une soif excessive (polydipsie), une urination excessive (polyurie) associée avec la présence anormale de glucose dans les urines (glycosurie) et de corps cétoniques dans les urines, une consommation excessive d'aliment (polyphagie) associée avec une perte pondérale (1). De plus, les marqueurs plasmatiques de la condition diabétique sont évidemment présents chez les patients DT1, soit l'hyperglycémie, ainsi une fraction élevée d'hémoglobine A1c glycosylée, donc liée à des molécules de glucose (Voir Tableau 6) (48, 362). Une analyse sanguine permet également de détecter des marqueurs qui sont propres au développement du DT1, soit des autoanticorps associés avec le développement de la maladie auto-immune, tels les autoanticorps des cellules de l'îlot, les autoanticorps de l'insuline, les autoanticorps de la décarboxylase de l'acide glutamique, ainsi que les autoanticorps de la tyrosine phosphatase membranaire (IA-2 et IA-2 $\beta$ ) (362). Toutefois, il peut arriver, dans 10 à 15% des cas, qu'un diagnostic de DT1 soit fait en l'absence de la présence de ces autoanticorps. Alors le DT1 est caractérisé d'idiopathique, donc qui n'est pas de nature auto-immune et sans étiologie connue (362).

Les facteurs menant au développement de la maladie auto-immune ne sont pas encore complètement élucidés (362, 364). Toutefois, il paraît clair que le DT1 a une composante à la fois environnementale et génétique (362, 364). Ainsi, 40 à 50% des causes héréditaires du DT1 ont été identifiées (362, 364). En effet, la présence de certaines variantes des allèles de la famille des gènes formant le complexe HLA (*Human Leukocyte Antigen*), plus particulièrement les gènes HLA-DQB1, HLA-DRB1 et HLA-B\*39, est associée avec une prédisposition à développer le DT1 (362, 364).

### ***1.3.2.1.1 Les thérapies du diabète de type 1***

Dû à sa nature insulino-dépendante, la thérapie utilisée pour stabiliser le DT1 consiste fondamentalement à des injections multiples d'insuline quotidiennement, ou à l'utilisation de pompes sous-cutanées qui relâchent en continu l'insuline (1, 375). Ces patients doivent aussi effectuer une vérification régulière de leurs taux glycémiques, avoir une alimentation équilibrée, prendre leurs repas à des heures fixes et faire de l'exercice (1, 375). La transplantation vascularisée pancréatique permet de normaliser les niveaux de glycémie et d'hémoglobine glycosylée (376). Toutefois, des complications chirurgicales peuvent survenir et il est essentiel de recourir à une thérapie immunosuppressive d'induction et de maintien (376). Cette chirurgie permet d'améliorer significativement la qualité de vie des patients DT1, mais un phénomène de rejet peut survenir (376). Afin d'améliorer la tolérance et de réduire la survenue de complications chirurgicales, la greffe de cellules des îlots pancréatiques est à l'étude (376). Enfin, une nouvelle approche thérapeutique consiste à créer et implanter un pancréas bionique/artificiel qui pourrait mesurer en continue la concentration de glucose sanguin (CGM, *Continuous Glucose-Monitoring*) et réagir aux déviations à la concentration normale en sécrétant de l'insuline, et s'il y a lieu du glucagon (375). Cette technologie digne des meilleurs films de science-fiction semblerait être possible, puisque les technologies de CGM sont désormais au point, tant en termes de performance que de précision (375). Ainsi, selon Peyser et ses collègues, tout est mis en place pour débiter la réalisation de prototypes commerciaux de pancréas artificiels à tester dans des études cliniques avec de très larges cohortes de patients (375).



### ***1.3.2.2 Le diabète de type 2***

Le DT2, autrefois qualifié de diabète non insulino-dépendant, est le type de diabète le plus fréquent, touchant de 85 à 95% des patients diabétiques (1, 362, 364). La plupart du temps, ce type de diabète est présent chez des patients adultes et obèses, mais l'incidence de cette maladie augmente de manière inquiétante chez les enfants et les adolescents (1, 362). Le DT2 peut également toucher des personnes âgées minces et apparemment en santé, dû à une perte d'activité mitochondriale qui induit la résistance à l'insuline chez ces patients (369). Globalement, le DT2 est associé avec le développement d'une résistance périphérique à l'insuline, principalement au niveau des adipocytes, des hépatocytes et des myocytes squelettiques, donc une incapacité des cellules à absorber le glucose, malgré une concentration normale d'insuline (364, 365). Cette résistance induit initialement une hypersécrétion d'insuline par le pancréas afin de maintenir une glycémie normale (365). Cependant, lorsque les besoins métaboliques surpassent les réserves d'insuline, alors l'hyperinsulinémie ne parvient plus à maintenir la glycémie normale (365). Cela se traduit alors en une hyperglycémie, et conséquemment, au développement du DT2 (364, 365). Une autre caractéristique de ce type de diabète est que l'hyperinsulinémie peut aussi mener à une dysfonction relative de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques (362). Ainsi, on peut retrouver différents niveaux d'atteintes en fonction de la progression de la pathologie (362). Certains patients peuvent souffrir principalement d'une résistance à l'insuline et de manière secondaire d'une légère déficience de sécrétion d'insuline, alors que chez d'autres patients, la progression du DT2 est telle que la résistance à l'insuline a mené à une déficience de la sécrétion d'insuline très importante (362). D'ailleurs, chez les patients à un stade avancé de la pathologie, l'utilisation d'injection d'insuline peut être requise lorsque la dysfonction de sécrétion d'insuline est trop grande (1, 377). Ceci explique pourquoi la nomenclature «non insulino-dépendant» ne permet plus de qualifier adéquatement le DT2.

Plusieurs éléments peuvent être responsables du développement d'une résistance à l'insuline (365). Une des premières causes est l'obésité, le surpoids ainsi que l'obésité abdominale, et ces troubles sont associés avec un emmagasinage accru d'acides gras libres dans les tissus adipeux, ainsi qu'une déposition d'acides gras libres au niveau du foie et des

muscles (362, 365, 369). D'ailleurs, les personnes en surpoids, donc ayant un IMC (Indice de Masse Corporelle) supérieur ou égal à 25, présentent un risque accru de 3 fois de développer le DT2, comparativement aux personnes qui ont un poids santé (369, 378). De plus, une étude a démontré que des obèses, soumis à un régime hypocalorique et faible en gras, qui perdent aussi peu que 8% de leur masse en 8 semaines réduisent leur contenu graisseux hépatique de 81%, ce qui permet d'améliorer leur sensibilité hépatique à l'insuline ainsi que leurs taux glycémiques sanguins à jeun, qui passent de 8.8 mmol/L à 6.4 mmol/L (369, 379). Les acides gras libres présents au niveau du foie sont transformés en triglycérides et en glucose, ce qui contribue à accroître la concentration plasmatique de glucose et à augmenter la sécrétion d'insuline par le pancréas, ce qui mène à l'hyperinsulinémie (365). De plus, les acides gras libres réduisent directement la sensibilité à l'insuline des cellules musculaires en inhibant la voie de signalisation de l'insuline qui permet la translocation du récepteur GLUT4 à la membrane plasmique (365, 369). En effet, l'insuline permet normalement la phosphorylation du substrat-1 du récepteur à l'insuline (IRS-1, *Insulin Receptor Substrat-1*), qui une fois phosphorylé lie et active la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), ce qui contribue à activer la translocation du transporteur GLUT4 à la membrane plasmique des cellules musculaires (369). Or, il a été démontré qu'une augmentation de la concentration sanguine d'acides gras chez l'humain est associée avec une abolition de l'activation du IRS-1 par l'insuline, ainsi qu'une perte d'activité de la PI3K au niveau des myocytes (369, 380).

En plus de l'excès d'acides gras libres, d'autres pathologies ou mutations génétiques peuvent mener au développement d'une résistance à l'insuline : une mutation qui cause une obésité génétique ou une mutation du récepteur à l'insuline, un excès d'hormones de croissance et de glucocorticoïdes, la grossesse, un syndrome des ovaires polykystiques, une lipodystrophie ou la présence d'autoanticorps contre le récepteur à l'insuline (365). En somme, les facteurs de risques associés au développement du DT2 sont l'obésité, la sédentarité, l'âge et une prédisposition génétique (362). Puisque le développement de l'hyperglycémie est très graduel, les patients sont pratiquement asymptomatiques et une analyse sanguine est essentielle pour établir le diagnostic (Voir Tableau 6) (362). Ainsi, de nombreux patients peuvent demeurer non diagnostiqués durant de longues périodes (362). Ce faisant, l'hyperglycémie non normalisée accroît significativement les risques de développer les

complications microvasculaires et macrovasculaires chez ces patients non pris en charge (Voir Section 1.3.3) (362).

#### ***1.3.2.2.1 Les thérapies du diabète de type 2***

La première thérapie du DT2 consiste à restreindre l'apport calorique et à augmenter la dépense énergétique afin de favoriser la perte pondérale et réduire l'obésité abdominale (1, 377). En combinaison avec les mesures non pharmacologiques, il existe 9 grandes classes de médicaments qui peuvent être employées par les patients DT2. Tout d'abord, il est reconnu que la Metformine est un médicament antihyperglycémique qui est prescrit en première ligne avec les modifications des habitudes de vie, puisque cette biguanide a été démontrée efficace à réduire la mortalité et la survenue d'évènements cardiovasculaires et qu'en plus elle n'est pas associée avec des risques d'hypoglycémie (377, 381-384). La Metformine est un pilier de la thérapie antidiabétique et contribue à limiter l'hyperglycémie en réduisant la production hépatique de glucose, puisqu'elle inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale des hépatocytes, ce qui réduit la production énergétique et entraîne conséquemment une diminution de la néoglucogenèse (382, 384). En plus de son action hépatique, la Metformine favorise aussi la consommation de glucose par les cellules non hépatiques, principalement les muscles squelettiques et les adipocytes, afin de réduire l'hyperglycémie (365, 384). La Metformine est également reconnue pour réduire l'appétit, diminuer l'absorption intestinale, réduire les taux d'acides gras libres et diminuer la dysfonction endothéliale (365, 385, 386).

Les Sulfonylurées, tel le Glimépiride, et les Glinides, tel le Répaglinide, sont quant à elles des classes de thérapies antidiabétiques qui favorisent la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans (384). Les Sulfonylurées contribuent à la sécrétion d'insuline en deux temps : elles lient les récepteurs SUR1 (*SulfonylUrea Receptor-1*) de la membrane plasmique des cellules  $\beta$  pour permettre la relâche d'insuline préformée présente à l'intérieur de granules adjacentes à cette membrane, mais contribue aussi à la translocation de granules contenant de l'insuline de l'intérieur de la cellule vers la membrane plasmique (384). Les Glinides agissent quant à elles de manière rapide et dépendante à l'élévation de la glycémie pour favoriser la relâche d'insuline en liant un récepteur SUR présent à la membrane

plasmique des cellules  $\beta$  (384). Ainsi, les Glinides doivent être prises avant les repas et il s'agit de la médication recommandée pour les patients DT2 chez lesquels la Metformine n'est pas efficace et qui ne s'alimentent pas à des moments stables dans la journée (377, 384). Ces deux classes d'insulinosécréteurs sont toutefois moins utilisées en raison d'un risque accru d'hypoglycémie et de gain pondéral (377, 384). De plus, tel que spécifié plus haut, lorsque l'atteinte diabétique est si importante qu'elle provoque une déficience de la sécrétion d'insuline, alors, une des thérapies employées peut consister en une injection d'insuline (1, 377, 384). Toutefois, à l'instar des Sulfonylurées et des Glinides, les injections d'insuline peuvent accroître les risques d'hypoglycémie (377).

Dans l'optique de contrer les risques de survenue d'hypoglycémie, d'autres familles de médicaments ont été développées. La famille des inhibiteurs des enzymes intestinales  $\alpha$ -glucosidase, tel l'Acarbose, est une thérapie antihyperglycémique qui est recommandée lorsque la pathologie diabétique s'est récemment instaurée, puisque cette médication contribue à diminuer l'hyperglycémie secondaire à la prise des repas en ralentissant la digestion des carbohydrates (377, 384). Une autre astuce consiste à améliorer la sensibilité des récepteurs à l'insuline (365, 369, 377, 384). Ainsi, les Thiazolidinediones, telle la Rosiglitazone, sont des ligands synthétiques des récepteurs nucléiques qui sont fortement exprimés par les adipocytes, soit les récepteurs PPAR $\gamma$  (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$* ) (365, 384). Lorsqu'il est activé, ce qui est induit de manière endogène par les acides gras libres, le récepteur PPAR $\gamma$  forme un hétérodimère avec un autre récepteur nucléaire, le *Retinoid X Receptor* (384). La transcription de certains gènes associés au métabolisme des gras et des sucres est activée ou supprimée afin de stimuler la lipogenèse et la différenciation des pré-adipocytes, ce qui permet d'améliorer l'entreposage des gras au niveau des tissus adipeux (369, 384). Alors, la distribution des gras est plus adéquate, ce qui réduit l'accumulation de gras au niveau des hépatocytes et des myocytes squelettiques, en plus de réduire la concentration plasmatique d'acides gras libres (365, 369). La résultante de ces actions permet d'accroître l'activité du transporteur GLUT4 et la glycogénèse au niveau des myocytes squelettiques, ce qui contribue à réduire le taux de glucose sanguin (369, 384). Une autre approche thérapeutique consiste à bloquer la dégradation du GLP-1 (*Glucagon-Like Peptide-*

1), une incrétine qui, tel que décrit plus haut à la Section 1.3.1, contribue à la relâche d'insuline à la suite d'un repas (377). Ainsi, les inhibiteurs de la Dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4), telle la Sitagliptine, bloquent l'enzyme DPP-4 qui dégrade le GLP-1 (377). De cette façon, les inhibiteurs de la DPP-4 contribuent à diminuer la concentration plasmatique de glucose en augmentant la relâche d'insuline et en bloquant la sécrétion de glucagon, via une augmentation de la concentration de GLP-1 (377). Il est important de noter que les inhibiteurs de DPP-4, les Thiazolidinediones, ainsi que la Metformine sont des thérapies antihyperglycémiques efficaces seulement si l'organisme est encore apte à synthétiser de l'insuline (377, 384).

Enfin, deux dernières catégories de traitements antidiabétiques ont été approuvées et commercialisées très récemment, soit depuis la fin de l'année 2013 (377, 387). Il s'agit des inhibiteurs SGLT-2 (*Sodium GLucose coTransporter-2*), telle la Dapagliflozine, et les agonistes des récepteurs du GLP-1, tel l'Albiglutide (377, 387, 388). Les agonistes des récepteurs du GLP-1 permettent de mimer l'action de cette incrétine en liant les récepteurs du GLP-1, et conséquemment ils permettent de stimuler la libération d'insuline et d'inhiber la relâche de glucagon pour réaliser l'action antihyperglycémique (387). De plus, cette thérapie injectable permet de potentialiser l'effet du GLP-1 et favorise ainsi davantage la perte de poids que les inhibiteurs de DPP-4 en augmentant la satiété au niveau de l'hypothalamus et en ralentissant la vidange de l'estomac (377, 387). Les inhibiteurs SGLT-2 réalisent quant à eux leur action antihyperglycémiant en augmentant l'excrétion urinaire de glucose, puisque le co-transporteur de glucose et de sodium SGLT-2 est présent au niveau des cellules épithéliales du tubule contourné proximal rénal et est responsable de 90% de la réabsorption du glucose au niveau du filtrat urinaire (387, 388).

Une large gamme de thérapies antidiabétiques est actuellement disponible pour les patients DT2 qui ne présentent qu'une faible déficience de sécrétion d'insuline. La Metformine est encore à ce jour le «Gold Standard» pour tout patient qui ne présente pas de contre-indications à utiliser cette thérapie (377). Toutefois, les habitudes de prescriptions risquent probablement d'être modifiées prochainement avec l'arrivée des inhibiteurs SGLT-2 et des agonistes des récepteurs du GLP-1, qui ont tous deux pour avantage de favoriser significativement la perte de poids et de réduire le risque d'hypoglycémie (377, 387).

Cependant, la compliance à la thérapie demeure encore à ce jour un obstacle majeur à contourner, car les patients qui présentent le DT2 sont pour la plupart asymptomatiques. Ainsi, une étude réalisée en 1999-2000, par la *National Health and Nutrition Examination Survey*, a révélé qu'aussi peu que 36% des patients pris en charge étaient parvenus à normaliser leurs taux de glycémie sanguine avec les thérapies disponibles à l'époque (378, 387). Or, il est reconnu qu'une hyperglycémie non normalisée accroît significativement les risques de complications diabétiques (362). Il paraît donc clair que le combat contre le diabète ne se limite pas à la découverte de nouveaux agents antihyperglycémiques, mais qu'il doit aussi inclure une éducation constante, ainsi que des prises de positions claires de la part des gouvernements en matière d'information et d'affichage nutritionnel. Néanmoins, nous savons tous que la prévention a malheureusement des effets limités. C'est pourquoi mieux comprendre les mécanismes associés avec le développement des complications diabétiques s'avère d'autant plus important, puisque l'incidence du diabète ne cesse de croître, tant dans les pays développés qu'en voie de développement, et que cette pathologie est associée avec de nombreuses comorbidités.



### 1.3.3 LES COMPLICATIONS DU DIABÈTE

Le diabète est associé avec de nombreuses complications aiguës et chroniques pouvant affecter la qualité de vie des patients, provoquer des dommages aux tissus et aux organes, en plus d'accroître significativement les risques de morbidité et de mortalité chez ces patients (364, 389, 390). D'ailleurs, ce sont ces complications qui sont responsables en majorité de la morbidité et de la mortalité des patients atteints à la fois de DT1 et de DT2 (391). Ainsi, de manière aiguë, le diabète peut entraîner une acidocétose en situation d'hyperglycémie sévère, ou encore un coma diabétique en situation d'hypoglycémie majeure (364). Une élévation chronique de la glycémie sanguine est quant à elle la source majeure des complications vasculaires, tant fonctionnelles, structurelles, qu'anatomiques, qui peuvent provoquer la dysfonction d'un organe (389, 390, 392). Les complications chroniques du diabète peuvent également inclure la dépression, la démence et les dysfonctions érectiles (364).

Les maladies vasculaires diabétiques résultent principalement de modification de la réponse inflammatoire au niveau de la paroi vasculaire, ce qui engendre des dysfonctions des cellules endothéliales et des CML (393). On retrouve donc des complications microvasculaires, telle que la neuropathie, la néphropathie et la rétinopathie, ainsi que des complications macrovasculaires, tels des dysfonctions myocardiques, des maladies des artères périphériques et un risque accru de maladies cardiovasculaires, d'infarctus du myocarde et d'accident cérébro-vasculaire, (364, 389-391, 393, 394). Les complications microvasculaires affectent des vaisseaux de petit calibre, soit les capillaires, les artérioles et les petites artères de résistance, alors que les complications macrovasculaires affectent des vaisseaux de moyen et gros calibre (364, 389, 393). Malgré le fait que les complications microvasculaires et macrovasculaires touchent des vaisseaux de tailles différentes, l'origine du développement de ces maux est semblable (mais pas identique), et ce, qu'il soit secondaire à un DT1 ou de DT2 (389, 391). Évidemment, les deux types de diabète sont associés avec l'hyperglycémie sanguine, qui contribue de manière importante à initier les complications vasculaires, alors que seul le DT2 initie en plus des complications vasculaires en raison de la résistance à l'insuline (389). Toutefois, il est important de noter que l'endothélium des vaisseaux de petits et gros calibres ne répond pas identiquement au glucose et à l'insuline (393, 395). Ceci peut donc

expliquer pourquoi la progression des microvasculopathies peut être retardée avec un contrôle stricte de la glycémie, contrairement aux macrovasculopathies, tels que l'on démontré l'étude DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial*) chez les patients DT1 et l'étude UKPDS (*United Kingdom Prospective Diabetes Study*) chez les patients DT2 (390, 393, 396, 397).

La résistance à l'insuline provoque les complications vasculaires en favorisant une relâche accrue et anormale d'acides gras libres par les adipocytes et en activant les voies de signalisation de la PKC (Protéine Kinase C), ce qui augmente la production de ROS et inhibe alors l'activité de la eNOS (389). La résultante de ces actions est une perte importante de production de la molécule vasodilatatrice du NO, ce qui altère significativement la capacité vasodilatatrice (389). L'hyperglycémie chronique a quant à elle un effet central dans l'initiation de troubles structuraux et métaboliques puisqu'elle contribue à accroître la production d'AGE (*Advanced Glycation End products*) via la glycation non-enzymatique, active la voie de signalisation de la PKC, augmente la production de ROS et active aussi anormalement le système Rénine-Angiotensine et la voie du polyol (389-391).

Les complications vasculaires diabétiques sont fréquentes, affectant de 30% à 40% des patients diabétiques, puisque nombreux sont les facteurs de risques (390). En effet, en plus de l'hyperglycémie et de la résistance à l'insuline, la dyslipidémie, l'obésité, l'hypertension et la consommation tabagique s'ajoutent à cette liste de facteurs (389). Voici donc une description des différentes complications microvasculaires ou macrovasculaires diabétiques associées à des modifications structurelles et fonctionnelles de la vascularisation sanguine.

### ***1.3.3.1 Les complications microvasculaires du diabète***

Les complications microvasculaires diabétiques sont majoritairement attribuables à une hyperglycémie chronique (391). Divers mécanismes provoquant les dommages des microvaisseaux via l'hyperglycémie ont été identifiés, soit une accumulation d'AGE, une production de stress oxydatif, ainsi qu'une stimulation anormale des voies de signalisation de la PKC et du polyol (aldose réductase) (389, 391, 398, 399). L'activation de ces mécanismes initie des complications microvasculaires en altérant la fonction hémodynamique, en

provoquant des dysfonctions endothéliales, en activant des cellules inflammatoires et en modifiant l'expression de facteurs vasculaires et neuronaux (391).

#### ***1.3.3.1.1 Les neuropathies diabétiques***

Les neuropathies diabétiques affectent jusqu'à 50% des patients diabétiques et sont caractérisées par l'apparition de symptômes ou de signes qui témoignent d'une dysfonction des nerfs et des vaisseaux périphériques (364, 389, 391, 398, 400, 401). Les patients atteints peuvent présenter divers symptômes, certains étant dits positifs, puisqu'ils induisent une sensation de douleur sous forme de brûlures, de piqûres d'aiguilles ou de chocs électriques à des stimuli normalement indolores (allodynie), et d'autres dits négatifs, puisqu'ils sont associés à une perte de sensation (391, 398). Le développement des neuropathies périphériques diabétiques est caractérisé au niveau anatomique par un épaissement des axones et de la membrane basale, mais également par une perte de péricytes et de microfilaments ainsi qu'un amincissement des capillaires neuronaux (389, 391). Ces atteintes directes des axones et de leur vascularisation sont induites par l'hyperglycémie chronique, mais peuvent également être attribuables à la combinaison d'autres altérations métaboliques, telles qu'une résistance à l'insuline, une dysfonction endothéliale, une dysfonction microvasculaire ainsi qu'une toxicité des adipocytes (398). Ainsi, c'est une perte de vascularisation neuronale, donc une ischémie neuronale, qui est à l'origine de la dégénérescence neuronale, de la perte d'axones et qui empêche également la régénération de la gaine de myéline, ce qui mène au développement des neuropathies périphériques diabétiques (389, 391, 398).

En plus des neuropathies du système nerveux sensoriel, les neuropathies diabétiques peuvent aussi inclure une dysfonction de l'automatisme cardiaque, qui se traduit par un rythme cardiaque anormal, ainsi qu'une dysfonction du système nerveux autonome, reflétée par une difficulté à maintenir le tonus vasculaire (364, 389). Les neuropathies diabétiques combinées à une vascularisation périphérique affaiblie peuvent également entraîner des fractures aux pieds ou aux chevilles, ainsi que la formation d'ulcères aux pieds (364, 389, 402, 403). D'ailleurs, les ulcérations secondaires des neuropathies diabétiques sont la cause la plus fréquente, en

l'absence d'un trauma, d'amputations des membres inférieurs chez les populations occidentales (391, 403, 404). Enfin, il est essentiel de souligner, dans le cadre de cette thèse, que la neuropathie diabétique est fortement impliquée dans l'altération des processus de cicatrisation ainsi qu'au niveau de la dysfonction cardiovasculaire (364).

### ***1.3.3.1.2 La néphropathie diabétique***

La néphropathie est une importante complication microvasculaire du DT1 et du DT2, mais elle est également la première cause du développement d'insuffisance rénale terminale (*end-stage renal failure*) (364, 389, 391). De plus, la néphropathie diabétique entraîne un risque accru de développer des complications macrovasculaires diabétiques, telle que la survenue d'un infarctus du myocarde ou d'un accident vasculaire cérébral, en plus d'accroître la morbidité et la mortalité cardiovasculaire (364, 405). Cette complication microvasculaire s'instaure progressivement et est le résultat de la combinaison d'anormalités hémodynamiques (système Rénine-Angiotensine) et métaboliques (hyperglycémie, accumulation d'AGE, activation anormale de la voie de signalisation du polyol) secondaires au diabète et qui interagissent avec des voies signalétiques qui induisent la production de ROS (389, 391, 405). Ainsi on observe d'abord des modifications anormales de la fonction hémodynamique glomérulaire, qui progressent ensuite vers une hyperfiltration glomérulaire (389, 391). Des dommages glomérulaires sont induits, tels qu'un épaissement de la membrane basale du glomérule et une hypertrophie du glomérule, et sont perceptibles via la présence de microalbuminurie (364, 389, 391, 399). Lorsqu'une accumulation excessive d'ECM (fibronectine, collagène de types I et IV) et une réduction des protéoglycanes surviennent dans le mésangium glomérulaire, alors les patients atteints peuvent développer une sclérose et une fibrose rénale et tubulaire associées à un rythme réduit de filtration glomérulaire et à une albuminurie (364, 389, 391, 399). De plus, la néphropathie diabétique est caractérisée par une perte de podocytes, soit des cellules épithéliales de la capsule de Bowman qui s'enroulent autour des capillaires glomérulaires pour ne laisser que de petits espaces de filtration, qui précède le développement de la microalbuminurie (405, 406). En somme, c'est l'accumulation de changements structurels, tels que la podocytopathie, l'accumulation d'ECM et la sclérose glomérulaire, et de changements fonctionnels, tels qu'une augmentation de la perméabilité et

une réduction du rythme de filtration, qui font progresser le stade de la néphropathie diabétique, allant de la microalbuminurie, à l'albuminurie, à l'insuffisance rénale et finalement à l'insuffisance rénale terminale (364, 389, 391, 399).

#### **1.3.3.1.3 La rétinopathie diabétique**

La rétinopathie diabétique est une complication microvasculaire très fréquente, si bien qu'elle atteint environ 75% des patients diabétiques chez lesquels la maladie est instaurée depuis plus de 15 ans (391). La rétinopathie diabétique afflige à la fois les patients DT1 et DT2 et a pour conséquence une perte de vision partielle à totale chez les patients atteints (389, 391, 407, 408). D'ailleurs, cette complication diabétique est à l'origine de la majorité des cas de perte de vue, non traumatique, chez les adultes des pays industrialisés (364, 391, 408). La rétinopathie diabétique est caractérisée par une dysfonction et une occlusion vasculaire, une modification de la perméabilité vasculaire, la présence d'œdème au niveau de la rétine, des hémorragies oculaires, ainsi que par une angiogenèse inappropriée pouvant provoquer le détachement de la rétine (364, 391, 407, 408). D'ailleurs, la survenue d'angiogenèse au niveau de l'œil de patients diabétiques est un phénomène difficile à comprendre, puisqu'à travers le reste de l'organisme un environnement diabétique va plutôt restreindre la capacité à former *de novo* des vaisseaux sanguins (Voir Section 1.3.4.2.1) (409-411). Ce qui semble distinguer l'œil du reste de l'organisme est un niveau accru de la protéine VEGF au niveau du liquide vitré de l'œil des patients présentant une rétinopathie diabétique (391, 407, 412). Or, le VEGF est un facteur de croissance reconnu pour favoriser l'angiogenèse, puisqu'il est induit par l'hypoxie et qu'il est un puissant agent mitogène dont le rôle consiste à assurer la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales (407, 410). De plus, le VEGF est le facteur de croissance majoritairement impliqué dans la progression de la rétinopathie diabétique, puisqu'il peut non seulement favoriser l'angiogenèse, mais également contribuer à l'œdème au niveau de la rétine (407). En effet, le VEGF induit la désorganisation des jonctions serrées des cellules endothéliales (407). Or ces jonctions serrées sont essentielles à la structure de la barrière hémato-rétinienne qui protège de la survenue de fuites et de la formation concomitante d'œdème (407, 408). D'ailleurs, des lésions au niveau de la région neurosensorielle de la rétine constituent une autre composante du développement de la

rétinopathie diabétique (407). Ainsi, peu de temps après l'établissement de la condition diabétique, une neurodégénérescence survient et provoque une perte de fonction neuronale rétinienne (391, 407). De plus, l'hyperglycémie induit quant à elle des changements fonctionnels de la vascularisation de la rétine, allant d'une altération du flux sanguin rétinien, à une hypoxie localisée (391). Cette perte de vascularisation rétinienne est associée avec une perte précoce de péricytes, qui sont des cellules contractiles qui enrobent les cellules endothéliales capillaires pour assurer le tonus de ces vaisseaux (389, 391). L'établissement de l'environnement diabétique induit aussi de manière précoce une altération des voies de signalisations des récepteurs à l'insuline rétiniens, dû à une perte de capacité d'autophosphorylation de ces récepteurs et à une diminution de l'activité d'Akt, qui contribue à la détérioration fonctionnelle de la rétine et à la progression de la rétinopathie diabétique (413, 414). Enfin, une autre modification biochimique qui contribue fortement à la progression de la rétinopathie diabétique est la production de stress oxydatif, puisque la rétine est un des tissus les plus sensibles à ce stress et qu'en plus l'hyperglycémie produit la perte de péricytes, dont un des rôles consiste à protéger des dommages induits par les ROS (389, 408). La rétinopathie diabétique se développe donc en deux grandes phases (364). La première phase est non-proliférative et inclut la perte de péricytes, l'épaississement de la membrane basale, la dégradation de la barrière hémato-rétinienne et l'augmentation de la perméabilité vasculaire (364). La seconde phase est quant à elle proliférative et est associée avec l'occlusion vasculaire qui initie l'angiogenèse et l'œdème au niveau de la rétine, pouvant conjointement mener à des hémorragies et au décollement de la rétine (364).

### ***1.3.3.2 Les complications macrovasculaires du diabète***

Le développement des complications macrovasculaires est essentiellement secondaire à des dommages de l'endothélium des vaisseaux sanguins (389). Ainsi, une perte de la capacité vasodilatatrice de l'endothélium associée à une production excessive de facteurs vasoconstricteurs, telle l'endothéline-1, provoquent la dysfonction endothéliale (389). De manière spécifique, l'hyperglycémie affaiblit la réponse vasodilatatrice en inhibant directement l'enzyme eNOS, qui permet la synthèse de la molécule vasodilatatrice (NO) (389). L'hyperglycémie peut aussi inhiber indirectement cette enzyme en favorisant la



production de ROS (389). La résistance à l'insuline provoque également une inhibition directe et indirecte de l'activité de l'eNOS, puisqu'elle accroît la production de ROS en induisant la voie de signalisation de la PKC et en favorisant la relâche d'acides gras libres au niveau plasmatique (389, 415). Donc, l'hyperglycémie et la résistance à l'insuline provoquent une dysfonction de l'endothélium vasculaire qui est reconnue pour contribuer à générer une plaque d'athérosclérose (364, 416). D'autres mécanismes contribuent aussi au développement des macrovasculopathies diabétiques, soit l'accumulation d'AGE, la dysfonction des CML, la surproduction de facteurs de croissance endothéliaux, l'inflammation, la perte de capacité fibrinolytique, ainsi qu'une fonction accrue d'agrégation plaquettaire (389).

#### ***1.3.3.2.1 Les maladies cardiovasculaires***

Les patients diabétiques ont de 2 à 4 fois plus de risque de développer des maladies cardiovasculaires que les patients non diabétiques de même âge et même nationalité (48, 417). De plus, la présence du diabète peut être comparable, en termes de facteur de risque de maladies cardiovasculaires, à vieillir de 15 ans, et la présence du diabète est en plus considérée comme étant un facteur de risque supérieur à la consommation tabagique (48, 418). Les diabétiques, mais plus spécifiquement les patients DT2, présentent fréquemment de nombreux facteurs de risques associés avec le développement de maladies cardiovasculaires, telles que la dyslipidémie, l'hypertension et l'obésité abdominale (389). D'ailleurs, la combinaison de ces 3 comorbidités avec l'hyperglycémie est connue sous le terme de syndrome métabolique (389, 419).

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité et de morbidité chez les patients atteints de DT2 et sont associées à environ 70% des décès des patients diabétiques (389, 417, 419, 420). Il est également reconnu que les patients atteints de maladies cardiovasculaires et du diabète ont un pronostic et un taux de survie réduit, ont un risque accru de présenter à nouveau des pathologies cardiovasculaires, répondent moins efficacement à des traitements chirurgicaux et présentent davantage de risque de développer de l'insuffisance cardiaque congestive, comparativement aux patients non diabétiques (417). Voici donc des précisions concernant diverses maladies cardiovasculaires fréquentes chez les

patients diabétiques, soit l'infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque et les cardiomyopathies, ainsi que les accidents vasculaires cérébraux.

#### **1.3.3.2.1.1 L'infarctus du myocarde**

Une des principales causes de l'infarctus du myocarde est la présence d'une plaque d'athérosclérose. (364). Or, le diabète, via l'hyperglycémie chronique et la résistance à l'insuline, favorise la formation de plaques d'athérosclérose en provoquant une dysfonction endothéliale (364, 416). De plus, le diabète induit également une inflammation chronique et stimule la formation de caillots sanguins via une fonction accrue d'agrégation plaquettaire et une perte de capacité fibrinolytique (389, 421). Il paraît donc évident que le diabète est un très grand facteur de risque d'infarctus du myocarde, si bien qu'un patient diabétique a autant de chance de subir un infarctus du myocarde qu'un patient non diabétique ayant déjà eu un événement ischémique (364, 389, 422). De plus, les patients diabétiques sont 5 fois plus susceptibles de subir un infarctus que les patients non-diabétiques et le diabète double le risque de survenue d'un second événement ischémique (389, 390). En plus d'accroître le risque d'événement, le diabète réduit aussi de manière significative le pronostique des patients atteints (389). En effet, les patients diabétiques ont un taux de mortalité significativement plus élevé à la suite d'un infarctus du myocarde et présentent aussi un risque accru que cet événement ischémique progresse en insuffisance cardiaque congestive, comparativement aux patients non-diabétiques qui subissent un infarctus du myocarde (48, 59, 65, 389, 390, 423-426). Ces pronostiques négatifs sont attribuables à une fibrose réparative cardiaque altérée et à une réponse délétère au niveau du myocarde non-ischémié (Voir Section 1.3.4).

#### **1.3.3.2.1.2 L'insuffisance cardiaque et la cardiomyopathie diabétique**

La cardiomyopathie diabétique est un dommage du myocarde qui est induit par la condition diabétique et qui mène à une dysfonction ventriculaire structurelle et fonctionnelle, mais indépendante de l'hypertension et des maladies des artères coronaires (364, 427). Ainsi, la cardiomyopathie diabétique est caractérisée par une dysfonction diastolique, dont l'étendue est plus importante en présence d'événement ischémique ou d'hypertension (364, 390, 427).

D'ailleurs, une dysfonction diastolique est observée chez 40 à 75% des patients diabétiques (428). L'hyperglycémie ainsi que la résistance à l'insuline sont toutes deux impliquées dans le développement de la cardiomyopathie diabétique (48, 429). De manière spécifique, la résistance à l'insuline altère le métabolisme des substrats (48, 429). Ainsi, chez des patients sains, le myocarde utilise principalement des acides gras libres en condition aérobie, puis passe à l'utilisation de glucose à titre de substrat en condition anaérobie (48, 429). Or, ce changement de substrat, ainsi que l'entrée de glucose dans la cellule, est aboli chez les patients qui présentent une résistance à l'insuline (48, 429). L'hyperglycémie chronique provoque quant à elle la glycation du collagène, ce qui résulte en une raideur myocardique et une perte d'inotropisme (427). D'autres mécanismes induits par le diabète contribuent aussi à réduire la contractilité myocardique, soit une homéostasie calcique altérée, une activation du système Rénine-Angiotensine, une dysfonction mitochondriale et une production accrue de stress oxydatif et d'AGE (48, 427).

Une fois que la dysfonction diastolique associée à la cardiomyopathie diabétique est installée, celle-ci peut alors évoluer cliniquement en insuffisance cardiaque (364). D'ailleurs, le diabète accroît de 2 à 5 fois le risque de développer une insuffisance cardiaque, lorsque l'on compare des patients diabétiques de même âge que des patients non-diabétiques (48, 390, 425, 429). Ainsi, chez les populations diabétiques, la prévalence de l'insuffisance cardiaque congestive est de 10 à 23 %, soit d'environ 3 fois supérieur à ce qui est observé chez les patients non-diabétiques (430).

#### **1.3.3.2.1.3 L'accident vasculaire cérébral**

Le diabète est un facteur de risque important d'accident vasculaire cérébral (AVC), si bien qu'il accroît de 2 à 4 fois le risque de survenue de cette maladie cérébro-vasculaire chez les diabétiques comparativement aux individus non-diabétiques (389, 431, 432). À l'instar de l'infarctus du myocarde, le diabète augmente significativement le risque d'AVC puisque l'hyperglycémie et la résistance à l'insuline contribuent à la formation de plaques d'athérosclérose, qui sont présentes au niveau des artères intracrâniennes, plutôt qu'au niveau des artères coronaires (364, 389, 431). Ainsi, les mécanismes associés avec une survenue plus

fréquente d'AVC chez les diabétiques inclus une augmentation de l'inflammation chronique et une activation de la cascade de coagulation (431). Enfin, le diabète accroît le risque que l'accident vasculaire cérébral soit mortel, augmente l'incidence d'AVC secondaires, induit des AVC avec des déficits neurologiques plus sévères et réduit le pronostic de réhabilitation des patients atteints (389, 431).

#### ***1.3.3.2 La maladie des artères périphériques***

En 2003, 3.5 Millions de patients diabétiques américains présentaient la maladie des artères périphériques (389, 433). La maladie des artères périphériques est instaurée principalement en raison de l'hyperglycémie chronique (389, 434). De plus, elle est caractérisée par une occlusion des artères des extrémités inférieures, ce qui peut entraîner de la claudication intermittente ainsi que de la douleur, menant à une perte de capacité fonctionnelle chez les patients atteints, et ce, plus particulièrement lors de la réalisation d'un exercice ou d'une activité (389, 435-438). D'ailleurs, les diabétiques qui présentent une forme sévère de la maladie des artères périphériques peuvent subir des complications fréquentes de cette pathologie, soit des ulcérations des pieds pouvant parfois mener à l'amputation de membres inférieurs (389, 439). Enfin, les amputations des extrémités inférieures sont 15 fois plus fréquentes chez les patients diabétiques, comparativement aux patients sains (389, 440).

### **1.3.4 LES IMPACTS DU DIABÈTE SUR LE REMODELAGE CARDIAQUE ET PULMONAIRE**

Le diabète est un mauvais facteur pronostique chez les patients qui subissent un infarctus du myocarde, c'est-à-dire qu'il est associé avec un plus faible taux de survie post-infarctus, ainsi qu'un risque accru de progression de cet événement ischémique vers l'insuffisance cardiaque (48, 59, 65, 389, 423-426). D'ailleurs, Luo et ses collègues ont démontré, via un modèle de souris DT1 auquel on induit chirurgicalement un infarctus du myocarde (MI), que le diabète accroît significativement la mortalité à la suite de l'événement ischémique (59, 441). Ainsi, 3 à 4 jours suivant la ligature complète de l'artère coronaire, 70% à 80 % des souris DT1+MI étaient décédées, ce qui correspond à un ratio de décès deux fois supérieur à celui des souris non-diabétiques qui subissent l'infarctus. (59, 441). Plusieurs éléments sont responsables de ce phénomène. Globalement, le diabète est associé avec des effets délétères au niveau du myocarde non ischémié, avec une altération de la fibrose réparative essentielle à une cicatrisation cardiaque efficace, ainsi qu'avec du remodelage et des dysfonctions pulmonaires (59, 65, 160, 426).

#### ***1.3.4.1 Le diabète induit des effets délétères au niveau de la région non-ischémisée du myocarde et sur la fonction cardiaque***

Une étude réalisée par Shiomi et ses collègues a permis de démontrer pour la première fois en 2003 que l'hyperglycémie associée à la condition diabétique a des impacts délétères à la suite d'un infarctus du myocarde, puisqu'elle favorise la progression de cette pathologie vers l'insuffisance cardiaque, et ce, malgré l'absence d'hypertension ou de maladie des artères coronaires (426). Ainsi, cette étude a établi que chez un modèle de souris qui présente un infarctus de myocarde (MI, via la ligature de l'artère coronaire) et le DT1 (via une injection de Streptozotocine (STZ)), qui est cytotoxique spécifiquement pour les cellules  $\beta$  pancréatiques), la fonction ventriculaire gauche est largement affectée (426). En effet, les souris MI+DT1 présentaient une diminution de capacité d'éjection du ventricule gauche, une dysfonction systolique et une dilatation du ventricule gauche, ainsi qu'un remodelage accru du myocarde gauche (426). Ce remodelage délétère est caractérisé par une fibrose réactive cardiaque, soit

une déposition accrue de collagène interstitiel au niveau du myocarde à distance de la région ischémisée (426). De plus, chez les souris MI+DT1, il y avait une augmentation significative de l'apoptose des cardiomyocytes de la région entourant la cicatrice et de la région non-ischémisée, ce qui a fort probablement initié davantage le processus de fibrose réactive, afin de remplacer les cardiomyocytes morts (426). Également, chez un modèle d'ischémie-reperfusion, l'induction du DT1 via la STZ est associée avec une exacerbation de la dysfonction contractile (426, 442). D'ailleurs, en l'absence de condition ischémique, le diabète a des effets négatifs *per se* sur le myocarde, tels que provoquer une dysfonction contractile ventriculaire gauche, tant systolique que diastolique (65, 443, 444). De plus, le diabète initie à lui seul une hypertrophie cardiaque excentrique caractérisée par une expression accrue de l'ARNm de l'ANP au niveau du myocarde de rats DT1 (65, 443).

#### ***1.3.4.2 Le diabète altère la fibrose réparative permettant la formation de la cicatrice cardiaque***

L'importance de l'angiogenèse et de la neurogenèse dans le processus de fibrose réparative initié à la suite d'une ischémie cardiaque a déjà été mise en relief. Il est toutefois reconnu dans la littérature que le diabète affaiblit largement le processus de cicatrisation des plaies à travers l'organisme en diminuant les réponses angiogéniques et neurogéniques (59, 65, 409-411, 445-448). Ainsi, le processus de cicatrisation cardiaque est altéré, ce qui mène conséquemment à un mauvais facteur pronostique chez les individus diabétiques qui subissent un événement ischémique (59).

##### ***1.3.4.2.1 Le diabète altère la réponse angiogénique***

En plus de générer de nombreuses complications microvasculaires et de favoriser le développement de maladies des artères périphériques, le diabète est associé avec des anomalies vasculaires, ainsi qu'une réponse altérée de la néovascularisation normalement initiée en condition ischémique (65, 409-411, 449-451). D'ailleurs, chez les patients diabétiques, il y a une diminution de la formation de collatérales cardiaques (390, 410, 411, 452). Plusieurs éléments sont impliqués dans l'altération du processus physiologique de



revascularisation en condition diabétique. Tout d'abord, l'utilisation d'un modèle de souris transgénique (Lepr<sup>db/db</sup>), où une mutation du récepteur de la leptine génère des animaux naturellement obèses et DT2, a permis d'établir que l'expression de nombreux facteurs proangiogéniques est altérée par le diabète à la suite d'une lésion ischémique (410). Or, ces facteurs, dont le VEGF-A, les métalloprotéinases de la matrice, l'élastine et la neuropiline-1, ont pour fonction d'assurer la croissance et le maintien de l'intégrité des parois vasculaires (410). De plus, chez un modèle de DT1, où des souris reçoivent l'injection d'une toxine spécifique aux cellules  $\beta$  pancréatiques (Alloxane), l'environnement diabétique réduit significativement l'expression de protéines impliquées dans la signalisation du processus d'angiogenèse, qui est normalement activé en situation d'ischémie chronique au niveau du myocarde (411). Ainsi, chez ce modèle, non seulement l'expression du VEGF est réduite, mais l'expression du récepteur de l'angiopoïétine-1 (Tie-2) l'est également (411). À l'inverse, l'expression protéique de facteurs anti-angiogéniques, soit l'angiostatine et l'endostatine, est significativement augmentée au niveau du myocarde de ce modèle diabétique à la suite de l'évènement ischémique, ce qui constitue un second mécanisme d'altération de la revascularisation en condition diabétique (411). Un troisième élément impliqué dans la perte de capacité angiogénique en condition diabétique est la réduction du recrutement et la perte de fonction des cellules progénitrices endothéliales, puisque celles-ci ont un rôle important dans la réparation vasculaire en réponse à un stress (393, 409). De plus, il a été observé que la condition diabétique est associée avec un ralentissement de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales au niveau du derme de la peau (409). Enfin, chez des rats DT1 et DT2 (*Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats*) l'environnement diabétique entraîne une modification du phénotype des cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup>, ce qui peut altérer le rôle biologique de ces cellules (Voir Section 1.3.5) (6, 65). Or, les cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> sont reconnues pour leur participation à l'angiogenèse lors de la cicatrisation post-infarctus du myocarde (62).

Il est cependant important de noter qu'il existe un paradoxe angiogénique associé avec le développement du diabète (393). Ainsi, au niveau de l'œil diabétique, l'angiogenèse est fortement activée, ce qui contribue à la détérioration de la rétinopathie diabétique (364, 393). Une réponse angiogénique accentuée des *vasa vasorum* des parois vasculaires semble aussi

être initiée en condition diabétique, ce qui peut induire des hémorragies et contribuer à l'instabilité de la plaque d'athérosclérose et de la rupture de celle-ci (393). Alors que dans le reste de l'organisme, l'angiogenèse est fortement entravée, ce qui correspond à un processus endommagé de cicatrisation des plaies et à une détérioration de la condition générale et de la qualité de vie des patients diabétiques (59, 65, 410). Certains mécanismes pourraient être à l'origine de ce paradoxe (393), mais la description de ceux-ci est hors propos dans le cadre de cette thèse. Le développement d'une résistance des récepteurs au VEGF-A en fonction du temps semble être un élément important, mais n'est pas l'unique hypothèse proposée (393, 453).

#### ***1.3.4.2.2 Le diabète altère la réponse neurogénique***

L'atrophie et la dégénérescence axonale sont reconnues comme étant des caractéristiques importantes du développement pathologique des neuropathies diabétiques, plus particulièrement en situation de perte sensitive sévère, et ces phénomènes ont été observés au niveau des nerfs et de la peau de biopsies de patients diabétiques (409, 454, 455). De plus, il a été démontré, chez un modèle expérimental de souris DT1 que l'environnement diabétique induit des défauts de régénération des lésions au niveau des nerfs périphériques (409, 456). Un phénomène similaire a également été observé chez l'humain, puisque Polydefkis et ses collègues ont observé que, malgré l'absence d'une neuropathie périphérique diagnostiquée, les patients diabétiques ont des taux réduits de croissance axonale régénérative, ce qui témoigne que des anomalies de la fonction nerveuse surviennent précocement dans l'établissement de la condition diabétique (409, 448). De plus, les modèles animaux et humains diabétiques ont un nombre réduit de nerfs au niveau de la peau, ce qui résulte en un impact négatif sur la réponse à une lésion et au processus de cicatrisation des plaies (447). Ebenezer et ses collaborateurs ont quant à eux identifié que la réalisation d'une axotomie chimique, via la capsaïcine, chez des patients diabétiques qui présentent des neuropathies, est associée avec des troubles de régénération nerveuse, où la croissance des cellules de Schwann, des fibres nerveuses dermiques et des vaisseaux sanguins est significativement réduite, comparativement à des témoins sains qui subissent la même axotomie chimique (409). D'ailleurs, le processus de régénérescence neuronale, tant chez les patients sains que

diabétiques, nécessite une importante collaboration entre l'angiogenèse et la neurogenèse, puisque la croissance des vaisseaux sanguins précède la régénérescence des fibres nerveuses dermiques (409). Ainsi, le réseau vasculaire nouvellement créé pourrait fournir un échafaudage qui favorise la croissance des cellules de Schwann, qui supportent quant à elles la croissance des axones (409, 446). En définitive, l'environnement diabétique est délétère, tant pour les structures vasculaires que neuronales, puisqu'il réduit la croissance, la migration et la maturation des différents type cellulaires qui participent à l'angiogenèse et à la neurogenèse dans le processus de cicatrisation des plaies (409).

En plus de ses impacts négatifs au niveau des nerfs périphériques et de la peau, le diabète a aussi des effets délétères sur le cœur. Ainsi, les patients diabétiques sont à risque de subir un infarctus du myocarde silencieux, soit une cause majeure de mort subite chez les diabétiques, puisque le diabète provoque des dommages aux nerfs sensoriels cardiaques (445). Ce faisant, les patients atteints ne reçoivent pas les signaux de douleurs normalement initiés lors de l'ischémie cardiaque (445). Enfin, les troubles neurogéniques myocardiques diabétiques pourraient également inclure une neurogenèse affaiblie, provoquant une cicatrisation cardiaque altérée à la suite d'un infarctus du myocarde. En effet, notre laboratoire a établi par le passé que l'environnement DT1 et DT2 entraîne une modification du phénotype des cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> (CSNPRCN<sup>(+)</sup>) (Voir Section 1.3.5) (65). Conséquemment, les fonctions de ces cellules peuvent être altérées chez les diabétiques (65). Or, les CSNPRCN<sup>(+)</sup> peuvent acquérir un phénotype neuronale et de cette façon contribuer à la neurogenèse lors de la cicatrisation cardiaque (62). Ainsi, il serait pertinent d'évaluer si, à la suite de l'infarctus du myocarde, l'environnement diabétique empêche bel et bien la différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal, contribuant ainsi à une réponse neurogénique altérée et à une cicatrisation cardiaque inadéquate chez les diabétiques (Voir Chapitre 2).

### ***1.3.4.3 Le diabète entraîne un remodelage pulmonaire dysfonctionnel***

Plusieurs études ont démontré que le diabète est associé avec un risque accru de remodelage et de dysfonctions pulmonaires (160, 457-460). Toutefois, à ce jour, les complications pulmonaires secondaires de la condition diabétique ne font pas partie des complications vasculaires ‘classiques’ mentionnées plus haut (461). Vracko et ses collaborateurs ont remarqué en 1979 que les patients diabétiques présentent un épaissement marqué de la membrane basale de l'épithélium alvéolaire et de l'endothélium des capillaires pulmonaires comparativement à des individus sains d'âge comparable (458, 460, 461). Malgré cette découverte fascinante, ce n'est qu'au début du 21<sup>ème</sup> siècle que diverses équipes de recherche se sont penchées davantage sur les effets du diabète sur la fonction pulmonaire, puisque la venue d'insuline sous forme d'inhalateur nécessitait d'accroître les connaissances dans ce domaine, afin d'assurer une utilisation sécuritaire de cette thérapie pour les patients diabétiques (458, 462-464). Certes, d'autres études ont été réalisées dans les années 80 et 90, mais les résultats discordants n'ont pas permis d'établir avec certitude les impacts de la condition diabétique sur la fonction pulmonaire (458, 465). Dans l'optique de clarifier cette divergence des résultats, Van Der Brost et ses collègues ont réalisé une méta-analyse où 40 études ont été incluses selon des critères préétablis (458). Via cette méta-analyse, les auteurs ont pu conclure qu'en l'absence de maladie pulmonaire déclarée, le diabète est associé avec une modeste dysfonction pulmonaire significative (458). Ils ont également établi que cette dysfonction est secondaire aux deux types de diabètes, mais le DT2 semble altérer davantage la fonction pulmonaire (458). De plus, Van Der Brost et ses collègues ont découvert que le mécanisme qui est principalement impliqué dans la dysfonction pulmonaire diabétique est un syndrome restrictif pulmonaire, qui est associé avec la présence de fibrose pulmonaire (458, 461). Ainsi, la méta-analyse de tests de spirométrie a révélé que les patients diabétiques présentaient plus fréquemment, que les individus non-diabétiques, des valeurs inférieures aux valeurs de références (selon leur catégorie d'âge, de sexe et de taille) des paramètres qui révèlent la présence du syndrome restrictif pulmonaire, soit le FEV1 (*Forced Expiratory Volume in 1 second*), le FVC (*Forced Vital Capacity*) et le DL<sub>CO</sub> (*Diffusion capacity of the Lungs for Carbon Monoxide*) (458, 461). D'ailleurs, une étude réalisée par Schnack et ses collaborateurs a révélé que les patients DT1 et souffrant de néphropathie diabétique (observée

via la présence de microalbuminurie), présentent davantage de dysfonction pulmonaire restrictive que les patients DT1 dont le rythme d'excrétion d'albumine est normale (457, 461). De plus, il a été démontré que les patients diabétiques sont plus à risque de développer de la fibrose pulmonaire que des individus sains de même sexe et âge (461, 466). En somme, certaines études témoignent d'une présence accrue de fibrose pulmonaire chez les patients diabétiques ainsi que chez des modèles animaux diabétiques et cette fibrose pulmonaire diabétique est associée avec un épaissement des membranes basales épithéliales et endothéliales pulmonaires et une déposition excessive des protéines de l'ECM (160, 457-461, 467).

Une piste proposée pour expliquer le développement de fibrose pulmonaire en condition diabétique est l'implication potentielle des AGE, qui sont fortement impliqués dans le développement des complications microvasculaires et macrovasculaires diabétiques (389, 458). En effet, la glycation non-enzymatique du collagène et de l'élastine pourrait être associée à une rigidité de l'épithélium pulmonaire, puisque ces éléments de l'ECM sont essentiels à la formation d'un réseau tridimensionnel d'enchevêtrements qui confère la force et l'élasticité au tissu connectif pulmonaire (458, 468). Ainsi, un taux accru de lysine liée au glucose de manière non-enzymatique a été observé au niveau du parenchyme pulmonaire de patients DT2, comparativement à des individus non-diabétiques (468, 469) Toutefois, une relation directe entre la glycation non-enzymatique et les AGE n'a pas été établie dans l'optique d'élucider les mécanismes impliqués dans la fibrose pulmonaire diabétique (458).

De plus, l'activation du système Rénine-Angiotensine semble également être impliquée dans le développement de la fibrose diabétique (467). Yang et ses collaborateurs ont utilisé un modèle de souris OVE26 DT1, dont la condition diabétique est instaurée depuis 3 mois via des injections de STZ (467). Ces souris ont développé une fibrose réactive pulmonaire, qui a pu être inhibée via l'administration d'un antagoniste des AT1R, le Losartan (160, 467). D'ailleurs, un phénomène similaire est observé chez un modèle sévère d'infarctus du myocarde chez le rat, associé avec la prolifération de myofibroblastes pulmonaires et le développement d'une hypertension pulmonaire, puisque l'administration d'un antagoniste des AT1R, l'Irbésartan, a contribué à réduire significativement la fibrose pulmonaire, tout en

améliorant la fonction pulmonaire et en réduisant l'hypertrophie ventriculaire droite (160, 311, 470). Une étude subséquente réalisée par les membres du laboratoire de Dr. Dupuis a ensuite établi que l'antagonisme des AT1R pulmonaires est imputable, au moins en partie, de l'amélioration de la condition pulmonaire de ces rats (471). En effet, deux semaines à la suite de l'infarctus du myocarde chez le rat, on observe que la concentration plasmatique de l'Angiotensine II est doublée et est associée avec un niveau 6 fois plus important d'Angiotensine II pulmonaire et une expression accrue des AT1R (471). Ces récepteurs ont ensuite été identifiés au niveau des myofibroblastes pulmonaires, dont la prolifération est augmentée par une stimulation *in vitro* avec l'Angiotensine II (471). Or, la fibrose réactive pulmonaire est associée avec une prolifération accrue des myofibroblastes pulmonaires (23, 295, 296, 310, 311, 330-332). Il serait donc pertinent d'évaluer l'implication de ce type cellulaire dans le développement du remodelage et du dysfonctionnement pulmonaire en condition diabétique (Voir Chapitre 3). Fait intéressant, Yamazaki et ses collaborateurs ont identifié que les voies de signalisation des AGE et du système Rénine-Angiotensine collaborent pour stimuler la prolifération des fibroblastes cardiaques, contribuant ainsi à la fibrose cardiaque dans le développement de la cardiomyopathie diabétique (472).



### 1.3.5 LE DIABÈTE ET LA NESTINE

Le diabète modifie le phénotype des cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> (65). Afin d'étudier ce phénomène, un modèle de rat DT1 a été réalisé via une injection de STZ (65). Trois semaines suivant cette injection, les rats ont développé une cardiomyopathie diabétique révélée par une dysfonction systolique et diastolique ventriculaire gauche (65). Comparativement au myocarde de rats témoins, le myocarde de rats diabétiques présente une réduction marquée d'élongations immunoréactives Nestine<sup>(+)</sup> provenant de cellules souches neurales Sox9<sup>(+)</sup> intercalées entre les cardiomyocytes (65). De plus, le contenu protéique et d'ARNm de Nestine est significativement réduit au niveau du ventricule gauche des rats diabétiques comparativement à celui des rats témoins (65). Toutefois, cette perte d'expression n'est pas secondaire à une apoptose accrue des cellules souches neurales en condition diabétique, puisqu'un essai TUNEL a confirmé la quasi absence de réponse apoptotique au niveau du myocarde diabétique (65). Cette étude a également démontré l'implication de l'hyperglycémie dans le mécanisme provoquant la perte d'expression de Nestine par les cellules souches neurales du myocarde diabétique (65). Ainsi, des injections d'insuline chez des rats diabétiques avec une hyperglycémie installée ont non seulement permis de réduire la concentration de glucose plasmatique, mais ont également contribué à une restitution partielle d'élongations immunoréactives Nestine<sup>(+)</sup> provenant de cellules souches neurales (65). En effet, le myocarde des rats diabétiques ayant reçu de l'insuline avait un nombre d'élongations supérieur à celui des rats diabétiques, mais toutefois inférieur à celui des rats témoins (65).

La caractérisation du phénotype des cellules souches neurales résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> en condition diabétique s'est poursuivie avec un modèle de DT2 (65). Les rats ZDF présentent une hyperglycémie, une hyperinsulinémie, de l'obésité, ainsi qu'une réduction, au niveau du myocarde gauche, de l'expression protéique et d'ARNm de la Nestine comparativement à des rats témoins (65). Cependant, la réduction d'expression protéique de la Nestine est disproportionnellement plus grande que celle de l'ARNm de la Nestine, ce qui suggère une modification post-traductionnelle qui contribue à une dégradation accrue de la protéine (65). D'ailleurs, il a été établi par Mellodew et ses collaborateurs que lors de la

différenciation des cellules souches neurales, une perte d'expression de Nestine peut être secondaire à la dégradation protéique (65, 473). De plus, une hyperglycémie *in vitro* peut engendrer la dégradation protéique post-traductionnelle (65, 474). Afin de confirmer la présence d'une dégradation protéique post-traductionnelle, notre équipe a employé un autre modèle *in vivo* d'hyperglycémie (65). En effet, l'administration d'un corticostéroïde, le Dexaméthasone, durant 6 jours chez des rats a provoqué une augmentation du taux de glucose plasmatique, via un mécanisme de résistance à l'insuline (65, 475, 476). De plus, chez ces rats, il y avait une perte d'élongations Nestine<sup>(+)</sup> et une réduction hautement significative de l'expression protéique de la Nestine au niveau du myocarde, comparativement à des rats témoins (65). Toutefois, l'expression d'ARNm de la Nestine était similaire chez les rats témoins et les rats hyperglycémiques, suggérant un potentiel mécanisme de dégradation protéique de la Nestine post-traductionnelle en condition hyperglycémiant (65).

Ces résultats révèlent qu'un environnement hyperglycémique entraîne une perte d'expression protéique de la Nestine par les cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> et que cette modification est impliquée dans le développement de la cardiomyopathie diabétique (65). Connaissant le rôle fondamental de ces cellules à titre de substrat neurogénique dans la réponse cicatricielle initiée à la suite d'un infarctus du myocarde (62), il s'avère alors approprié d'établir les conséquences de la condition diabétique sur l'expression de la Nestine par les CSNPRCN<sup>(+)</sup> lors d'un événement ischémique, ainsi que les impacts sur leur rôle dans le processus de fibrose réparative (Voir Chapitre 2).

## 1.4 LA NESTINE

### 1.4.1 LES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES

La Nestine est une protéine filamenteuse intermédiaire. Les filaments intermédiaires forment, avec les microfilaments et les microtubules, le cytosquelette des cellules eucaryotes (1, 477-479). Ils ont été nommés ainsi, car les filaments intermédiaires sont de taille intermédiaire (10 nm), c'est-à-dire de taille plus large que les microfilaments d'actine (7 nm) et plus mince que les microtubules de tubuline (25 nm) (1, 478-480). La localisation des filaments intermédiaires est étendue à l'ensemble du cytoplasme ainsi qu'au niveau du noyau, plus particulièrement dans les régions cellulaires associées avec de grandes tensions mécaniques (1, 478, 479). Ainsi, les filaments intermédiaires ont pour fonction principale le maintien de l'intégrité structurelle de la cellule, puisqu'ils résistent au stress de tension mécanique, et ils contribuent aussi à la régulation de l'architecture cellulaire, car ils permettent l'encrage du noyau et des organites (1, 477, 481, 482). De plus, les filaments intermédiaires contrôlent les événements signalétiques associés avec la croissance, la régénération, la migration, la survie et l'apoptose cellulaire, ou encore en réponse à un stress ou un dommage (477, 478, 481).

Les filaments intermédiaires sont composés d'une multitude de protéines fibreuses, qui une fois assemblées forment une structure robuste, stable et non-polarisée (1, 479, 481, 482). Il existe environ 70 protéines filamenteuses intermédiaires différentes, dont l'expression varie beaucoup d'un tissu à l'autre, et qui sont regroupées en 6 grandes classes (Voir Tableau 7) (478, 479, 481, 483-486). Ces catégories permettent de rassembler des protéines filamenteuses intermédiaires dont le motif d'expression et la position des introns sont similaires et qui présentent des séquences ressemblantes (487, 488). Généralement, les types I à IV regroupent des protéines filamenteuses intermédiaires retrouvées dans le cytoplasme, alors que le type V rassemble des protéines filamenteuses intermédiaires nucléiques (477). Le dernier type regroupe les protéines qui ne se classifient pas parmi les cinq autres catégories (480). Ainsi, la Nestine est une protéine filamenteuse intermédiaire de type VI, mais qui est parfois aussi classée dans le type IV (477, 480, 483, 485, 486, 489).

**Tableau 7 : Les 6 grands types de filaments intermédiaires**

Type	Protéines	Poids Moléculaire (kDa)	Cellules ou Tissus où on les retrouve
Type I	Kératine Acide	40-60	Cellules Épithéliales
Type II	Kératine neutre ou basique	50-70	Cellules Épithéliales
Type III	Vimentine Desmine GFAP Périphérine	57 53 50 57	Cellules musculaires et cellules mésenchymateuses Cellules musculaires Cellules Gliales et Astrocytes Neurones périphériques et centraux
Type IV	NF-L NF-M NF-H Internexine- $\alpha$	67 150 200 66	Neurones matures Neurones matures Neurones matures SNC en développement
Type V	Lamine A-B-C	67-70	Noyaux de toutes les cellules
Type VI	Nestine Synémine Paranémine	240 187 178	Cellules souches neuronales, nerfs et muscles en développement Muscles, Foie, Cerveau Cellules musculaires

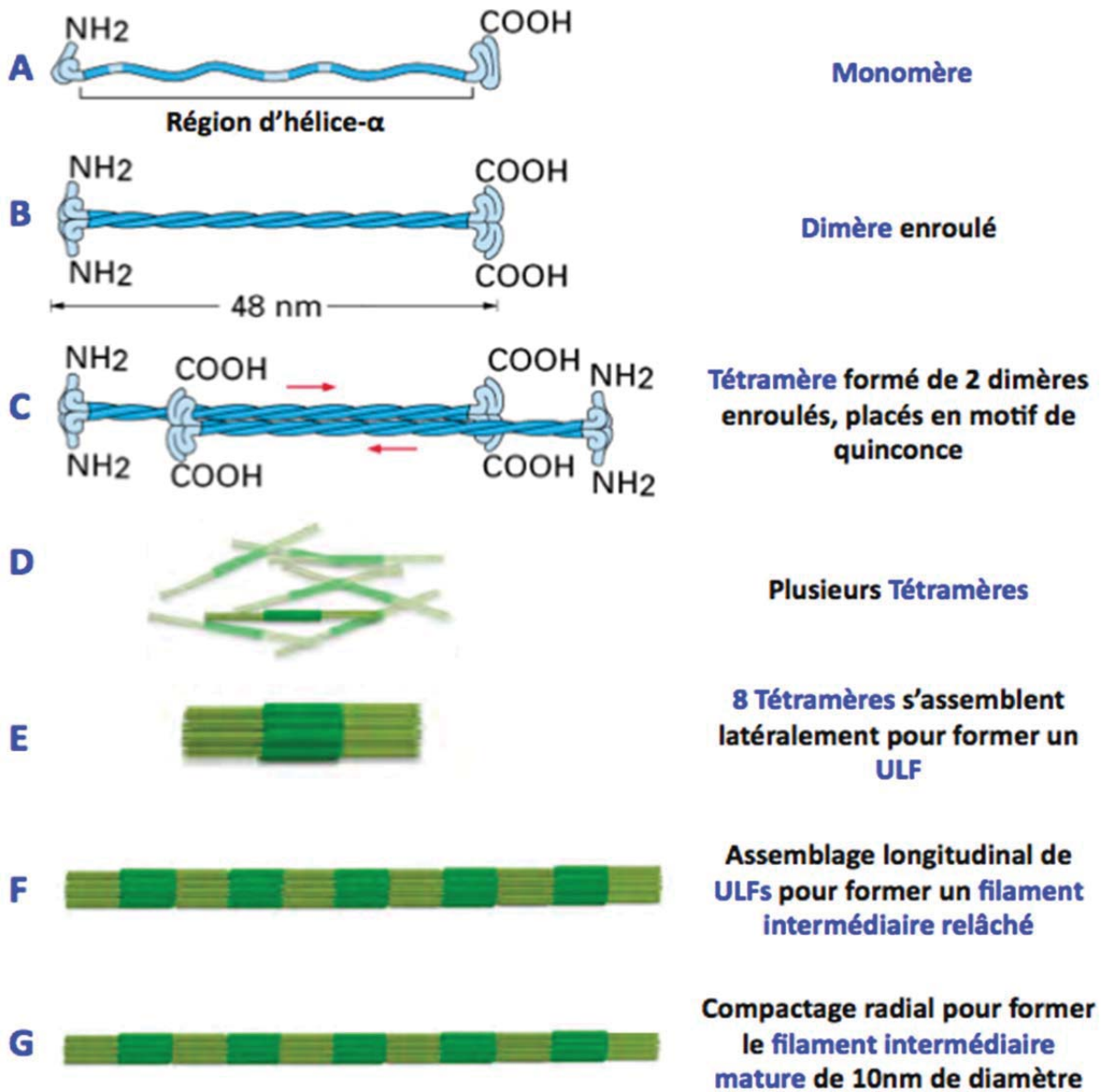
GFAP; *Glial Fibrillary Acidic Protein*, NF-L; *Neurofilament-Light*; NF-M; *Neurofilament-Medium*, NF-H; *Neurofilament-High*, SNC; *Système Nerveux Central*. *Tableau adapté de (479) et (481).*

Structurellement, les filaments intermédiaires sont composés de protéines fibreuses très allongées, caractérisées par un domaine central d'hélice- $\alpha$  en forme de tige (Voir Figure 48 A) (479, 481, 482). La séquence du domaine central est composée d'environ 310 résidus, elle correspond à un motif bispiralé et elle est similaire d'un filament intermédiaire à l'autre (479, 482). De part et d'autre de ce domaine central, il y a une tête amino-terminale (N-terminale) et une queue carboxy-terminale (C-terminale), qui sont toutes deux non-hélicoïdales, mais bien plutôt de forme globulaire (Voir Figure 48 A) (479, 482). Puisque ce sont ces domaines qui sont responsables de la spécificité des différentes protéines filamenteuses intermédiaires, alors,

leurs tailles et leurs séquences d'acides aminés varient beaucoup d'une protéine à l'autre (479, 482). En somme, les filaments intermédiaires sont formés via l'assemblage de protéines fibreuses (Voir Figure 48) (479, 482). Pour ce faire, 2 protéines monomériques identiques alignent leur hélice- $\alpha$  en parallèle et s'enroulent pour former un homodimère (479, 482). Toutefois, ce ne sont pas toutes les protéines qui sont aptes à former des homodimères (482). Ainsi, la Nestine, en raison de sa courte extrémité N-terminale, doit former des hétérodimères avec la Vimentine ou la Desmine (6, 490, 491). Une fois formés, 2 dimères s'assemblent de manière antiparallèle pour obtenir un tétramère (479, 481, 482). Cet assemblage est réalisé en suivant un motif de quinconce, pour permettre à d'autres tétramères de s'assembler longitudinalement (Voir Figure 48) (479, 481, 482). Afin de développer un modèle d'assemblage des tétramères pour former le filament intermédiaire final, la Desmine et la Vimentine ont été étudiées. (481, 492, 493). Ces études ont révélé que les tétramères sont retrouvés sous forme soluble *in vivo* au niveau du cytoplasme, puisqu'il s'agit de la sous-unité de base des filaments intermédiaires (481, 492, 493). De plus, il a été déterminé que 8 tétramères s'assemblent latéralement en structure hélicoïdale pour former un ULF (*Unit Length Filament*) (Voir Figure 48) (481, 492, 493). Par la suite, un assemblage longitudinal de plusieurs ULFs permet de former de courts filaments intermédiaires relâchés d'environ 13 à 17 nm de diamètre (481, 492, 493). Enfin, le compactage radial permet d'obtenir le filament intermédiaire mature final de structure hélicoïdale, en forme de corde et d'un diamètre de 10 nm (Voir Figure 48) (481, 492, 493).

Lors d'évènements physiologiques ou pathologiques, les filaments intermédiaires doivent être souvent réorganisés, via assemblage ou désassemblage des polymères, afin de permettre à la cellule de modifier ses propriétés physiques et fonctionnelles (481). Toutefois, la polymérisation des filaments intermédiaires est différente de celle des microtubules et des microfilaments, car elle ne requière pas d'énergie sous forme d'ATP (479, 482). En effet, c'est plutôt l'état de phosphorylation des protéines fibreuses qui régule la réorganisation des filaments intermédiaires (482). Ainsi, les protéines filamenteuses intermédiaires subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles, dont une des plus importante est la phosphorylation (481). D'ailleurs, la phosphorylation de la protéine Nestine est nécessaire lors de la mitose pour permettre son désassemblage (494).

Figure 48 : Structure et assemblage des protéines filamenteuses intermédiaires



A Les protéines fibreuses, qui constituent les filaments intermédiaires, sont constituées d'une hélice- $\alpha$  allongée, d'une tête amino-terminale (NH<sub>2</sub>) et d'une queue carboxy-terminale (COOH). B L'assemblage de 2 protéines monomériques identiques permet de former un homodimère. Pour ce faire, les tiges d'hélice- $\alpha$  s'alignent en parallèle et s'enroulent. C Puis, 2 dimères s'assemblent de manière antiparallèle pour former un tétramère, en suivant un motif de quinconce afin de permettre l'assemblage longitudinal des tétramères. D *In vivo*, on retrouve des tétramères solubles au niveau du cytoplasme, puisqu'il s'agit de la sous-unité de base des filaments intermédiaires. E L'assemblage latéral de 8 tétramères forme l'ULF (*Unit Length Filament*). F L'assemblage longitudinal d'ULFs permet de former de courts filaments intermédiaires relâchés d'environ 13 à 17 nm de diamètre. G Un compactage radial permet d'obtenir le filament intermédiaire mature final de structure hélicoïdale et d'un diamètre de 10nm. A, B & C : (482) © 2002 *Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition par Alberts et al.*, avec la permission de Garland Science/Taylor & Francis Group LLC et D, E, F & G : (493).

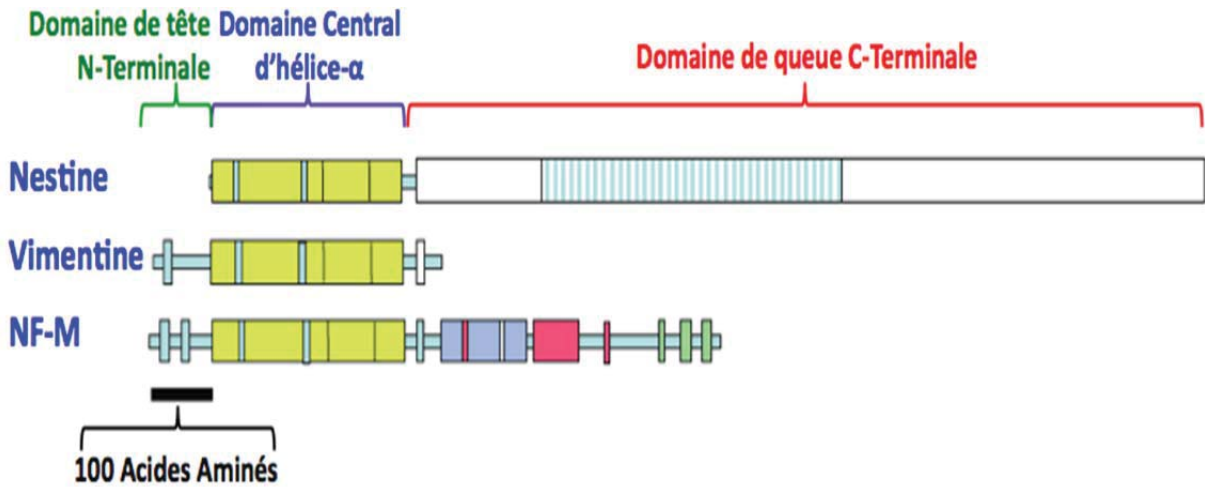


## 1.4.2 LA PROTÉINE FILAMENTEUSE INTERMÉDIAIRE NESTINE ET SON GÈNE

La protéine filamenteuse intermédiaire Nestine a été identifiée pour la première fois en 1985 au niveau des cellules souches neuroépithéliales lors du développement du système nerveux central (6, 487, 489, 495-497). Cette protéine filamenteuse intermédiaire de type VI (Voir Tableau 7) est incapable de s'homodimériser en raison de sa courte région N-terminale, soit la région essentielle à l'assemblage des filaments intermédiaires (6, 480, 483, 489, 490). Ce faisant, on la retrouve sous forme d'hétérodimères avec la Vimentine ou la Desmine (6, 490, 491). La Nestine est une grosse protéine; son poids moléculaire est de 240 kDa et elle est formée de 1805 acides aminés chez le rat et de 1618 acides aminés chez l'humain (6, 487, 497). D'ailleurs, on peut observer sa grande dimension à la Figure 49, qui illustre les tailles respectives de la Nestine, de la Vimentine et du Neurofilament-M (498). Structurellement, la Nestine est caractérisée par une région N-terminale plus courte que toutes les autres protéines filamenteuses intermédiaires, soit de seulement 6 acides aminés chez le rat et chez l'humain, alors que sa région C-terminale est quant à elle très longue, soit de 1491 et 1306 acides aminés chez le rat et l'humain respectivement (483, 487). La longue région C-terminale de la Nestine peut saillir de la structure du filament intermédiaire pour ainsi interagir avec d'autres éléments du cytosquelette et contribuer à l'organisation supramoléculaire des filaments intermédiaires cytoplasmiques (483, 486). La présence de nombreuses répétitions d'une séquence de 11 acides aminés contribue à la grande taille de cette région C-terminale (Voir Figure 49) (483, 487). Ces répétitions sont toutefois environ deux fois moins nombreuses dans la séquence d'acides aminés humaine, comparativement à celle du rat (487).

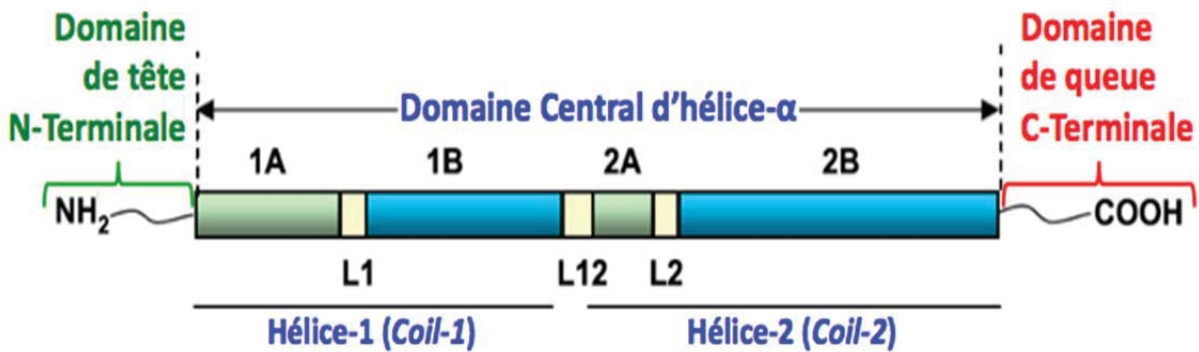
Situé entre la tête N-terminale et la queue C-terminale, le domaine central d'hélice- $\alpha$  des protéines filamenteuses intermédiaires est quant à lui hautement conservé (487, 488, 491). La Figure 50 schématise la structure générale du domaine central d'hélice- $\alpha$  de ces protéines, qui comprend la Nestine (486). Ainsi, le domaine central d'hélice- $\alpha$  est constitué de 2 domaines, le domaine d'hélice-1 (*Coil-1*), qui comprend 2 sous-domaines (1A et 1B), et le domaine d'hélice-2 (*Coil-2*), qui comprend lui aussi 2 sous-domaines (2A et 2B) (486, 491). Ces 4 sous-domaines d'hélice- $\alpha$  sont séparés par 3 liens riches en proline et en glycine, soit le lien L1 entre 1A et 1B, le lien L12 entre 1B et 2A, et le lien L2 entre 2A et 2B (486, 491).

**Figure 49 : La Nestine est une protéine filamenteuse intermédiaire de grande taille**



La protéine filamenteuse intermédiaire Nestine est une protéine de grande taille, caractérisée par une très courte tête N-terminale et une très longue queue C-terminale. Toutefois, le domaine central d'hélice- $\alpha$  est hautement conservé d'une protéine filamenteuse intermédiaire à l'autre, si bien qu'il est d'environ 300 acides aminés, tant chez la Nestine, la Vimentine que le Neurofilament-M (NF-M). Le domaine C-terminale de la Nestine chez le rat est caractérisé par la présence de 41 répétitions d'une séquence de 11 acides aminés (région turquoise), alors que chez l'humain il n'y a que 18 répétitions de cette séquence. (498)

**Figure 50 : La Structure du domaine central d'hélice- $\alpha$  des protéines filamenteuses intermédiaires et de la Nestine**



Le domaine central d'hélice- $\alpha$  est hautement conservé chez les protéines filamenteuses intermédiaires et la Nestine. Il est composé d'environ 300 acides aminés et est constitué de 2 domaines, le domaine d'hélice-1 (*Coil-1*) et le domaine d'hélice-2 (*Coil-2*), qui comprennent chacun 2 sous-domaines, soit 1A et 1B; 2A et 2B, respectivement, Les sous-domaines sont séparés par 3 liens, soit le lien L1 entre 1A et 1B, le lien L12 entre 1B et 2A, et le lien L2 entre 2A et 2B. (486)

Le domaine central d'hélice- $\alpha$  est certes fortement conservé, mais il n'est toutefois pas identique d'une protéine à l'autre, ou encore d'une espèce animale à l'autre pour une même protéine. Ainsi, le domaine central de la Nestine est de taille très similaire, puisqu'il n'y a que 6 acides aminés de moins dans la séquence humaine comparativement à celle du rat (487). De plus, les séquences d'acides aminés de la région hélicoïdale centrale de la Nestine de ces 2 espèces présentent une très forte homologie de 82% (487). Cependant, cette homologie chute à 55% lorsque l'on compare les séquences d'acides aminés de la région C-terminale de la protéine Nestine humaine et de rat (487). Cette grande différence d'homologie est, entre autres, attribuable à une taille significativement réduite de la région C-terminale humaine, qui présente environ la moitié moins de répétition de la séquence de 11 acides aminés (487).

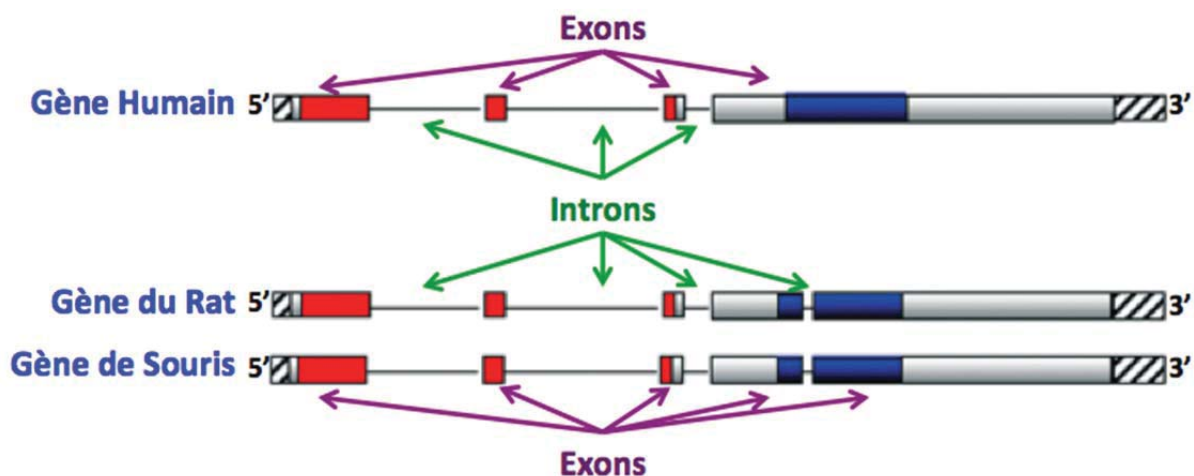
La phosphorylation est fortement impliquée dans la régulation des états d'assemblage et de désassemblage des protéines filamenteuses intermédiaires, et la Nestine n'y fait pas exception (483, 494, 497, 499). Ainsi, il a été démontré que le désassemblage et la réorganisation de la protéine Nestine est possible durant la mitose lorsqu'il y a un niveau accru de phosphorylation de la protéine (494, 497). Pour ce faire, la CDC2 kinase (*Cell Division Cycle 2 kinase* ou *Cyclin Dependant Kinase 1*(CDK1)) phosphoryle la thréonine 316, qui est située au début de la queue C-terminale, tout près du domaine central, soit une région importante qui assure l'assemblage adéquat des filaments intermédiaires (494, 497). Ainsi, la phosphorylation de cette thréonine peut avoir des conséquences sur les propriétés de polymérisation de la Nestine avec les autres protéines filamenteuses intermédiaires (494, 497). De plus, les séquences répétées de la queue C-terminale contiennent de nombreuses sérines, dont la phosphorylation a des impacts sur l'organisation du réseau de filaments intermédiaires avec les autres éléments du cytosquelette (483, 494, 497, 500). Constitutivement, la Nestine présente un niveau élevé de phosphorylation, visualisée au niveau des cellules en interphase dans le cycle cellulaire, qui est augmenté de 2,8 fois au moment de la mitose (494, 497). L'élément responsable de la phosphorylation constitutive de la Nestine durant tout le cycle cellulaire est pour l'instant méconnu (494). Toutefois, il serait possible qu'une autre kinase, telle la CDK5 (*Cyclin Dependant Kinase 5*) contribue à la phosphorylation constitutive de la thréonine 316 de la Nestine, vu son rôle important dans la différenciation neuronale ou lors du développement musculaire (494).

Tout le long du cycle cellulaire, la Nestine demeure colocalisée avec sa partenaire d'hétérodimérisation, la Vimentine, et leurs réseaux subissent les mêmes modifications durant la mitose (494). D'ailleurs, la Vimentine ayant un niveau constitutif de phosphorylation plus faible, son niveau de phosphorylation est augmenté de 6,2 fois pour permettre le désassemblage de la protéine lors de la mitose (494, 497). Toutefois, le désassemblage de la Vimentine n'est pas dépendant que d'un niveau accru de phosphorylation de la protéine (497, 499). En effet, il a été démontré que la réorganisation de la Vimentine durant la mitose requiert également la présence de Nestine avec un niveau accru de phosphorylation (497, 499). Ainsi, la Nestine travaille en collaboration avec une kinase mitotique, la MPF (*maturation/M-phase-Promoting Factor*), pour phosphoryler la sérine 55, située à la tête N-terminale de la Vimentine, soit la région essentielle à la dimérisation (497, 499-502). Enfin, Chou et ses collaborateurs ont démontré, via une technique de siRNA (*Small Interfering RNA*) qui diminue spécifiquement l'expression de la Nestine au niveau des cellules mitotiques *in vitro*, que la réduction de l'expression de Nestine empêche le désassemblage de la Vimentine, puisque celle-ci est demeurée assemblée durant toutes les étapes de la mitose (497, 499).

Le gène *Nestine* chez le rat est d'une longueur de 5945 paires de bases et il comprend 4 introns intercalés entre 5 exons (Voir Figure 51) (6, 489, 490). Les exons du gène *Nestine* contiennent des régions codantes pour les hélices- $\alpha$  de la partie centrale et les séquences répétées de la partie C-terminale (Voir Figure 51) (497). Les introns contiennent quant à eux des éléments de régulation qui dirigent l'expression de la protéine Nestine de manière spécifique au niveau de certaines cellules, alors que la région promotrice, située en amont du premier exon, ne contient pas d'éléments régulateurs déterminés (6, 489, 490). Ainsi, le second intron de 636 paires de bases du gène *Nestine* chez le rat contient 2 éléments activateurs (*enhancer*) distincts, dont l'un est spécifique au mésencéphale, alors que l'autre est spécifique à l'ensemble du système nerveux central (6, 158, 159, 497). Ces éléments activateurs sont responsables d'accroître l'activité de la protéine Nestine au niveau des cellules souches neurales progénitrices prolifératives au cours du développement du système nerveux central (6, 158, 159, 497). Le gène humain *Nestine* est quant à lui très similaire à celui du rat (497). En effet, les 3 premiers introns sont situés de manière identique au sein des gènes humain et de rat (Voir Figure 51) (497). Cependant, le gène humain *Nestine* ne contient ni de

4<sup>ème</sup> intron, ni de 5<sup>ème</sup> exon (Voir Figure 51) (497). De plus, le second intron du gène humain *Nestine* présente, à l'instar 2<sup>ème</sup> intron du gène de rat *Nestine*, lui aussi une région hautement conservée qui contient les éléments activateurs essentiels à l'expression protéique de la *Nestine* par les cellules progénitrices du système nerveux central (6, 158). D'ailleurs, la structure des introns et des exons est également très similaire chez les gènes *Nestine* des rongeurs (Voir Figure 51) (497). Ainsi, l'utilisation d'un modèle de souris transgénique *Nestine*-GFP a permis d'identifier d'autres types cellulaires pour lesquels le second intron du gène *Nestine* est responsable de l'expression de la protéine (6, 157). En effet, ce modèle a permis d'identifier que le second intron régule l'expression de la *Nestine* par les cellules souches progénitrices dérivées du follicule de la peau, ainsi que par les précurseurs cellulaires neuronaux, qui sont intercalés entre des cellules musculaires squelettiques (6, 154, 157, 162, 503, 504). Enfin, le premier intron du gène *Nestine* contient lui aussi des éléments activateurs et est quant à lui responsable de l'expression de la *Nestine* par les fibres musculaires squelettiques durant la myogenèse et par les cellules endothéliales lors du processus d'angiogenèse (6, 150, 151, 497, 505-507).

**Figure 51 : Les gènes *Nestine* humain, de rat et de souris**



Les gènes *Nestine* humain, de rat et de souris sont très similaires. Les 3 premiers introns sont situés de manière identique au niveau de ces gènes. Les gènes de la souris et du rat comprennent tous deux 4 introns intercalés entre 5 exons, alors que le gène humain de la *Nestine* ne comprend que 3 introns intercalés entre 4 exons. Les régions rayées sont des régions non-traduites. Les régions rouges, grises et bleues sont des régions codantes. De manière spécifique, les régions en rouge codent pour les hélices- $\alpha$ , alors que les régions en bleu codent pour les séquences répétées de 11 acides aminés. (497) avec la permission de *Histology and Histopathology*.

### 1.4.3 L'EXPRESSION DE LA NESTINE DANS L'ORGANISME

Initialement, la Nestine était considérée comme un marqueur spécifique des cellules souches neurales. Ainsi, la protéine filamenteuse intermédiaire Nestine est exprimée par la plupart des cellules progénitrices mitotiques impliquées dans les processus de développement du système nerveux central, qui donnent naissance aux cellules gliales et neuronales (6, 487, 489, 494-497). Son expression n'est toutefois pas limitée au système nerveux central, puisque la Nestine est présente au sein des précurseurs des cardiomyocytes et des cellules musculaires squelettiques, ainsi qu'au niveau des fibroblastes cardiaques néonataux (6, 25, 159, 489, 490, 494, 497, 505, 506, 508). On détecte aussi la Nestine au niveau de nombreux autres types cellulaires et organes en développement, tels que les cellules de Schwann, les cellules de la crête neurale, les cellules myoïdes, les précurseurs d'oligodendrocytes, le mésoderme, le myotome, le dermatome, le pancréas, la rétine, le follicule pileux, les testicules, les dents, les CML des artères et les cellules endothéliales des capillaires embryonnaires (6, 151, 490, 497, 509-512). En définitive, la Nestine est fortement exprimée lors du développement embryonnaire, puisqu'elle y joue un rôle fondamental de support et permet alors la formation des différentes structures (497).

L'expression de la Nestine est toutefois transitoire (25, 494, 497). En effet, une fois les processus de maturation, de développement et de différenciation complétés, l'expression de la Nestine est régulée à la baisse pour laisser place à d'autres protéines filamenteuses intermédiaires dont l'expression est spécifique à certains tissus (158, 159, 494, 497, 513). Donc, la Nestine est remplacée par le GFAP chez les cellules gliales et les astrocytes matures, par la Desmine au niveau des muscles développés et par les neurofilaments chez les neurones adultes (60, 484, 494, 497, 514-516). De plus, les fibroblastes cardiaques du myocarde mature perdent l'expression de la Nestine avec le développement (6, 25). Malgré tout, la protéine Nestine demeure présente au niveau de certains tissus et organes matures, dont entre autres le système nerveux central, le cœur et la peau, mais cette fois-ci de manière quasi exclusive chez de petites populations de cellules souches progénitrices Nestine<sup>(+)</sup> (6, 490, 497, 510, 517). Ces cellules constituent une réserve cellulaire quiescente, qui une fois réactivées peuvent alors proliférer, se différencier et migrer (490). Ainsi, ces populations de cellules Nestine<sup>(+)</sup> sont



recrutées lors de lésion pour favoriser la régénération des tissus, ainsi que dans des processus fibrotiques, ce qui contribue à la réexpression de la protéine filamenteuse Nestine au niveau de tissus matures (490, 497). Ce faisant, la Nestine est observée chez les astrocytes, les myoblastes, les cellules gliales, les CMLV, les cellules épendymaires de la moelle épinière et les cellules mésangiales rénales qui ont subi une blessure (490, 497, 511, 513, 516, 518-521). La fibrose du foie est quant à elle associée avec l'apparition de la Nestine au niveau des cellules stellaires hépatiques activées et des myofibroblastes hépatiques (490, 522, 523), alors que la fibrose tubulointerstitielle rénale est caractérisée par la présence de myofibroblastes rénaux qui expriment la Nestine (524, 525). D'ailleurs, il a été identifié que l'ampleur de la réponse fibrotique rénale, reflétée par la déposition du collagène, est proportionnelle à la densité de cellules interstitielles Nestine<sup>(+)</sup> (524). De plus, la stimulation *in vitro* avec le TGF- $\beta$  de fibroblastes rénaux induit l'expression de la Nestine par ces cellules (524). Enfin, une expression accrue de la Nestine a été détectée au niveau de plusieurs cellules cancéreuses, tels les mélanomes malins, les tumeurs du SNC, de la thyroïde et gastro-intestinales, le cancer du pancréas, de la prostate et du sein (487, 490, 526). D'ailleurs, l'implication de la Nestine dans les processus d'EMT de type 2 et de type 3, respectivement associés au développement de fibroses et de cancers, est introduit à la Section 1.5.1.2.

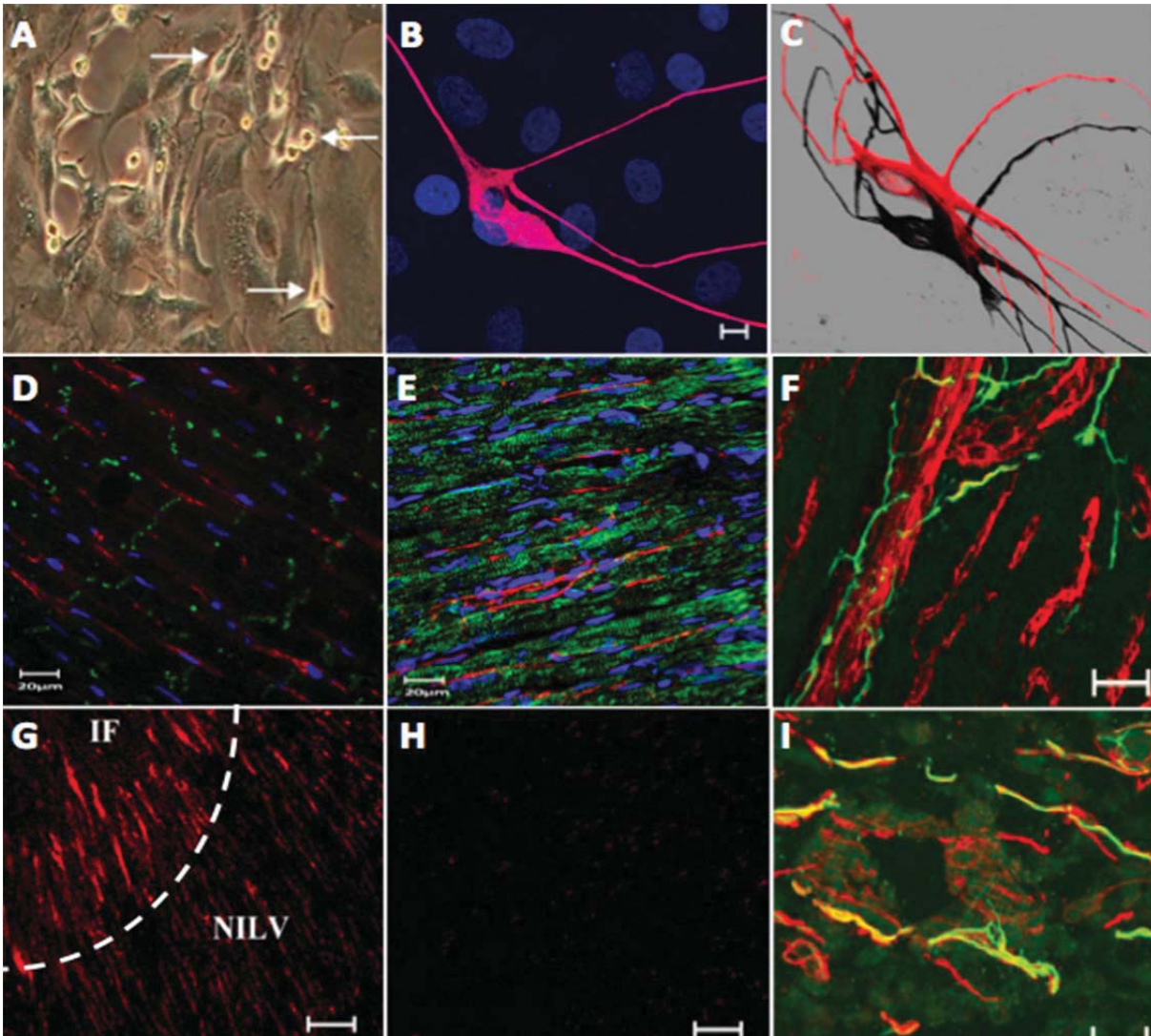
Il est également reconnu qu'à la suite d'un infarctus du myocarde, il y a de nombreux types cellulaires myocardiques qui réexpriment la Nestine et qui participent au remodelage et à la fibrose réparative cardiaque (6, 8, 25, 58-63). Ainsi, les myofibroblastes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> sont recrutés au niveau de la région infarctée (64). L'expression de la Nestine confère à ces cellules un phénotype prolifératif, ce qui permet d'accélérer la réponse cicatricielle (6, 25). Également, les cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> (CSNPRCN<sup>+</sup>) migrent à la région cicatricielle et acquièrent un phénotype neuronal (6, 58-61, 63) ou un phénotype vasculaire (6, 61, 62) pour participer aux processus de neurogenèse et d'angiogenèse cardiaques. De plus, l'infarctus du myocarde induit l'apparition, dans la région bordant la zone ischémisée, de cellules ressemblant à des cardiomyocytes (*cardiac myocyte-like cells*) caractérisées par l'expression de la Nestine (6, 8, 9).

### ***1.4.3.1 Les cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> (CSNPRCN<sup>(+)</sup>)***

En 2005, les CSNPRCN<sup>+</sup> ont été observées pour la première fois par des membres de notre laboratoire, via l'isolation *in vitro* de cellules de la cicatrice de cœurs de rats ayant subi un infarctus du myocarde (Voir Figure 52 A & B) (6, 60). Ces cellules ressemblaient morphologiquement à des cellules souches neurales progénitrices (CSNP) résidentes du système nerveux central (SNC), via leur petit corps cellulaire et leurs longs prolongements immunoréactifs à la Nestine qui établissent des contacts avec les cellules avoisinantes (Voir Figure 52 A, B & C) (6, 60, 157, 527). En plus de s'apparenter morphologiquement aux CSNP résidentes du SNC, les cellules Nestine<sup>(+)</sup> isolées de cicatrices cardiaques de rats avaient pour caractéristique de croître en formant des neurosphères lorsque mises en présence avec du EGF et du bFGF (Voir Figure 53) (6, 61, 157, 527). À l'instar des CSNP résidentes du SNC, les cardiosphères Nestine<sup>(+)</sup> ont aussi la capacité de se différencier en un phénotype neuronal, caractérisé par la perte de l'expression de Nestine associée à une expression concomitante du Neurofilament-M et de la  $\beta$ -tubuline de classe III, lorsqu'elles sont isolées dans un milieu de culture favorisant cette différenciation (Voir Figure 53) (6, 61, 157, 527).

Viviane El-Helou, Pauline Béguin et des membres de notre laboratoire ont découvert que des cellules allongées immunoréactives pour la Nestine étaient également présentes au sein du myocarde ventriculaire et auriculaire de rats normaux, et ce, de manière intercalée entre des cardiomyocytes Connexine 43<sup>(+)</sup>/Desmine<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(-)</sup> (Voir Figure 52 D & E), ainsi qu'à proximité de fibres Neurofilament-M<sup>(+)</sup> (Voir Figure 52 F) (6, 8, 63). De plus, les élongations Nestine<sup>(+)</sup> observées au niveau du myocarde normal de rat présentaient une autre caractéristique constitutive des CSNP résidentes du SNC, soit une immunoréactivité nucléaire de musashi-1, un facteur de transcription qui permet aux cellules souches neurales de conserver leur aptitude à l'auto-renouveau (6, 61, 157, 527). Les élongations Nestine<sup>(+)</sup> étaient également immunoréactives à Sox9, soit un gène associé aux cellules souches de la crête neurale (61). D'ailleurs, les cardiosphères Nestine<sup>(+)</sup> exprimaient aussi Sox9, ainsi que d'autres gènes associés aux cellules souches de la crête neurale, soit *snail* et *slug* (61).

**Figure 52 : Caractérisation des CSNPRCN(+)**



A L'isolation de cellules dérivées de la cicatrice cardiaque de rat a permis d'observer la présence de cellules d'aspect neuronal (flèches) qui interagissent via leurs élongations avec les cellules avoisinantes. B Ces cellules et leurs élongations sont immunoréactives à la Nestine (fluorescence rouge). C Visualisation 3D d'une cellule Nestine(+). D Au niveau du myocarde de rat normal, les cellules Nestine(+) (fluorescence rouge) sont détectées de manière intercalée entre les cardiomyocytes Nestine(-) qui expriment la Connexine-43 (en fluorescence verte) E et la Desmine (en fluorescence verte). F Ces cellules sont aussi détectées à proximité de fibres Neurofilament-M(+) (en fluorescence verte). G À la suite d'un infarctus du myocarde, les cellules Nestine(+) sont recrutées au niveau de la région infarctée (IF) et du ventricule gauche non infarctés (NILV) qui borde la région cicatricielle. H Conséquemment, ces cellules sont pratiquement absentes du myocarde à distance de la cicatrice cardiaque. I Au niveau de la cicatrice cardiaque, de nombreuses cellules Nestine(+) co-expriment le Neurofilament-M (fluorescence verte). Les noyaux sont en fluorescence bleue, marqués au TOPRO3. A, B, G & H : (60) avec la permission de John Wiley and Sons; C : (6); D & E : (8); F & I : (63) avec la permission de Wolters Kluwer Health Inc.

Les membres de notre laboratoire ont également désiré déterminer l'origine des CSNPRCN<sup>(+)</sup>. Dans l'optique d'identifier si ces cellules Nestine<sup>(+)</sup> sont dérivées de la crête neurale, notre laboratoire a employé le modèle de souris transgénique *Wnt1-cre; Z/EG*, qui marque à la EGFP les cellules embryonnaires dérivées de la crête neurale, alors que Tomita et ses collaborateurs ont employé un modèle de souris doublement transgénique (*protein 0-Cre/floxed EGFP*) (6, 61, 152). Dans les deux cas, l'utilisation de ces modèles animaux a permis de confirmer que les cellules Nestine<sup>(+)</sup> résidentes cardiaques sont bel et bien originaires de la crête neurale (6, 61, 152).

Le phénotype des CSNPRCN<sup>+</sup> a également été caractérisé *in vivo* à la suite d'un infarctus du myocarde. Ainsi, Jessica Drapeau et des membres de notre laboratoire ont d'abord observé que ces élongations Nestine<sup>(+)</sup> sont présentes au niveau de la zone infarctée ainsi qu'au niveau du ventricule gauche non-infarcté qui borde la région cicatricielle (Voir Figure 52 G) (6, 60) et que les cellules Nestine<sup>(+)</sup> semblent être physiquement associées aux fibres Neurofilament-M<sup>(+)</sup> qui innervent la région cicatricielle (Voir Figure 52 I) (6, 60, 63). À l'inverse, ces cellules Nestine<sup>(+)</sup> sont pratiquement absente du myocarde non ischémié situé à distance de la zone cicatricielle (Voir Figure 52 H) (60). Ces observations laissaient présager qu'à la suite de l'infarctus du myocarde, les cellules souches neurales Nestine<sup>(+)</sup> sont recrutées au niveau du myocarde, afin de migrer à la région ischémiée pour contribuer à la neurogenèse (6, 60, 63). Des collègues du laboratoire ont alors vérifié si les cellules Nestine<sup>(+)</sup> cicatricielles proviennent directement du myocarde, ou encore si ces cellules sont plutôt dérivées de la moelle osseuse (6, 63). Pour ce faire, des rats ont d'abord été irradiés, puis ils ont reçu une transplantation au niveau de la veine jugulaire de cellules de la moelle osseuse marquées avec la GFP. Cinq semaines plus tard, des infarctus du myocarde ont été réalisés chirurgicalement chez ces rats, afin d'observer si les cellules transplantées étaient recrutées (63). Cette expérimentation complexe a permis aux membres de notre équipe de conclure que les CSNPN<sup>(+)</sup> sont dérivées de la moelle osseuse en une faible proportion (environ 22%) (6, 63). Vu la faible proportion de cellules GFP<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup> dérivées de la moelle osseuse au sein de la cicatrice, combinée à la visualisation de nombreuses élongations immunoréactives à la Nestine au niveau du myocarde normal de rat (Voir Figure 52 D & E), il était alors tout indiqué de vérifier si des CSNPRCN<sup>(+)</sup> peuvent migrer du myocarde sain vers la cicatrice à la suite de

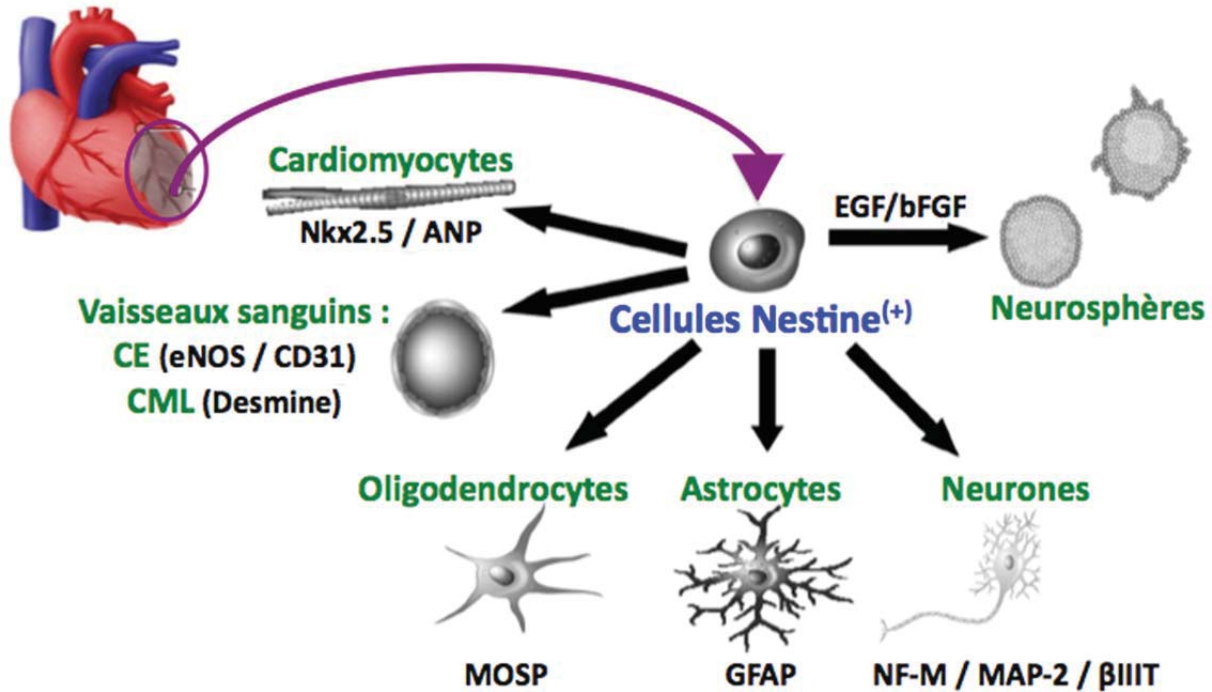
l'événement ischémique. Il a alors été démontré que des cardiosphères Nestine<sup>(+)</sup> marquées au CM-Dil, puis transplantées dans le myocarde viable, sont massivement recrutées à la zone ischémisée à la suite d'une occlusion coronaire, confirmant que la majorité des cellules Nestine<sup>(+)</sup> recrutées à la suite de l'occlusion sont plutôt une population intrinsèque du myocarde mature (6, 63).

Cette expérimentation a en plus permis de constater *in vivo* la très large plasticité des CSNPRCN<sup>(+)</sup>, qui acquièrent un phénotype vasculaire de cellule endothéliale eNOS<sup>(+)</sup> ou de CML Desmine<sup>(+)</sup> et participent ainsi au processus d'angiogenèse lors de la fibrose réparative (6, 63). De plus, à l'instar des CSNP résidente du SNC et du follicule pileux, les cardiosphères Nestine<sup>(+)</sup> isolées de la cicatrice cardiaque ont la capacité, lorsque mises en présence du milieu de culture adéquat, de se différencier *in vitro* en une sous-population neuronale Nestine<sup>(-)</sup>/Neurofilament-M<sup>(+)</sup>/MAP-2<sup>(+)</sup> (*Microtubule-Associated Protein 2*), en une sous-population d'astrocyte Nestine<sup>(-)</sup>/GFAP<sup>(+)</sup> ou en une sous-population ayant un phénotype d'oligodendrocytes MOSP<sup>(+)</sup> (*Myelin Oligodendrocyte Specific Protein*) (Voir Figure 53) (6, 61, 152). D'ailleurs, ces cellules Nestine<sup>(+)</sup> résidentes du myocarde peuvent également contribuer à la neurogenèse en se différenciant *in vivo* en un phénotype neuronal Neurofilament-M<sup>(+)</sup> et  $\beta$ -tubuline de classe III<sup>(+)</sup> (Voir Figures 52 I et 53) (6, 58, 61, 63). Il a également été rapporté par Tomita et ses collaborateurs que les cardiosphères Nestine<sup>(+)</sup> expriment GATA4, soit un facteur de transcription exprimé par des cellules souches progénitrices de cardiomyocyte (6, 9, 152). Ainsi, l'isolation *in vitro* de ces cardiosphères Nestine<sup>(+)</sup> a permis de confirmer leur plasticité impressionnante, puisqu'une sous population de ces cellules se sont différenciées en cardiomyocytes battant spontanément et qui expriment le facteur de transcription NKx2.5 et l'ANP, soit des éléments constitutifs du phénotype des cardiomyocytes (Voir Figure 53) (6, 152). Enfin, notre équipe ainsi que d'autres laboratoires ont identifié, au niveau du myocarde de rongeurs adultes, des cellules souches neurales qui possèdent de longues extensions Nestine<sup>(+)</sup> et qui expriment au sein de leur cytoplasme des facteurs de transcriptions des cellules progénitrices cardiaques (GATA4 et Nkx2.5), témoignant de leur aptitude potentielle à se différencier en un phénotype de cardiomyocyte (6, 8, 528-530). En somme, les CSNPRCN<sup>(+)</sup> ont une très large plasticité et sont recrutées à la



suite d'un dommage cardiaque au niveau de la zone ischémisée, où elles pourraient contribuer à la neurogenèse et à l'angiogenèse cardiaque (6, 58, 59, 61-63).

**Figure 53 : La plasticité des cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup>**



Les cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> (CSNPRCN<sup>(+)</sup>) isolées de la cicatrice cardiaque ont une très grande plasticité, à l'instar des CSNP résidentes du SNC ou du follicule pileux. Ainsi, lorsqu'elles sont en présence d'EGF (*Epidermal Growth Factor*) et de bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), ces cellules Nestine<sup>(+)</sup> dérivées de la cicatrice ont la capacité de se différencier en neurosphères flottantes. De plus, leur importante plasticité leur permet d'exprimer de nouvelles protéines pour ainsi se différencier en cellules du système nerveux central, tels les oligodendrocytes (MOSP, *Myelin Oligodendrocyte Specific Protein*), les astrocytes (GFAP, *Glial Fibrillary Acidic Protein*) et les neurones (NF-M, Neurofilament-M, MAP-2, *Microtubule Associated Protein-2* et βIIIT, β-tubuline de classe III). Ces cellules Nestine<sup>(+)</sup> peuvent également se différencier en un phénotype vasculaire, telles les Cellules Endothéliales (CE ; eNOS, *endothelial Nitric Oxide Synthase* et CD31, *Cluster of Differentiation 31*) et les Cellules Musculaires Lisses (CML ; Desmine). Enfin, il a également été démontré qu'une sous population de cardiosphères Nestine<sup>(+)</sup> peuvent acquérir un phénotype de cardiomyocyte, via l'induction du facteur de transcription *Nkx2.5* (*NK2 homebox 5*) et de l'ANP (*Atrial Natriuretic Peptide*). (6)

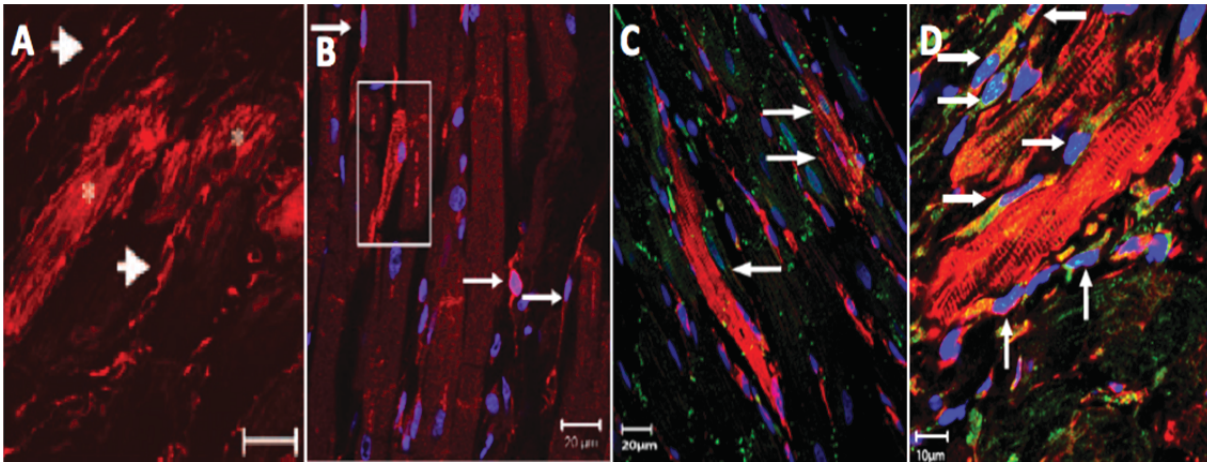


### **1.4.3.2 Les cellules Nestine<sup>(+)</sup> ressemblant à des cardiomyocytes**

Viviane El-Helou et des membres de notre laboratoire ont été les premiers à identifier des cellules ressemblant à des cardiomyocytes, caractérisées par une expression striée de la Nestine, et qui sont situées exclusivement au niveau du myocarde qui borde la région cicatricielle de rats ayant subi un infarctus du myocarde (Voir Figure 54 A) (63). De plus, ces cellules Nestine<sup>(+)</sup> ressemblant à des cardiomyocytes ont été détectées au niveau du myocarde de rat à 24h, 1 semaine, 3 semaines et 9 mois suivant la ligature de l'artère coronaire gauche descendante antérieure (8). En plus du myocarde infarci de rat, ces cardiomyocytes Nestine<sup>(+)</sup> ont par la suite été identifiés au niveau du myocarde qui entoure la cicatrice de cœurs infarcis de souris et de patients décédés après avoir subi un évènement ischémique (Voir Figure 54 B) (6, 8, 61, 529, 531). D'ailleurs, ces cellules Nestine<sup>(+)</sup> ressemblant à des cardiomyocytes ont été retrouvées à proximité de CSNPRCN<sup>(+)</sup> et de cardiomyocytes matures Nestine<sup>(-)</sup> (Voir Figure 54 A et B) (61, 63). Toutefois, ces cardiomyocytes Nestine<sup>(+)</sup> sont structurellement et morphologiquement immatures, puisqu'ils présentent un motif aberrant de connexine-43, où la protéine est soit latéralisée, soit internalisée au niveau du cytoplasme, ou encore tout simplement absente (Voir Figure 54 C) (8). Malgré tout, les cardiomyocytes immatures présentent des récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques, sont immunoréactifs pour l' $\alpha$ -actine sarcoplasmique et expriment la Desmine normalement, soit en un motif strié (8, 63).

Les cellules Nestine<sup>(+)</sup> ressemblant à des cardiomyocytes pourraient être originaires de CSNPRCN<sup>(+)</sup>, car une sous-population de ces dernières expriment au sein de leur cytoplasme les facteurs de transcriptions des cellules progénitrices cardiaques, soit GATA4 et Nkx2.5 (6, 8, 528-530). Or, à la suite d'un infarctus du myocarde chez le rat, il est reconnu que les CSNPRCN<sup>(+)</sup> migrent à la région cicatricielle et entourant la cicatrice (Voir Figures 17 et 52 G) (6, 8, 60, 63). Ainsi, des cardiomyocytes immatures Nestine<sup>(+)</sup>/Nkx2.5<sup>(+)</sup> ont été détectés en grande proximité avec des CSNPRCN<sup>(+)</sup> Nkx2.5<sup>(+)</sup> au niveau du myocarde qui borde la région ischémisée (Voir Figure 54 D) (8). Cependant, ces CSNPRCN<sup>(+)</sup> Nkx2.5<sup>(+)</sup> (identifiées par des flèches) semblent être en transformation, puisqu'elles ne présentent pas leur phénotype caractéristique de longues et nombreuses élongations Nestine<sup>(+)</sup> (Voir Figure 54 D) (6, 8). En effet, ces cellules présentent plutôt des élongations Nestine<sup>(+)</sup> partielles, ainsi qu'une

**Figure 54 : Les cellules Nestine<sup>(+)</sup> ressemblant à des cardiomyocytes**



**A** Les cellules Nestine<sup>(+)</sup> ressemblant à des cardiomyocytes ont été identifiées pour la première fois de manière exclusive au niveau du myocarde entourant la zone ischémiée, chez des rats ayant subi un infarctus du myocarde. Ces cellules expriment la Nestine (en fluorescence rouge) selon un motif strié et sont situées à proximité de CSNPRCN<sup>(+)</sup> (flèches). **B** Le myocarde qui borde la cicatrice cardiaque d'un patient ayant subi un infarctus présente des cellules Nestine<sup>(+)</sup> ressemblant à des cardiomyocytes (encadré) qui sont entourées de cardiomyocytes Nestine<sup>(-)</sup> et de CSNPRCN<sup>(+)</sup> (flèches). **C** Les cardiomyocytes immatures Nestine<sup>(+)</sup> (flèches) expriment la Connexine-43 (immunofluorescence verte) de manière désorganisée. **D** Les cellules ressemblant à des cardiomyocytes ont un phénotype strié de la Nestine (fluorescence rouge) et co-expriment Nkx2.5 (fluorescence jaune). À proximité de ces cellules, on observe des CSNPRCN<sup>(+)</sup> Nkx2.5<sup>(+)</sup> (flèches) qui semblent se transformer, puisque les élongations Nestine<sup>(+)</sup> sont partiellement raccourcies et que l'expression de Nkx2.5 n'est plus exclusivement cytoplasmique, mais également nucléaire. A : (63) avec la permission de Wolters Kluwer Health Inc.; B : (61) avec la permission d'Elsevier; C & D : (8).

expression cytoplasmique, mais également nucléaire, de Nkx2.5, attestant d'un potentiel état primaire de différenciation à un phénotype de cellule Nestine<sup>(+)</sup> ressemblant à un cardiomyocyte (Voir Figure 54 D) (6, 8). Ainsi, ces observations suggèrent qu'une sous-population des CSNPRCN<sup>(+)</sup>, qui expriment les facteurs de transcriptions de cellules souches progénitrices cardiaques, pourrait se différencier en un phénotype de cardiomyocyte pour participer à la régénération cardiaque dans la région entourant la cicatrice (6, 8). D'ailleurs, Tamura et ses collègues ont employé un modèle de souris doublement transgénique, où les cellules souches dérivées de la crête neurales sont marquées à la EGFP, et ont visualisé des cardiomyocytes EGFP<sup>(+)</sup> et des cellules EGFP<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup> dans la région entourant la cicatrice dès 2 semaines suivant l'induction d'un infarctus du myocarde (6, 153). Leurs résultats appuient ceux de notre laboratoire et témoignent qu'une sous-population de CSNPRCN<sup>(+)</sup>

pourrait participer, en collaboration avec les cardiomyocytes mononucléés, à une réponse adaptative de régénération cardiaque à la suite de l'infarctus (6, 8, 9, 153). Toutefois, la capacité régénérative du myocarde adulte est limitée à la suite d'un dommage cardiaque, puisque la différenciation des CSNRCN<sup>(+)</sup> génère des cardiomyocytes trop immatures et que la réponse des cardiomyocytes mononucléés est largement marginale comparativement à celle des cardiomyocytes binucléés/polynucléés, qui vont répondre au stress induit en s'hypertrophiant plutôt qu'en se régénérant (8, 9, 11, 13).

#### **1.4.4 LES RÔLES DE LA NESTINE**

La Nestine est impliquée dans les processus de fibrose réactive hépatique et rénale (522-525), mais également au niveau de la fibrose réparative cardiaque à la suite de l'infarctus du myocarde (6, 25, 58, 59, 61-64). D'ailleurs, il a été démontré que la Nestine a un rôle biologique au niveau de la prolifération cellulaire, de la migration, de la différenciation et de l'invasivité (25, 151, 518, 526, 532-538). Ainsi, l'expression de la Nestine, par les myofibroblastes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> et les CSNPRCN<sup>(+)</sup>, confère à ces cellules un phénotype migratoire, ce qui contribue à leurs recrutements à la région ischémisée (6, 61, 62, 64). De plus, l'acquisition d'un phénotype prolifératif par les myofibroblastes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> leur permet de sécréter massivement du collagène afin de former la cicatrice cardiaque (25), alors que les CSNPRCN<sup>(+)</sup> ont la capacité de se différencier en phénotype neuronal et vasculaire pour participer à la neurogenèse et à l'angiogenèse, respectivement (6, 58, 59, 61-63).

##### ***1.4.4.1 Le rôle de la Nestine dans la neurogenèse à travers l'organisme***

La Nestine contribue à la régénération des muscles squelettiques en participant à la réinnervation des myofibrilles nouvellement formées (539). De plus, cette protéine filamenteuse intermédiaire est associée avec la neurogenèse du néocortex de rat ayant subi une occlusion artérielle cérébrale (540), ainsi qu'avec la neurogenèse cardiaque à la suite d'un infarctus du myocarde (6, 58, 60, 61, 63). Toutefois, les processus impliqués dans la différenciation des cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal Neurofilament-M<sup>(+)</sup> n'ont pas été identifiés jusqu'à présent, mais le NGF et l'hypoxie ont été écartés en tant qu'éléments pouvant initier cette différenciation (6, 58).

##### ***1.4.4.2 Le rôle de la Nestine dans l'angiogenèse à travers l'organisme***

La Nestine a un rôle important dans l'angiogenèse de la région cicatricielle lors de la fibrose réparative cardiaque, et ce, via la différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype vasculaire (6, 61, 62). Toutefois, les cellules endothéliales et CMLV nouvellement formées au

niveau du myocarde à la suite d'un dommage ne sont pas les seules à exprimer la Nestine, puisque les vaisseaux synthétisés *de novo* dans une région lésée du muscle squelettique, du cerveau et de la peau expriment eux aussi la protéine filamenteuse intermédiaire (151, 503, 539-541). Enfin, la Nestine est également impliquée dans la vascularisation des tumeurs, puisqu'elle a été détectée au niveau d'angiosarcomes, de glioblastomes, de mélanomes et de neuroblastomes (542-545). D'ailleurs, une expression accrue de la Nestine au niveau des cancers témoigne de leur importante sévérité, puisque la vascularisation des tumeurs favorise leur expansion, mais également parce que la Nestine est associée avec des capacités migratoires et prolifératives importantes, favorisant la formation de métastases via le processus d'EMT de type III (Voir Sections 1.5.1.1.3 et 1.5.1.2) (546).

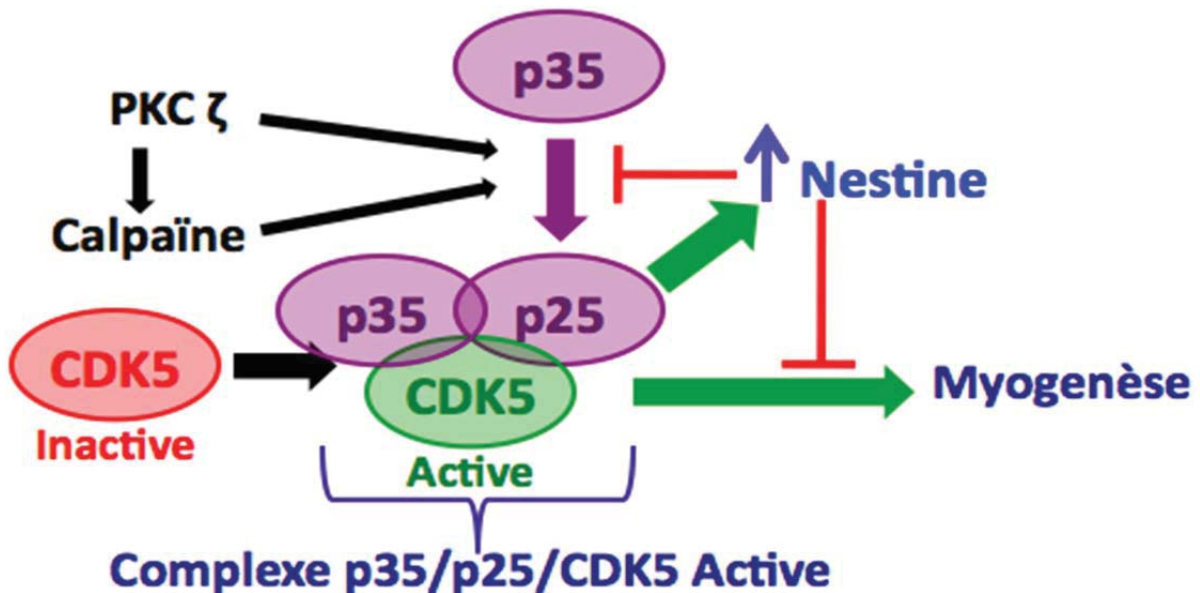
#### ***1.4.4.3 Le rôle de la Nestine dans la différenciation, la survie et la prolifération cellulaire***

Il a été découvert qu'il n'est pas nécessaire de quitter le cycle cellulaire pour initier la différenciation cellulaire (547). En effet, l'expression de régulateurs cellulaires spécifiques ou encore un simple ralentissement du cycle cellulaire peut contribuer à initier la différenciation cellulaire (547). La prolifération cellulaire dépend quant à elle du passage à travers les différentes phases du cycle cellulaire (479). Ce passage d'une phase à l'autre est régi par la formation de complexes cycline-CDK (*Cyclin Dependant Kinase*) qui phosphorylent diverses protéines régulatrices impliquées dans la progression du cycle cellulaire (479). De manière spécifique, la CDK5 est quant à elle une protéine critique à la différenciation neuronale et à la migration neuronale associées avec le développement embryonnaire cortical, si bien qu'une souris  $CDK5^{-/-}$  est létale dans les jours suivant sa naissance (548-550). Les rôles de la CDK5 s'étendent également à titre de régulateur positif de la myogenèse, ce qui contribue à promouvoir la différenciation des précurseurs des myocytes, les myoblastes, pour générer des myofibrilles (550-552). Lors de la différenciation des myoblastes, l'activité de la CDK5 est régulée par la protéine kinase C atypique zêta (PKC $\zeta$ ) (Voir Figure 55) (550, 553). La PKC $\zeta$  a pour fonction de phosphoryler la protéine p35, ce qui contribue au clivage de cette protéine en p25, soit une protéine activatrice de CDK5 3 fois plus résistante à la dégradation que p35

(Voir Figure 55) (550, 553). De plus, la PKC $\zeta$  phosphoryle la calpaïne pour induire son activité, ce qui contribue également au clivage de p35 en p25 et à la formation concomitante du complexe p35 / p25 / CDK5 active (Voir Figure 55) (550, 553). D'ailleurs, la formation de ce complexe p25 / CDK5 est essentielle au maintien de l'activité adéquate et soutenue de CDK5 tout au long du processus de différenciation et de myogenèse (550, 553). La Nestine est quant à elle une protéine d'échafaudage dynamique du complexe p35 / p25 / CDK5 active (502, 550, 554). Ainsi, la Nestine a un rôle fondamental dans la différenciation des myoblastes, puisqu'elle détermine le début et le rythme de différenciation des myoblastes (550). En effet, la surexpression de la Nestine bloque le clivage de p35 en p25, ce qui inhibe le processus de différenciation (Voir Figure 55), alors qu'une sous-expression de la protéine filamenteuse intermédiaire accélère le rythme de la différenciation des myoblastes en myofibrilles en favorisant la transformation de p35 en p25 (550). De plus, la CDK5 régule de façon critique la stabilité et la réorganisation des filaments de sa propre protéine d'échafaudage, la Nestine, en phosphorylant la thréonine 316, ce qui crée ainsi une boucle de rétro-inhibition à la fois sur la génération de p25 et sur la myogenèse (Voir Figure 55) (502, 550). Également, si la voie PKC $\zeta$ -CDK5 est inhibée, cela nuit à l'organisation de la protéine filamenteuse intermédiaire et entrave conséquemment la différenciation (550, 553). D'ailleurs, il est reconnu que la CDK5 peut réaliser une 2<sup>ème</sup> boucle de rétro-inhibition en phosphorylant la protéine p35 au niveau de sa thréonine 138, bloquant ainsi le site d'action de la calpaïne qui permet le clivage de p35 en p25 et inhibant conséquemment la myogenèse (550, 555). La protéine filamenteuse intermédiaire Nestine joue donc un rôle fondamental dans la myogenèse, puisqu'une réduction de l'expression de la Nestine contribue à la régulation du complexe p35 / p25 / CDK5 active (550). L'activité soutenue de la CDK5 favorise la différenciation des myoblastes en myofibrilles matures, où la protéine filamenteuse Desmine remplace la Nestine (550). D'ailleurs, lors du développement, la régulation à la baisse de l'expression de la Nestine est également associée à la différenciation des cellules souches neurales progénitrices en astrocytes et en neurones matures, où la Nestine est remplacée par la GFAP et le neurofilament-M, respectivement (159, 490, 497, 550).



**Figure 55 : Le rôle de la Nestine dans la différenciation des myoblastes via sa régulation de la signalisation de CDK5**



Une faible expression de Nestine favorise le clivage de p35 en p25 et contribue à la formation du complexe p35 / p25 / CDK5 active essentiel à la différenciation des myoblastes en myofibrilles. La Protéine Kinase Cζ (PKCζ) phosphoryle quant à elle la p35, ainsi que la Calpaïne pour activer cette dernière, et conjointement ces actions contribuent au clivage de p35 en p25. La CDK5 active peut initier une boucle de rétro-inhibition sur sa protéine d'échafaudage Nestine, et conséquemment inhiber le clivage de p35 en p25 et le processus de différenciation. (550)

Les interrelations entre la Nestine et le CDK5 ne se limitent pas à la différenciation cellulaire, puisque la Nestine régule aussi la survie cellulaire des cellules progénitrices neuronales en présence de stress oxydatif (550, 554). En effet, une déplétion de la Nestine au niveau de ces cellules, suite à un traitement au peroxyde d'hydrogène, est associée avec la formation du complexe p35 / p25 / CDK5 active et l'initiation concomitante de l'apoptose cellulaire dépendante de CDK5 (554). À l'inverse, la surexpression de la Nestine protège les cellules souches neurales progénitrices, puisqu'elle inhibe l'apoptose en séquestrant le complexe p35 / CDK5 au niveau du cytoplasme et en régulant son activité (554).

Il est également reconnu que les cellules qui expriment la Nestine sont caractérisées par une grande capacité à la prolifération, à l'instar des cellules progénitrices (25, 490, 518, 533, 535, 536, 538). Ainsi, les fibroblastes ventriculaires de rats nouveau-nés mis en culture expriment fortement la Nestine (86%) et sont associés avec une importante synthèse d'ADN,

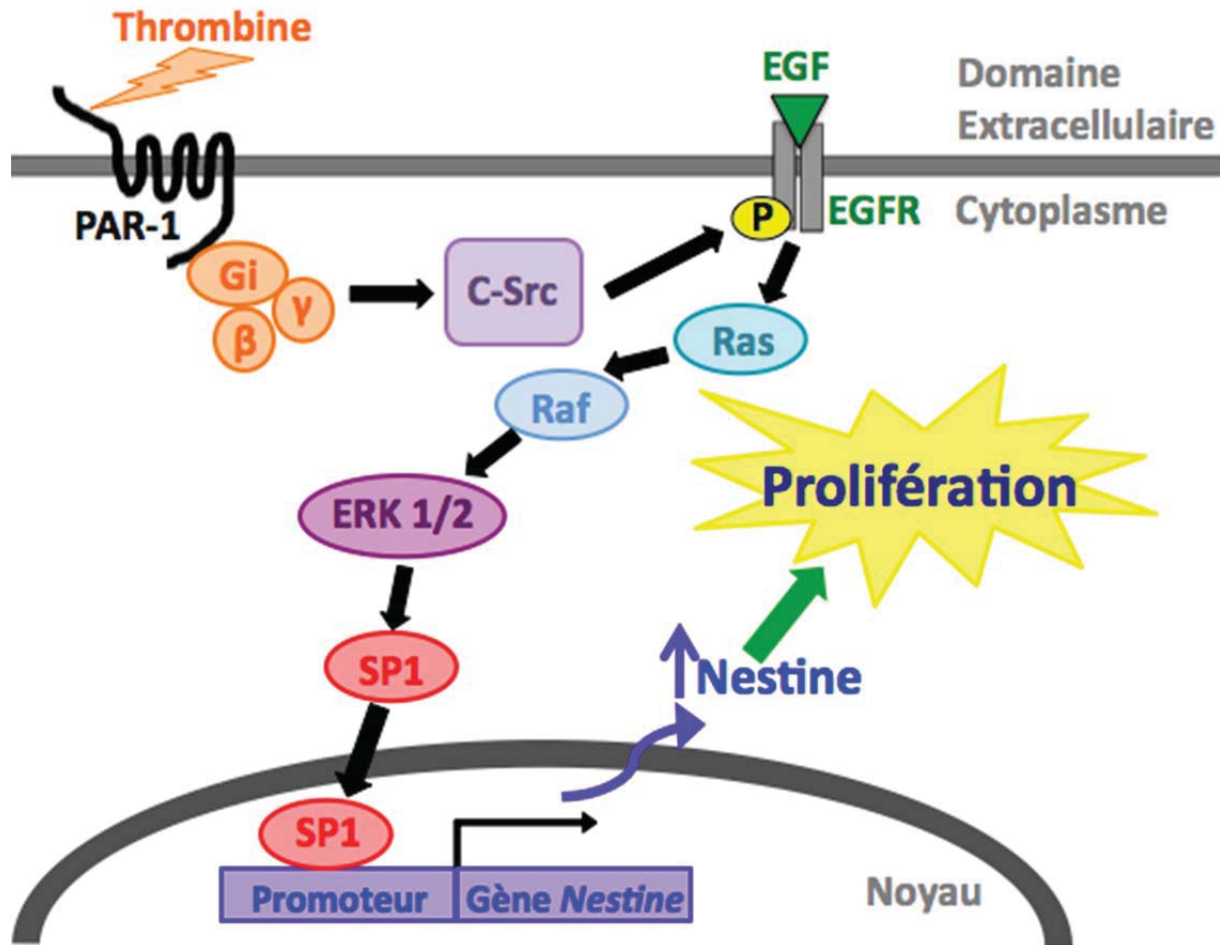
témoignant de leur phénotype prolifératif (25). Avec la croissance post-natale, les fibroblastes cardiaques adultes isolés perdent l'expression de la Nestine (7%) et cette perte d'expression est proportionnelle à la diminution de la capacité de synthèse d'ADN par ces cellules (25). Toutefois, l'isolation de myofibroblastes cicatriciels de cœurs infarctés de rats révèle que la Nestine est partiellement réexprimée par cette population cellulaire à la suite d'un infarctus du myocarde (37%) et que cette réexpression coïncide avec une augmentation proportionnelle de synthèse d'ADN, visualisée via une incorporation accrue de thymidine marquée au tritium radioactif ( $^3\text{H}$ -thymidine) par les myofibroblastes cicatriciels (25). Enfin, cette étude a confirmé l'importance de l'expression de la Nestine dans le processus de synthèse d'ADN (25). Pour ce faire, des fibroblastes ventriculaires de rats nouveau-nés ont été isolés, puis infectés avec un shRNA dirigé contre la Nestine (25). Ce faisant, les niveaux d'expression protéique et d'ARNm de la Nestine ont été réduits significativement au niveau des fibroblastes, tout comme leur capacité à incorporer la  $^3\text{H}$ -thymidine, révélant l'implication de la Nestine dans la prolifération des fibroblastes ventriculaires de rats nouveau-nés (25). Ces résultats suggèrent que les diverses populations de fibroblastes cardiaques ont des taux de synthèse d'ADN distincts en raison des niveaux d'expression différents de la Nestine par ces cellules (25). En somme, les myofibroblastes cicatriciels auraient un avantage prolifératif via l'expression accrue de la Nestine, leur permettant de sécréter de grande quantité de collagène dans l'optique d'améliorer la réponse de fibrose réparative (25).

Huang et ses collaborateurs ont quant à eux déterminé que la voie signalétique de l'EGF stimule la prolifération des CMLV, en augmentant l'expression de Nestine (535, 556). En effet, le traitement à l'EGF *in vitro* des CML, préalablement privées de sérum pour réduire l'expression de la Nestine, induit la synthèse *de novo* de la protéine et de l'ARNm de la protéine filamenteuse (556). Parmi les 4 types de récepteurs à l'EGF (EGFR) exprimés par les CML, le ErbB1 a été déterminé comme étant celui responsable de l'effet de l'EGF sur l'expression accrue de la Nestine, puisque l'inhibition spécifique de ce récepteur tyrosine kinase avec l'inhibiteur AG1478 a bloqué la réexpression de la Nestine (556). De plus, cette étude a identifié la voie de signalisation par laquelle le récepteur tyrosine kinase de l'EGF induit l'expression de la Nestine, soit la voie Ras/Raf/ERK (Voir Figure 56) (556). Huang et ses collègues se sont ensuite penchés sur une autre voie pouvant induire l'expression de la

Nestine en activant le récepteur à l'EGF (535). Ainsi, une stimulation à la thrombine active directement le récepteur PAR-1 (*Protease-Activated Receptor 1*), un récepteur couplé à une protéine Gi, ce qui induit le C-Src kinase intracellulaire (*Tyrosine-protein kinase CSK*) (535). Une fois activé, le C-Src kinase intracellulaire phosphoryle le EGFR, ce qui contribue à activer ce dernier et initie la cascade de signalisation Ras/Raf/ERK (Voir Figure 56) (535). Ils ont ensuite découvert que l'induction de l'expression de la Nestine via la Thrombine requiert le facteur de transcription SP1 (*Specificity Protein 1*) qui lie son site de liaison au niveau du promoteur de la Nestine pour induire l'expression de celle-ci (Voir Figure 56) (535). Enfin, puisqu'il est avéré que la thrombine induit la prolifération des CMLV en induisant l'activité de l'EGFR et qu'elle stimule l'expression de la Nestine par la même voie, cette équipe a alors étudié les implications de la Nestine dans la prolifération de ces cellules (535, 557, 558). Ainsi, l'utilisation de la technique RNAi (*RNA interference*) dirigé contre la Nestine a confirmé le rôle important de la Nestine dans la prolifération cellulaire, puisque la prolifération des CMLV, induite via la thrombine, était atténuée en présence du RNAi de la Nestine (Voir Figure 56) (535).

Enfin, il a été démontré que la prolifération des cellules souches neurales progénitrices, ainsi que la différenciation de celles-ci en un phénotype neuronal, est régulée par le miR-125b, un miR neuronal qui cible la région 3'UTR du gène de la Nestine (559). Les miR sont de courts ARN d'environ 22 nucléotides (560, 561). Les miR sont non-codants, mais ils jouent un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes en initiant un clivage du transcrit d'ARNm ou encore en bloquant la traduction protéique (559-561). Ainsi, une transfection endogène de miR125b induit la surexpression de miR125b par les cellules souches neurales progénitrices, et est associée avec une expression protéique réduite de la Nestine, ainsi qu'une inhibition concomitante de la prolifération cellulaire et une stimulation de la différenciation et de la migration cellulaire (559). Il est donc intéressant de vérifier les relations reliant la Nestine et le miR-125b lors du remodelage tissulaire.

Figure 56 : L'EGF et son récepteur régulent la prolifération des CMLV en augmentant l'expression de la Nestine



La prolifération des CMLV requiert l'augmentation de l'expression de la Nestine par ces cellules. Pour ce faire, le récepteur à l'EGF (EGFR, *Epidermal Growth Factor*) doit être activé pour initier la cascade de signalisation Ras/Raf/ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*), qui ultimement active le facteur de transcription SP1 (*Specific Protein 1*) qui induit l'expression de la Nestine en liant son site de liaison au niveau du promoteur du gène *Nestine*. Le EGFR peut quant à lui être activé de plusieurs manières, soit directement via l'EGF qui lie son récepteur, soit via la thrombine qui active le récepteur PAR-1 (*Protease-Activated Receptor 1*), un récepteur couplé à une protéine Gi, ce qui induit la C-Src kinase intracellulaire (*Tyrosine-protein kinase CSK*), qui peut alors phosphoryler le EGFR pour induire son activité. (535) avec la permission d'Elsevier.

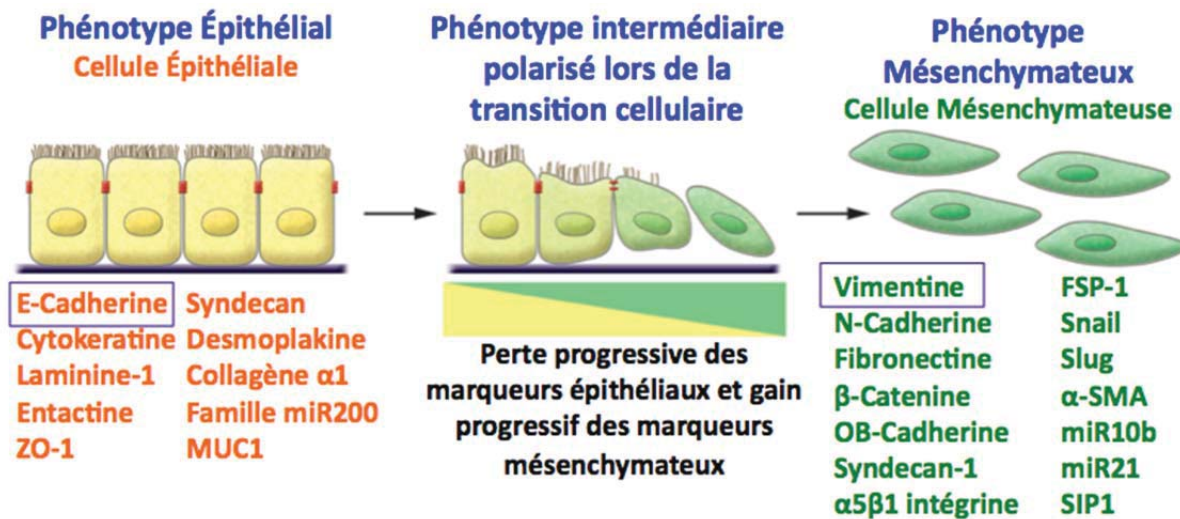
## 1.5 L'EMT ET L'ENDMT

### 1.5.1 LA TRANSITION ÉPITHÉLIO-MÉSENCHYMATEUSE

L'EMT est un processus biologique qui permet à une cellule épithéliale de se polariser afin que celle-ci se différencie en un phénotype mésenchymateux (Voir Figure 57) (299, 562-565). De cette façon, l'EMT se révèle être une source importante de myofibroblastes/fibroblastes activés, soit un type de cellules mésenchymateuses. Les cellules mésenchymateuses se distinguent des cellules épithéliales de par leur résistance élevée à l'apoptose, par leur capacité à produire davantage d'ECM, ainsi que par leur meilleure capacité migratoire et d'invasion (562). De plus, suite au développement des tissus épithéliaux, les cellules mésenchymateuses et épithéliales occupent des fonctions bien distinctes. Ainsi, les cellules épithéliales exécutent les fonctions spécifiques correspondant à leur tissu de résidence et interagissent stablement avec leur membrane basale via des contacts cellule-cellule, alors que les cellules mésenchymateuses ont plutôt un rôle de soutien (562, 565). Cependant, diverses modifications biochimiques peuvent survenir pour déclencher la polarisation des cellules épithéliales vers un phénotype mésenchymateux, et conséquemment induire l'EMT (562). Ainsi, parmi ces processus moléculaires, on retrouve l'activation de facteurs de transcription, l'expression de protéines spécifiques de la surface cellulaire, la réorganisation et l'expression de protéines du cytosquelette, la production d'enzymes de dégradation de l'ECM, ainsi que des changements dans l'expression de miR spécifiques (562). D'ailleurs, certaines de ces reprogrammations moléculaires permettront de caractériser l'EMT en étant des marqueurs propres aux différentes étapes de ce processus (Voir Figure 57) (562). De plus, les reprogrammations moléculaires permettent aux cellules épithéliales de perdre progressivement leur polarité épithéliale via le désassemblage de leurs contacts cellule-cellule, tels les jonctions adhérentes (E-Cadhérine (Cadhérine Épithéliale)), les jonctions serrées (*Zonula Occludens-1*), les desmosomes et les cytokératines, pour ainsi restructurer leurs fibres de tension d'actine F (563, 565). Enfin, le processus d'EMT est complété lorsque les cellules mésenchymateuses différenciées parviennent à migrer à distance de la couche cellulaire épithéliale dont elles sont originaires, ce qui est possible à la suite de la dégradation de la membrane basale qui était associée aux cellules épithéliales ayant subi le changement

phénotypique (562). D'ailleurs, l'EMT est un processus possédant une large plasticité phénotypique, mais qui est aussi un processus réversible. En effet, il existe également une transition mésenchymateuse-épithéliale (MET, *Mesenchymal-Epithelial Transition*), où des cellules mésenchymateuses sont converties en dérivés cellulaires épithéliales (562-565). De cette façon, l'objectif général du processus d'EMT consiste à désagréger un épithélium, pour ensuite le restituer et le reformer via la MET (563).

**Figure 57 : Le processus d'EMT**



Le processus d'EMT (Transition Épithélio-Mésenchymateuse) permet aux cellules épithéliales de se transdifférencier, via un phénotype intermédiaire polarisé, en cellules mésenchymateuses. Voici les marqueurs permettant de caractériser les cellules épithéliales (en jaune-orangé) et les cellules mésenchymateuses (en vert). ZO-1; *Zonula Occludens-1*, MUC1; *Mucin-1*, FSP-1; *Fibroblast Specific Protein-1*,  $\alpha$ -SMA; *alpha-Smooth Muscle Actin*, miR10b; *microRNA 10b*, SIP1; *Survival of motor neuron protein Interacting Protein 1*. (562) avec la permission de l'American Society for Clinical Investigation.

Plusieurs débats ont eu lieu dans la littérature quant à la nomenclature même du processus de l'EMT. Ainsi, certains l'associaient à une transdifférenciation, d'autres à une transformation, puis finalement certains à une transition. Le terme «transdifférenciation» a dû être écarté pour refléter ce phénomène, étant donné que cette terminologie fait davantage référence à des cellules différenciées qui se transforment en d'autres types cellulaires différenciés (563, 566). Le terme «transformation» a quant à lui également été éliminé étant donné qu'il ne permet pas de refléter le caractère réversible de ce processus via la MET (562).



De plus, le terme transition était déjà largement associé à une transformation néoplasique, de laquelle le programme d'EMT doit être dissocié (562).

Avant que les travaux sur la «transformation épithéliale mésenchymateuse» d'Elizabeth Hay paraissent en 1995, la littérature révélait que les cellules épithéliales, résidentes d'un épithélium différencié de manière terminale à la suite du développement, étaient maintenues dans un état de différenciation permanent, et qu'il s'agissait d'un phénomène nécessaire permettant aux cellules de réaliser leurs fonctions spécialisées (562, 567). Cependant, la découverte d'un programme d'EMT a permis de révéler que les cellules épithéliales peuvent modifier leur phénotype, même lorsque la maturité tissulaire est atteinte à l'âge adulte. Ainsi, le programme d'EMT est activé principalement en situation de réparation tissulaire, mais également pour conférer un phénotype migratoire aux cellules cancéreuses/métastatiques (562). Ce faisant, trois différents types EMT sont répertoriés, l'un est physiologique et permet le développement des organes, alors que les deux autres sont plutôt pathologiques en étant associés à la fibrose tissulaire et au développement de tumeurs (562, 564).

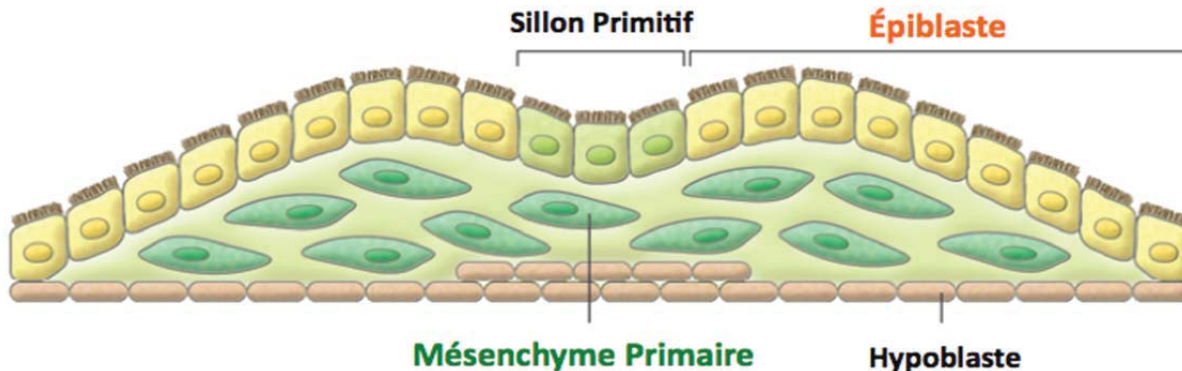
### ***1.5.1.1 Les trois sous-types d'EMT***

Les trois sous-types d'EMT sont des processus biologiques phénotypiquement bien distincts qui sont malgré tout constitués d'un ensemble d'éléments génétiques et biochimiques communs (562, 563).

#### ***1.5.1.1.1 L'EMT de type 1 est associée à la croissance physiologique***

Le premier type d'EMT est physiologique, transitoire et est associé à la croissance pour permettre de générer un organisme fonctionnel (562, 565). Ainsi, l'EMT de type 1 survient lors de l'implantation embryonnaire, la formation embryonnaire, l'initiation de la formation du placenta, la gastrulation et le développement des organes (562, 564, 565). D'ailleurs, l'EMT de type 1 est requise pour permettre la formation de structures essentielles, telles le mésoderme, l'endoderme et le neuroectoderme à partir du sillon primitif d'invagination, qui au final contribueront à la formation du cœur, du système musculo-squelettique, de la plupart des structures cranio-faciales et du système nerveux périphérique (562, 564, 565, 567-570). Brièvement, ces structures peuvent être formées lorsque les cellules épithéliales de l'épiblaste, un épithélium primitif, se différencient via le processus d'EMT en des cellules mésenchymateuses pour former un mésenchyme primaire (Voir Figure 58) (562, 565). Par la suite, ce mésenchyme primaire peut à son tour contribuer à la formation d'épithéliums secondaires, via le phénomène inverse de MET (562, 565). D'ailleurs, le processus de MET permet de compléter la différenciation cellulaire en plus de contribuer à former la structure tridimensionnelle des organes (565). Cependant, certains croient également que cet épithélium secondaire possède la capacité de se différencier en divers types de tissus épithéliaux, qui pourront ensuite se transdifférencier via l'EMT en tissus conjonctifs (562). Ainsi, le processus d'EMT peut contribuer à générer divers types cellulaires ayant un phénotype mésenchymateux, tel que les cellules migratoires de la crête neurale, les astrocytes, les adipocytes, les chondrocytes, les ostéoblastes et les cellules musculaires (562, 563, 569).

**Figure 58 : L'EMT de type 1**

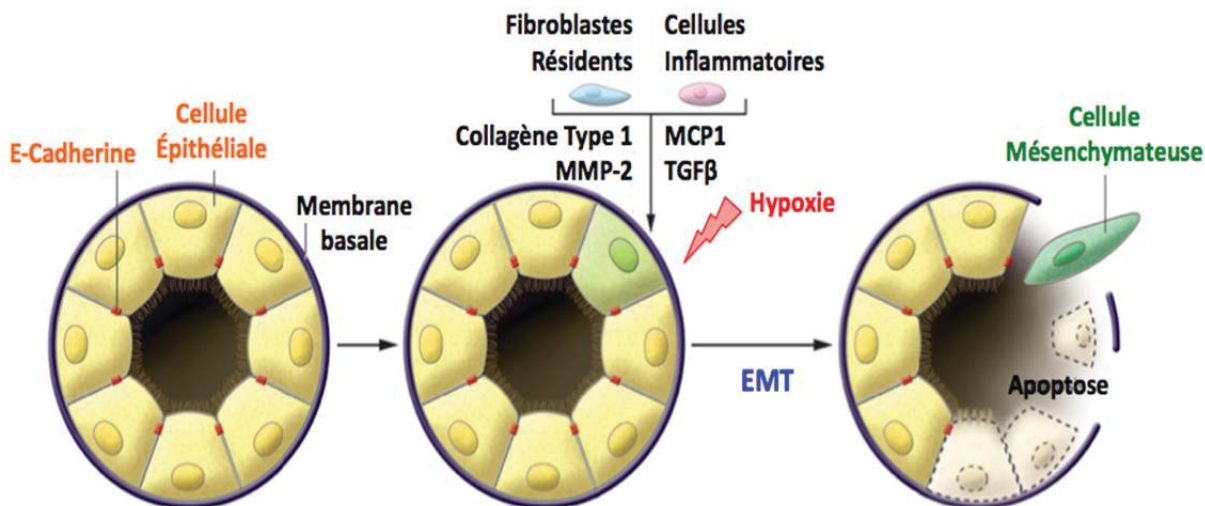


L'EMT (Transition Épithélio-Mésenchymateuse) de type 1 est associée à la croissance physiologique et contribue à la formation de structures essentielles. Pour ce faire, l'épiblaste donne naissance au mésenchyme primaire via l'EMT de type 1. (562) avec la permission de l'American Society for Clinical Investigation.

#### 1.5.1.1.2 L'EMT de type 2 est associée à la réparation et à la fibrose tissulaire

Le second type d'EMT permet de générer des fibroblastes qui sont essentiels à la réparation tissulaire et à la cicatrisation des plaies, mais également à la fibrose d'organes (Voir Figure 59) (562, 563, 565). D'ailleurs, il s'agit du type d'EMT à l'étude dans cette thèse chez

**Figure 59 : L'EMT de type 2**



L'EMT (Transition Épithélio-Mésenchymateuse) de type 2 est associée à la réparation et à la fibrose des tissus. Ce processus peut être induit via l'hypoxie, ou encore le MCP1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*), le MMP-2 (*Matrix Metalloproteinase-2*), et le TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ), libérés par les fibroblastes activés et les cellules inflammatoires recrutés au site de lésion. (562) avec la permission de l'American Society for Clinical Investigation.

le modèle hypoxique/hypobarique d'hypertension pulmonaire (Voir Chapitre 4). À la suite de lésions, une réaction inflammatoire est induite au niveau des tissus épithéliaux (562). Les cellules inflammatoires sécrètent alors une variété de chimiokines et de facteurs de croissance, tels le TGF- $\beta$ , le MMP-2, le MMP-9, le MCP-1, le PDGF, l'EGF et le FGF-2 (562, 566, 571-574). Ces signaux inflammatoires contribuent alors au recrutement d'un large éventail de cellules inflammatoires et induisent également le recrutement et l'activation de fibroblastes résidents, qui ensemble vont déclencher le processus d'EMT (562). Ce faisant, divers événements de réparation sont initiés pour permettre la reconstruction des tissus lésés. Ainsi, les fibroblastes résidents activés, connus sous le nom de myofibroblastes, libèrent alors de l'ECM, tel que du collagène, des laminines, de l'élastine et des ténascines, mais également du TGF- $\beta$  et du MMP-2 pour initier le programme d'EMT, et ces actions contribuent conjointement à la cicatrisation des plaies (562, 564). Lors du processus d'EMT, les cellules épithéliales réagissent aux molécules et aux facteurs de croissance libérés par les cellules inflammatoires et les myofibroblastes qui s'accumulent au site de lésion (Voir Figure 59) (562). Ainsi, les cellules épithéliales vont agir de concert avec les cellules inflammatoires pour provoquer la rupture des couches épithéliales en dégradant la membrane basale, ainsi que le collagène de type IV et les laminines qui forment l'ECM (562, 571). Par exemple, de manière spécifique lors d'une lésion rénale, la libération des facteurs de croissances TGF- $\beta$ , EGF et FGF-2 par les cellules inflammatoires active à la fois les fibroblastes résidents rénaux et les cellules épithéliales tubulaires à induire la dégradation de la membrane basale via les enzymes MMP-2 et MMP-9 (563, 571, 575). Par la suite, les cellules épithéliales quittent progressivement la couche épithéliale, puis traversent la membrane basale qui leur était associée, pour ensuite migrer et s'accumuler au niveau de la zone interstitielle (562, 571, 576). Ce faisant, les cellules épithéliales perdent leur polarité et subissent soit l'apoptose, soit la différenciation via l'EMT (Voir Figure 59) (562). Enfin, lorsque la réaction inflammatoire cesse, les cellules épithéliales perdent la totalité de leurs marqueurs épithéliaux et acquièrent en parallèle un phénotype totalement fibroblastique, ce qui met fin au processus d'EMT (Voir Figure 59) (562, 564). Normalement, à ce moment, la réparation des tissus lésés devrait être complétée. S'en suit alors de l'initiation de l'élimination des myofibroblastes via apoptose (564).

Cependant, la réponse inflammatoire peut être persistante et continue (562). L'inflammation chronique entraîne une activation excessive et soutenue des myofibroblastes, ce qui a pour impact d'induire le processus d'EMT de type 2 sur de longues périodes de temps et contribue alors de façon délétère à la fibrose tissulaire et à la destruction d'un organe (562, 564, 565). Ainsi, il a été démontré, via l'étude de souris transgéniques, que le processus d'EMT de type 2 contribue de façon importante aux fibroses rénales, hépatiques et intestinales (562, 565, 573, 577, 578). De plus, la littérature révèle que le processus d'EMT de type 2 survient chez les CAE lors de maladies pulmonaires fibrotiques à la suite d'une irradiation, lors de la fibrose idiopathique pulmonaire chez l'humain et chez des modèles expérimentaux de fibrose pulmonaire (299, 328, 562, 565, 579-586). En effet, des expérimentations *in vitro* combinées à 6 études *in vivo* de traçage de lignées cellulaires, ont révélé qu'une sous-population de CAEII se différencie en un phénotype de fibroblastes sécrétant du collagène via l'EMT de type II sous l'effet du TGF- $\beta$  (328, 565, 579, 581-583, 585, 587, 588). D'ailleurs, lors du développement de fibrose, plusieurs types cellulaires sont recrutés pour générer des fibroblastes activés sécrétant de l'ECM (Voir Section 1.2.2.2.2). Ainsi, une étude réalisée par le groupe de Neilson utilisant des expériences de marquage de lignées cellulaires et des études de greffe de moelle osseuse ont révélé les proportions des populations de cellules générant des fibroblastes chez un modèle chirurgical de fibrose rénale via l'obstruction unilatérale de l'uretère chez la souris (562, 563, 566). Il est à noter que ces proportions ne sont démontrées qu'à titre d'exemple et pourraient varier en fonction du type et du stade de la fibrose, de l'organe atteint ou encore du modèle employé (562). Ainsi, chez ce modèle de stress fibrogénique, 36% des fibroblastes sont dérivés de l'EMT, alors que 15% sont dérivés de la moelle osseuse (562, 563, 566). De plus, une autre étude a démontré que le processus d'EndMT est quant à lui responsable de la formation d'environ 35% fibroblastes chez un modèle de fibrose rénale (562, 589). La proportion restante de fibroblastes générés *de novo* à la suite d'une fibrose proviendrait potentiellement de l'activation et de la prolifération des fibroblastes résidents ou encore d'autres types de cellules mésenchymateuses et stromales, tels les fibrocytes, les péricytes et les CML périvasculaires (562).

Les études ayant pour objectif de déterminer la contribution de l'EMT dans le développement de fibroses pulmonaires, hépatiques, rénales et intestinales ont utilisé de

nombreux marqueurs des cellules mésenchymateuses : le FSP-1, l' $\alpha$ SMA, collagène de type 1, la fibronectine, le DDR2 (*Discoidin Domain Receptor tyrosine kinase 2*), la Vimentine et la Desmine (328, 562, 565, 566, 572, 573, 590). Évidemment, certaines cellules présentaient également un phénotype intermédiaire où des marqueurs moléculaires épithéliaux, tels que la cytokératine et la E-Cadhérine, continuaient à être exprimés en concomitance avec des marqueurs mésenchymateux nouvellement acquis (Voir Figure 57) (562). Il convient toutefois d'ajouter que ces marqueurs mésenchymateux ne sont pas exprimés uniquement par les cellules mésenchymateuses, tels les fibroblastes. Ainsi, la Vimentine n'est pas spécifique aux fibroblastes, car elle peut aussi être exprimée au niveau des cellules endothéliales, des CML ou des péricytes (21, 563). De plus, le collagène de type I est quant à lui représentatif de sous-populations de fibroblastes qui synthétisent cet élément de l'ECM (563, 566). L' $\alpha$ SMA est quant à elle exprimée uniquement par certaines sous-populations de fibroblastes activés (myofibroblastes) et ces cellules peuvent parfois être confondues avec des CML  $\alpha$ SMA<sup>(+)</sup> ayant migré au site de lésion fibrotique via le processus d'EndMT à partir de cellules endothéliales (Voir Section 1.5.2) (563). L'absence d'un marqueur spécifique des sous-populations de fibroblastes activés contribue à la présence de résultats contradictoires dans la littérature (328, 563). En effet, d'autres études ont plutôt conclu à l'absence de processus d'EMT dans le développement des fibroses pulmonaires et hépatiques (324, 325, 328, 591-593). C'est pourquoi il serait pertinent d'identifier une protéine qui est exprimée uniformément par les myofibroblastes activés qui participent aux processus fibrotiques, et ce, peu importe leur origine cellulaire (Voir Chapitre 4).

Enfin, il est important de souligner qu'un facteur de croissance pro-fibrotique, le TGF- $\beta$ , est impliqué de manière centrale dans le programme d'EMT (562, 563, 565, 594, 595). De plus, chez un modèle de fibrose rénale via l'obstruction chirurgicale unilatérale de l'uretère chez la souris, l'administration d'un antagoniste endogène du TGF- $\beta$ , le BMP-7 (*Bone Morphogenic Protein 7*), permet de renverser le processus d'EMT en plus de réparer les tissus endothéliaux rénaux lésés en réduisant la fibrose (562, 563, 573). Également, le TGF- $\beta$ <sub>1</sub> exogène est reconnu pour initier le processus d'EMT chez les CAE (564, 579, 586, 595, 596). De plus, chez un modèle hypoxique de fibrose pulmonaire, l'hypoxie a induit le processus



d'EMT via une voie de signalisation dépendante du TGF- $\beta_1$  (595). En effet, l'administration d'un inhibiteur du récepteur de type I du TGF- $\beta_1$ , le SB431542, a eu pour conséquence de prévenir l'avènement du processus d'EMT normalement induit via l'hypoxie (595). En somme, l'hypoxie et le TGF- $\beta_1$  sont deux facteurs qui induisent la transition des CAE en cellules mésenchymateuses, ce qui contribue au développement de la fibrose pathologique pulmonaire.

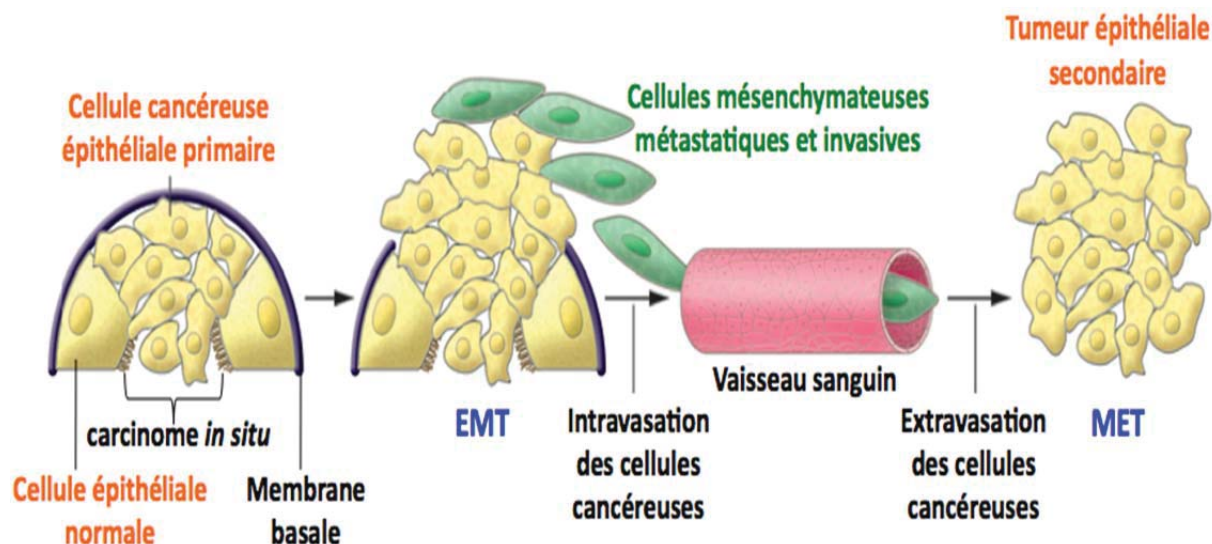
#### ***1.5.1.1.3 L'EMT de type 3 contribue à la progression des cancers via la formation de métastases***

Le troisième type d'EMT est induit chez des cellules cancéreuses épithéliales, ce qui confère aux cellules tumorales un phénotype invasif, ainsi qu'un phénotype migratoire leur permettant de former des métastases (562, 564, 565, 570). D'ailleurs L'EMT de type 3 est reconnue pour survenir au niveau du cancer du côlon, du cancer des bronches, du cancer ovarien, du cancer des glandes mammaires et du cancer de l'œsophage (564, 565). Ainsi, ce programme est considéré comme étant le mécanisme essentiel qui permet aux cellules épithéliales cancéreuses d'acquérir un phénotype malin (562, 570). De cette façon, l'EMT de type 3 contribue de manière néfaste aux étapes terminales associées avec la progression du cancer (562). Les cellules néoplasiques subissent l'EMT à des degrés divers, et ce faisant, des phénotypes distincts sont observés lors de ce processus. Ainsi, certaines des cellules épithéliales se différencient totalement en cellules mésenchymateuses, alors que d'autres conservent une partie du phénotype épithélial, tout en acquérant certaines caractéristiques des cellules mésenchymateuses (562).

Lors du développement d'un cancer, les cellules épithéliales normales subissent dans un premier temps des modifications génétiques et épigénétiques au niveau des gènes qui contribuent à l'excroissance clonale et au développement de tumeurs localisées, ce qui contribue à la formation des cellules épithéliales cancéreuses primaires prolifératives (Voir Figure 60) (562). D'ailleurs, l'initiation des cancers épithéliaux primaires est associée à une prolifération excessive des cellules épithéliales ainsi qu'à l'induction d'une angiogenèse essentielle à la vascularisation de la tumeur, ce qui contribue à sa croissance (562, 597). Par la

suite, l'EMT est initiée. Cependant, les signaux spécifiques contribuant au développement du programme d'EMT ne sont pas totalement connus (562). Certaines hypothèses ont cependant été émises. Ainsi, il serait possible que les signaux déclenchant l'EMT, tels le TGF- $\beta$ , l'EGF et le PDGF, proviennent du stroma associé à la tumeur (562, 564, 570). Cependant, ces signaux seraient aptes à induire l'EMT uniquement chez les cellules épithéliales devenues sensibles à ces signaux suite aux modifications génétiques et épigénétiques (562). Une fois le programme d'EMT déclenché, les cellules épithéliales cancéreuses perdent leur polarité, ce qui provoque leur détachement de la membrane basale (562). Ce phénomène induit également des changements au sein de la composition de la membrane basale et des interactions cellule-ECM, et ces modifications contribuent conjointement à la rupture de la membrane basale (Voir Figure 60) (562). Par exemple, la littérature révèle que le TGF- $\beta$  permet aux cellules cancéreuses épithéliales mammaires d'envahir la membrane basale qui leur est associée, ce qui permet à ces cellules de quitter la tumeur primaire (564). Par la suite, des cellules épithéliales ayant acquis un phénotype mésenchymateux/invasif/métastatique suite à l'EMT et exprimant des marqueurs mésenchymateux tels que l' $\alpha$ -SMA, le FSP-1, la Vimentine et la Desmine, sont observées sur le front invasif des tumeurs primaires qui traversent la membrane basale (Voir Figure 60) (562, 565, 598). Ces cellules contribuent ensuite à la cascade d'invasion métastatique. Ainsi, les cellules mésenchymateuses cancéreuses entrent dans la circulation sanguine via intravasation, pour ensuite quitter le flux sanguin via extravasation, pour aller se disséminer à distance du site cancéreux primaire (Voir Figure 60) (562). Enfin, ce processus se termine via la formation de micrométastases et de macrométastases, où les cellules mésenchymateuses se différencient en cellules épithéliales via le processus de MET pour former une tumeur épithéliale secondaire (562, 570, 599).

Figure 60 : L'EMT de type 3



L'EMT (Transition Épithélio-Mésenchymateuse) de type 3 contribue à la progression des cancers via la formation de cellules mésenchymateuses métastatiques qui voyagent dans la circulation sanguine. Le processus de MET (Transition Mésenchymateuse-Épithéliale) est impliqué dans la formation de tumeurs épithéliales secondaires. (562) avec la permission de l'American Society for Clinical Investigation.

### 1.5.1.2 La Nestine et l'EMT

Plusieurs études ont démontré que la Nestine a un rôle biologique au niveau de la prolifération cellulaire, de la migration, de la différenciation et de l'invasivité (25, 151, 518, 526, 532-538). Ce faisant, une expression accrue de la Nestine a été détectée au niveau de plusieurs cellules cancéreuses, reconnues pour leur caractère prolifératif et migratoire, tels les mélanomes malins, les tumeurs du système nerveux central, les tumeurs de la thyroïde, les tumeurs gastro-intestinales, le cancer du pancréas, le cancer de la prostate et le cancer du sein (487, 490, 526, 532-534, 537, 538, 600-602). Ainsi, l'étude publiée en 2014 et réalisée par Zhao et ses collègues a révélé que de bloquer l'expression de Nestine (*Nestin-silenced*) a pour conséquence d'inhiber significativement la capacité migratoire des cellules souches cancéreuses (CSC) mammaires via un essai de migration à travers les puits (*transwell migration assay*) *in vitro* (533). Également, leurs travaux ont révélé que le *knockdown* de Nestine provoque cette perte de capacité invasive en bloquant le processus spontané d'EMT de type 3 associé avec ce type de cancer du sein (533). Ainsi, lorsque l'expression de Nestine

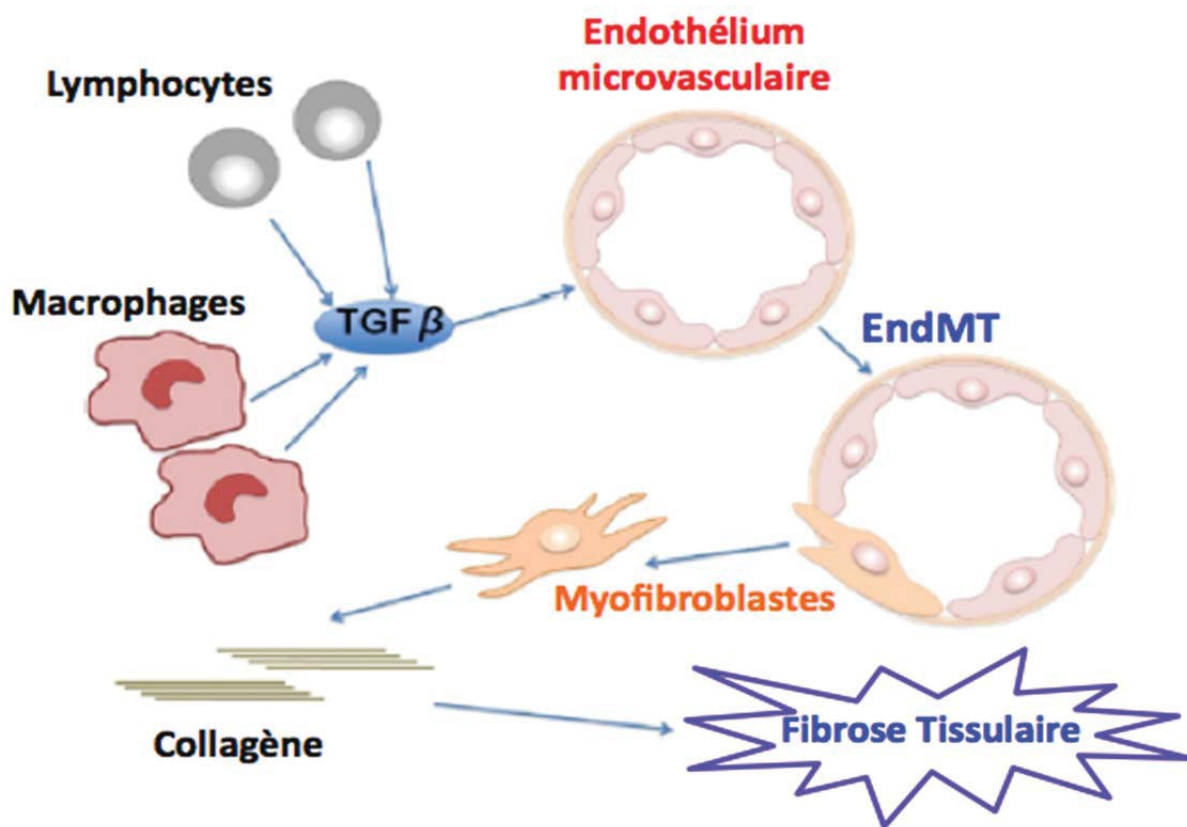
est rendue silencieuse au niveau des CSC mammaires, alors l'expression protéique des marqueurs mésenchymateux (N-Cadhérine (Cadhérine Neurale), Vimentine et  $\alpha$ -SMA) est réduite significativement, alors que celle du marqueur épithélial E-Cadhérine est augmentée significativement (533). D'autres études ont exposé la Nestine à titre de modulateur dans les processus d'EMT de type 3 pour contribuer à la migration de cancers et à la formation de métastases chez des adénocarcinomes pulmonaires et pancréatiques (532, 534, 537, 538). En effet, la suppression de l'expression de la Nestine au niveau de cellules d'adénocarcinome du canal pancréatique a résulté en une diminution du potentiel métastatique de ces cellules (537). De plus, l'étude réalisée par Su et ses collègues a démontré que la Nestine contribue à l'EMT de type 3 au niveau de cellules d'adénocarcinome du canal pancréatique via une voie de signalisation TGF- $\beta_1$  dépendante (534). Enfin, le rôle de la Nestine dans la modulation des processus d'EMT de type 2 a également été révélé par l'étude du groupe de Zoukhri (603). Ainsi, il a été observé que la Nestine est une protéine importante pour initier la cicatrisation de la glande lacrymale lésée, puisqu'elle contribue à la migration des cellules mésenchymateuses générées via le processus d'EMT au niveau du site de dommage (603). Cependant, l'implication de la Nestine dans des processus d'EMT de type 2 associés à des pathologies fibrotiques pulmonaires n'a pas été révélée jusqu'à présent dans la littérature (Voir Chapitre 4).

## 1.5.2 LA TRANSITION ENDOTHÉLIO-MÉSENCHYMATEUSE

L'EndMT est un autre processus de transdifférenciation cellulaire qui se révèle être une source importante de fibroblastes lors de pathologies fibrotiques (562, 604-607). Malgré une importante et récente émergence, l'EndMT est toutefois beaucoup moins présente dans la littérature, que l'EMT. Ainsi, l'EndMT est un processus biologique complexe lors duquel des cellules endothéliales résidentes perdent leur phénotype endothélial, caractérisé par la présence du marqueur CD31, la VE-Cadhérine (Cadhérine Endothéliale Vasculaire) et l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ , et gagnent en parallèle un phénotype différencié de cellules mésenchymateuses, caractérisé par la présence des marqueurs FSP-1, l' $\alpha$ -SMA, le collagène de type I et III, la N-Cadhérine et la Vimentine (562, 604, 606, 607). Ce faisant, ces cellules acquièrent des propriétés d'invasion et de migration, ce qui leur permet de participer à des processus physiologiques et pathologiques (604, 605). Similairement à l'EMT, lors de l'EndMT, les cellules endothéliales perdent leurs jonctions cellule-cellule et se détachent d'une couche de cellules organisées et gagnent ensuite les caractéristiques invasives et migratoires des cellules mésenchymateuses pour envahir le tissu sous-jacent (604, 607, 608). Le phénomène de l'EndMT a été découvert pour la première fois lors du développement embryonnaire permettant la formation des valves cardiaques, où des cellules endothéliales de l'endocarde se différencient en cellules mésenchymateuses pour permettre la formation des valves et des cloisons cardiaques (137, 562, 604, 605, 609, 610). Par la suite, il a été démontré que les cellules endothéliales pulmonaires embryonnaires peuvent aussi se transdifférencier en cellules mésenchymateuses via le processus d'EndMT, afin de contribuer au remodelage vasculaire pulmonaire et à l'épaississement de l'*intima* lors du développement (342, 604). De plus, le processus d'EndMT peut être réinitialisé lors du remodelage vasculaire pulmonaire associé avec l'hypertension pulmonaire (342, 604). Également, suite au développement post-natal, le programme d'EndMT est réinitié en situation de cancers fibrotiques, mais également lors de pathologies fibrotiques cardiaques, pulmonaires, hépatiques, rénales et intestinales, ainsi qu'en présence de néphropathie diabétique (137, 589, 604-607, 611-614). Ainsi, de manière similaire à l'EMT, le processus d'EndMT, induit lors du développement de pathologies fibrotiques, est initié lorsque du TGF- $\beta_1$  est sécrété par des cellules inflammatoires associées à l'inflammation chronique, tels les macrophages et les lymphocytes (137, 606,

607). Conséquemment, ce facteur de croissance pro-fibrotique initie le programme d'EndMT, où les myofibroblastes d'origine endothéliale migrent dans le tissu interstitiel pour ainsi contribuer à la fibrose des organes via la synthèse et la sécrétion de collagène et d'ECM (Voir Figure 61) (606). De plus, dans un modèle *in vitro* d'EndMT dépendant du TGF- $\beta$ , l'hypoxie a induit davantage le processus d'EndMT (608).

**Figure 61 : Schématisation du processus d'EndMT en situation de fibrose pathologique tissulaire**



Le processus de fibrose est initié par les cellules inflammatoires chroniques, tels les lymphocytes et les macrophages, qui infiltrerent les tissus endommagés et sécrètent du TGF- $\beta$ 1 (*Transforming Growth Factor- $\beta$ 1*). Le TGF- $\beta$ 1 provoque alors la transition des cellules endothéliales de l'endothélium vasculaire, en myofibroblastes via le processus de transition Endothélio-Mésenchymateuse (EndMT). Ces myofibroblastes d'origine endothéliale migrent alors au tissu interstitiel et sécrètent du collagène pour participer à la fibrose pathologique tissulaire. (606) avec la permission d'Elsevier.



L'EndMT est un processus fortement impliqué dans la cicatrisation cardiaque à la suite d'un infarctus du myocarde et il implique à la fois l'endocarde et les cellules endothéliales vasculaires cardiaques (137, 562, 604, 606, 615). Ainsi, l'EndMT participe à ce processus de réparation tissulaire cardiaque de deux manières, soit dans un premier temps en générant des myofibroblastes essentiels à la formation de la cicatrice, soit dans un deuxième temps en contribuant à la formation de nouvelles cellules endothéliales permettant la néovascularisation (604). De plus, l'EndMT contribue au recrutement de péricytes et de CML qui proviennent directement de l'endothélium durant l'angiogenèse (604). Également, la littérature révèle que l'EndMT est un programme essentiel lors de l'angiogenèse, car il permet la stabilisation de la vascularisation formée *de novo* (604, 616). D'ailleurs, le TGF- $\beta_1$  initie la transdifférenciation des cellules endothéliales via le processus d'EndMT en situation de fibrose cardiaque (137, 606). En effet, l'administration d'un antagoniste endogène du TGF- $\beta$ , le BMP-7, a inhibé de manière significative le processus d'EndMT ainsi que le développement de la fibrose cardiaque présent chez un modèle de constriction aortique chez la souris (137, 606). En outre, cette étude réalisée par Zeisberg et ses collègues a permis de révéler que de 27% à 35% des fibroblastes générés lors du développement de la fibrose cardiaque secondaire à la constriction aortique sont originaires de cellules endothéliales via le processus d'EndMT (137, 606).

Enfin, la littérature révèle que le programme d'EndMT survient également lors de la fibrose pulmonaire (342, 604, 606, 607, 611). En effet, Hashimoto et ses collaborateurs ont démontré ce phénomène via un modèle de fibrose pulmonaire secondaire à l'administration de bléomycine chez des souris transgéniques dont les lignées de cellules endothéliales expriment stablement le LacZ (606, 611). Ainsi, des fibroblastes LacZ<sup>(+)</sup> ont été observés dans les zones fibrotiques pulmonaires, révélant alors leur origine endothéliale (606, 611). Par la suite, l'isolation de fibroblastes, provenant des tissus fibrotiques pulmonaires de souris transgéniques ayant reçu l'administration de bléomycine, a révélé qu'environ 16% des fibroblastes collagène de type I<sup>(+)</sup> et/ou collagène type I<sup>(+)</sup>/ $\alpha$ SMA<sup>(+)</sup> étaient d'origine endothéliale (LacZ<sup>(+)</sup>), alors que cette proportion chute à 3% chez les fibroblastes provenant de souris transgéniques ne présentant pas de fibrose pulmonaire (injection de saline) (606, 607, 611). Enfin, cette étude a aussi démontré que le traitement d'une lignée cellulaire endothéliale

avec du TGF- $\beta$ , en concomitance avec du Ras activé, a induit le processus d'EndMT en diminuant les marqueurs spécifiques des cellules endothéliales et en augmentant en parallèle de 10 à 20 fois l'expression des marqueurs des cellules mésenchymateuses, soit la fibronectine et le collagène de type I (606, 611). Il apparaît clair que le programme d'EndMT survient lors de pathologies pulmonaires fibrotiques. Cependant, l'implication de la Nestine dans le processus d'EndMT associé à une fibrose pulmonaire n'a pas été exposée jusqu'à présent dans la littérature (Voir Chapitre 4).

## 1.6 JUSTIFICATION DES ÉTUDES

Globalement, l'objectif de cette thèse est d'établir l'implication de la Nestine lors de la cicatrisation cardiaque et de la fibrose réactive pulmonaire, tout en explorant les mécanismes de régulation de cette protéine filamenteuse intermédiaire. Nous avons émis l'hypothèse que son expression est bénéfique dans les processus de réparation, mais délétère dans les réponses pathologiques. Conséquemment, une meilleure compréhension de la régulation de l'expression de la Nestine lors de la fibrose réparative cardiaque secondaire à l'infarctus du myocarde, tant chez les patients diabétiques que non-diabétiques, et en situation de fibrose réactive et d'hypertension pulmonaire pourrait donner lieu à une nouvelle cible thérapeutique.

### 1.6.1 JUSTIFICATION DU PREMIER ARTICLE

Il est reconnu que l'hyperinnervation sympathique survient 3 à 4 jours à la suite d'un infarctus du myocarde dans la région cicatricielle et entourant la cicatrice, ainsi qu'au niveau du myocarde non ischémié (6, 8, 58-61, 63, 65, 66, 72-75). Cette hyperinnervation sympathique participe à la fibrose réparative en accroissant la germination et l'activité des fibres sympathiques, en plus de stimuler la prolifération des myofibroblastes cicatriciels (6, 58, 59, 73-75, 111, 129, 172, 173). Des membres de notre laboratoire ont établi que des cellules résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup>, qui ont un phénotype de cellules souches neurales progénitrices, contribuent elles aussi à la synthèse *de novo* de fibres sympathiques dans la région cicatricielle et entourant la cicatrice en acquérant un phénotype neuronal Neurofilament-M<sup>(+)</sup> (6, 58, 60, 61, 63, 73-75, 178). D'ailleurs, l'utilisation d'un modèle de transplantation cardiaque hétérotopique isogénique a révélé que ces cellules résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> peuvent non seulement fournir un support à la germination sympathique, mais qu'elles participent aussi directement, et de manière indépendante de l'hyperinnervation sympathique, à la neurogenèse et à la fibrose réparative cardiaque (6, 58). Malgré cette importante avancée dans le domaine de la neurogenèse cardiaque, le processus permettant la différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal n'a pas encore été identifié. À l'époque, des expérimentations avaient été réalisées dans l'optique de vérifier si la sécrétion de NGF ou encore l'avènement de l'hypoxie pourraient stimuler la différenciation des

CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal, mais ces hypothèses avaient été écartées (6, 58). Ce faisant, le premier article a pour objectif d'identifier des éléments impliqués dans la différenciation des cellules résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal. Or, il est reconnu que la GAP43 est une médiatrice précoce et essentielle de la neurogenèse et il a également été démontré que la différenciation, en un phénotype neuronal, des cellules de la peau originaires de la crête neurale est associée à une régulation à la baisse de l'expression de la Nestine et à une augmentation concomitante de l'expression de la protéine GAP43 (59, 154, 197, 199, 200). Toutefois, jusqu'à ce jour, aucune étude ne s'est penchée sur la régulation temporelle de l'expression de GAP43 lors de la transition des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal dans le processus de fibrose réparative. Nous avons alors émis l'hypothèse qu'une régulation à la hausse de la protéine GAP43 pourrait constituer un événement précoce et transitoire dans la différenciation des cellules CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal Neurofilament-M<sup>(+)</sup>, afin que celles-ci contribuent à la neurogenèse cardiaque.

Les patients diabétiques présentent de nombreuses complications, dont une augmentation significative de la mortalité post infarctus du myocarde, ainsi qu'un plus haut taux de progression de l'infarctus du myocarde en insuffisance cardiaque (48, 59, 65, 389, 390, 423-426). Ces différences majeures entre les populations diabétiques et non diabétiques sont, entre autres, attribuables au fait que les réponses angiogéniques et neurogéniques sont affaiblies par la condition diabétique, provoquant une réponse altérée de la fibrose réparative cardiaque chez ces patients (59, 65, 409-411, 445-448). Ainsi, la première étude de cette thèse a pour second objectif de déterminer le type cellulaire affecté par la condition diabétique, expliquant la présence d'une réponse neurogénique inadéquate à la suite d'un infarctus du myocarde chez les patients diabétiques. Or, des membres de notre laboratoire ont établi la contribution des CSNPRCN<sup>(+)</sup> à la neurogenèse induite à la suite d'un infarctus du myocarde (6, 58, 60, 61, 63, 73-75, 178). De plus, ils ont également démontré que le traitement de rats adultes avec le 6-HD induit la dégénération des fibres sympathiques cardiaques, stimulant la synthèse *de novo* de fibres neurofilament-M<sup>(+)</sup> à partir de CSNPRCN<sup>(+)</sup> (58, 61). Nous avons alors émis l'hypothèse qu'un environnement diabétique entrave la différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal, différenciation qui serait normalement initiée à la suite d'un infarctus du myocarde ou à la suite d'une injection de 6-HD.

## 1.6.2 JUSTIFICATION DU SECOND ARTICLE

De nombreuses études réalisées précédemment par des membres de notre laboratoire ont établi le rôle de la Nestine dans la fibrose réparative cardiaque (6, 25, 58-64). De manière spécifique, il a été démontré qu'une expression accrue de la Nestine par les myofibroblastes cicatriciels cardiaques est associée à une plus grande synthèse d'ADN par ceux-ci, suggérant un avantage prolifératif dans l'optique d'améliorer la réponse de fibrose réparative cardiaque (25). D'ailleurs, la littérature révèle que les cellules qui expriment la Nestine sont caractérisées par une grande capacité à la prolifération, à l'instar des cellules progénitrices (25, 490, 518, 533, 535, 536, 538). Les résultats de Pauline Béguin publiés en 2009 démontrent quant à eux qu'une semaine à la suite d'un infarctus du myocarde chez le rat il y a une importante augmentation de l'expression de la Nestine au niveau du ventricule gauche non infarcté, soit une région du myocarde associée avec la présence de fibrose réactive cardiaque (8, 59, 110, 204). De plus, lors de pathologies fibrotiques rénales et hépatiques, des populations de myofibroblastes qui expriment fortement la Nestine ont été identifiées au sein de ces organes (523-525). Or, l'hypertension pulmonaire secondaire aux maladies du cœur gauche est une pathologie caractérisée par le développement d'une fibrose réactive pulmonaire précoce qui entraîne un remodelage structurel pulmonaire (160, 295, 296, 310, 311, 331-333). Cette fibrose réactive pulmonaire est associée à la prolifération abondante de myofibroblastes pulmonaires  $\alpha$ -SMA<sup>(+)</sup>, entraînant une synthèse incontrôlée d'ECM, des dépôts significatifs de collagène et de réticuline dans les cloisons alvéolaires, un épaissement de la membrane alvéolocapillaire et une perte de compliance pulmonaire (23, 160, 295, 296, 310, 311, 330-333). La seconde étude a donc pour objectif d'établir l'expression basale de la Nestine au niveau du tissu pulmonaire de rat, ainsi que de déterminer si les myofibroblastes recrutés lors du développement de la fibrose pulmonaire à la suite d'un infarctus du myocarde expriment la Nestine, leur procurant un phénotype prolifératif caractéristique de la fibrose réactive pulmonaire.

Les patients DT1 et DT2 présentent des complications pulmonaires, comprenant un remodelage pulmonaire, une fibrose réactive pulmonaire, un épaissement de la membrane alvéolocapillaire et une dysfonction pulmonaire (160, 457-461, 466, 467). Il a également été

démontré que le système Rénine-Angiotensine est impliqué dans le développement de la fibrose réactive pulmonaire secondaire à la pathologie diabétique et à l'hypertension pulmonaire induite à la suite d'un infarctus du myocarde (160, 311, 467, 470). Puisqu'une prolifération accrue des myofibroblastes pulmonaires contribue à la fibrose réactive associée au développement de l'hypertension pulmonaire (23, 160, 295, 296, 310, 311, 330-333), alors un second objectif de ce deuxième article consiste à établir l'implication des myofibroblastes pulmonaires dans le développement de la fibrose pulmonaire en condition diabétique. Nous avons ainsi émis une hypothèse regroupant les deux objectifs de cette étude, soit que la Nestine est exprimée par les fibroblastes résidents des poumons et que les motifs d'expression de la protéine filamenteuse intermédiaire constituent des marqueurs de fibrose réactive pulmonaire chez des modèles expérimentaux d'infarctus du myocarde et de DT1.

### **1.6.3 JUSTIFICATION DU TROISIÈME ARTICLE**

Vous constaterez à la lecture du Chapitre 3 que la fibrose réactive pulmonaire, secondaire à un infarctus du myocarde chez le rat, est associée avec une expression accrue de la Nestine au niveau du tissu fibrotique pulmonaire et que la stimulation des myofibroblastes pulmonaires avec des stimuli pro-fibrotiques induit l'expression de la Nestine par ces cellules (160). Il est également reconnu que les fibroblastes pulmonaires activés  $\alpha$ -SMA<sup>(+)</sup>, ou myofibroblastes pulmonaires, sont quant à eux le principal type cellulaire impliqué dans les processus de fibrose réactive initiés lors de dommages pulmonaires, dû à leur caractère prolifératif et à leur capacité à synthétiser fortement le collagène (23, 311, 327). À travers l'organisme, de nombreux précurseurs des myofibroblastes ont été identifiés lors du développement de pathologies fibrotiques (23, 114). Ainsi, les fibroblastes activés sont principalement originaires de cellules stromales résidentes, mais les mécanismes d'EMT et d'EndMT contribuent également au recrutement de myofibroblastes, tout comme les fibrocytes circulants dérivés de la moelle osseuse peuvent aussi être une source de fibroblastes activés (23, 109, 114, 314, 323-326, 606, 611). Cependant, l'absence d'un marqueur spécifique des sous-populations de fibroblastes activés contribue à ce qu'il y ait des résultats contradictoires quant à l'origine exacte des myofibroblastes pulmonaires qui participent au développement de pathologies fibrotiques des poumons (328, 563). En effet, de nombreuses



études ont déterminé que l'EMT de type 2 contribue au développement de pathologies fibrotiques pulmonaires (299, 328, 562, 565, 579-586), alors que d'autres ont plutôt conclu à l'absence de la contribution du processus d'EMT dans le développement de ce type de fibroses (324, 325, 328). C'est pourquoi l'objectif de cette étude consiste à identifier un marqueur spécifique des fibroblastes activés, permettant ainsi de confirmer d'où sont originaires les myofibroblastes qui contribuent à la réponse de fibrose réactive pulmonaire. Les fibroses réactives hépatiques, rénales et pulmonaires sont caractérisées par une expression accrue de la Nestine et par l'apparition de fibroblastes activés Nestine<sup>(+)</sup> au niveau des tissus fibrotiques (160, 522-525). D'ailleurs, il a été identifié que l'ampleur de la réponse fibrotique rénale, reflétée par la déposition du collagène, est proportionnelle à la densité de cellules interstitielles Nestine<sup>(+)</sup> (524). Ces résultats concordent avec le rôle établi de la Nestine dans la prolifération cellulaire (25, 490, 518, 533, 535, 536, 538). En effet, il a été démontré qu'une expression accrue de la Nestine par les myofibroblastes cicatriciels cardiaques est associée à une plus grande synthèse d'ADN par ceux-ci, suggérant un avantage prolifératif dans l'optique d'améliorer la réponse de fibrose réparative cardiaque (25). De plus, le Chapitre 3 révélera que l'exposition des myofibroblastes pulmonaires à des facteurs pro-fibrotiques stimule fortement l'expression de la Nestine par ces cellules, pouvant contribuer à initier la réponse de fibrose réactive pulmonaire chez des rats ayant subi un infarctus du myocarde (160). Par ailleurs, des études ont exposé la Nestine à titre de modulateur dans les processus d'EMT de type 3, contribuant au développement de cancers et à la formation de métastases en conférant un phénotype prolifératif, migratoire et invasif aux cellules cancéreuses pulmonaires, mammaires et pancréatiques (532-534, 537, 538). Enfin, l'expression de la Nestine s'est également révélée importante dans l'initiation de processus d'EMT de type 2 pour contribuer à la cicatrisation de la glande lacrymale lésée (603). À la lumière de ces observations, nous avons alors émis l'hypothèse suivante, soit que la Nestine est exprimée durant la transition des cellules épithéliales et endothéliales à un phénotype mésenchymateux et que son expression est accrue au niveau des cellules stromales résidentes, stimulées via des facteurs de croissance. De plus, le développement de fibroses réactives pulmonaires serait attribuable à l'apparition des fibroblastes activés via la collaboration de ces 3 types cellulaires, mais leur contribution relative serait fonction du type de pathologie fibrotique et de sa sévérité.

**CHAPITRE 2 : LA RÉPONSE NEUROGÉNIQUE DES  
CELLULES RÉSIDENTES CARDIAQUES NESTINE<sup>(+)</sup>  
EST ASSOCIÉE AVEC UNE RÉGULATION À LA  
HAUSSE DE GAP43 QUI EST ABOLIE EN SITUATION  
DE DIABÈTE DE TYPE 1**

**ORIGINAL INVESTIGATION**

**Open Access**

# The neurogenic response of cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> cells was associated with GAP43 upregulation and abrogated in a setting of type I diabetes

Andréanne Chabot<sup>1,2</sup>, Marc-André Méus<sup>1,2</sup>, Vanessa Hertig<sup>1</sup>, Natacha Duquette<sup>1</sup> and Angelino Calderone<sup>1,2</sup>

Keywords: Myocardial infarction, Diabetes, Nestin<sup>(+)</sup> cells, GAP43, Neurogenesis

---

\* Correspondence: [angelo.calderone@umontreal.ca](mailto:angelo.calderone@umontreal.ca)

<sup>1</sup>Montreal Heart Institute, Research Center, 5000 Belanger Street East,  
Montreal, QC H1T 1C8, Canada

<sup>2</sup>Département de Physiologie, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada



© 2013 Chabot et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 2.1 ABSTRACT

**Background:** Cardiac nestin<sup>(+)</sup> cells exhibit properties of a neural progenitor/stem cell population characterized by the *de novo* synthesis of neurofilament-M in response to ischemic injury and 6-hydroxydopamine administration. The induction of growth associated protein 43 (GAP43) was identified as an early event of neurogenesis. The present study tested the hypothesis that the *de novo* synthesis of neurofilament-M by nestin<sup>(+)</sup> cells was preceded by the transient upregulation of GAP43 during the acute phase of reparative fibrosis in the infarcted male rat heart. Secondly, a seminal feature of diabetes is impaired wound healing secondary to an inadequate neurogenic response. In this regard, an additional series of experiments tested the hypothesis that the neurogenic response of cardiac nestin<sup>(+)</sup> cells was attenuated in a setting of type I diabetes.

**Methods:** The neurogenic response of cardiac nestin<sup>(+)</sup> cells was examined during the early phase of reparative fibrosis following permanent ligation of the left anterior descending coronary artery in the adult male rat heart. The experimental model of type I diabetes was created following a single injection of streptozotocin in adult male rats. The impact of a type I diabetic environment on the neurogenic response of cardiac nestin<sup>(+)</sup> cells was examined during myocardial infarction and following the administration of 6-hydroxydopamine.

**Results:** During the early phase of scar formation/healing, the density of GAP43/nestin<sup>(+)</sup> fibres innervating the peri-infarct/infarct region was significantly increased, whereas neurofilament-M/nestin<sup>(+)</sup> fibres were absent. With ongoing scar formation/healing, a temporal decrease of GAP43/nestin<sup>(+)</sup> fibre density and a concomitant increase in the density of innervating neurofilament-M/nestin<sup>(+)</sup> fibres were observed. The neurogenic response of cardiac nestin<sup>(+)</sup> cells during scar formation/healing was inhibited following the superimposition of type I diabetes. The *de novo* synthesis of neurofilament-M by nestin<sup>(+)</sup> cells after 6-hydroxydopamine administration was likewise attenuated in the heart of type I diabetic rats whereas the density of GAP43/nestin<sup>(+)</sup> fibres remained elevated.

**Conclusion:** The transient upregulation of GAP43 apparently represents a transition event during the acquisition of a neuronal-like phenotype and a type I diabetic environment

attenuated the neurogenic response of cardiac nestin<sup>(+)</sup> cells to ischemia and 6-hydroxydopamine.

## 2.2 BACKGROUND

Sympathetic hyperinnervation of the viable myocardium and peri-infarct/infarct region represents a seminal feature of myocardial infarction [1-4]. Sympathetic fibres innervating the non-infarcted myocardium provide inotropic support to the ischemically damaged heart and contribute to the hypertrophic response [5,6]. During the reparative fibrotic response, innervating sympathetic fibres may directly contribute to scar formation/healing via the release of norepinephrine and subsequent stimulation of myofibroblast growth [7,8]. However, neural remodelling of the peri-infarct/infarct region was not limited to sympathetic fibre hyperinnervation as work from our lab reported the appearance of neuronal-like fibres originating from cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> cells [9,10]. The normal rodent heart contains a population of nestin<sup>(+)</sup> cells that exhibit properties of a neural progenitor/stem cell [11-15]. *In vitro* experiments revealed that a subpopulation of cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> cells differentiated to a neuronal phenotype when plated in the appropriate induction milieu characterized by the upregulation of neurofilament-M and beta III-tubulin [12]. The *in vitro* response was recapitulated *in vivo* as the *de novo* synthesis of neurofilament-M by a subpopulation of cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> cells was observed during the reparative fibrotic response of the ischemically damaged rat heart and after 6-hydroxydopamine administration [9,10,12]. The induction of growth associated protein 43 (GAP43) was identified as an early event of neurogenesis in development and learning and increased expression was reported during the regeneration of injured peripheral nerves [16-19]. *In vitro* studies further revealed that the transition of skin-derived cells from a proliferative precursor to a neuronal phenotype was associated with the downregulation of nestin and concomitant expression of GAP43 [13]. Despite these findings, the expression and temporal regulation of GAP43 during neural progenitor/stem cell transition to a neuronal phenotype in a setting of wound healing remains unexamined. Therefore, the present study tested the hypothesis that the *de novo* synthesis of

neurofilament-M by a subpopulation of cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> cells during the early phase of reparative fibrosis was preceded by the transient upregulation of GAP43.

It has been well established that diabetic patients have a higher mortality rate following acute myocardial infarction as compared to non-diabetic patients [20,21]. The latter paradigm was recapitulated experimentally as Luo and colleagues reported that the superimposition of myocardial infarction on type I diabetic mice led to 70-80% mortality 3–4 days following complete coronary artery ligation and was 2-fold higher than non-diabetic myocardial infarcted mice [22]. A pathological feature of diabetes that may contribute to the reported increase in mortality is impaired wound healing secondary to an inadequate neurogenic response [23-26]. The inadequate neurogenic response reported in diabetic injured tissue may be related in part to the suppression of neural/progenitor stem cell differentiation to a neuronal phenotype. In this regard, a second series of experiments tested the hypothesis that the transition of cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> cells to a neuronal-like phenotype in the ischemically damaged rat heart and after 6-hydroxydopamine administration was suppressed in a type 1 diabetic environment.

## **2.3 METHODS**

### **Myocardial infarction and type I diabetes**

Myocardial infarction (MI) in adult male Sprague Dawley rats (9–11 weeks old; Charles Rivers, Canada) was created by permanently ligating the left anterior descending coronary artery [10]. Rats have been sacrificed at 1 day, 4 days and 1 week following MI surgical procedure to study innervation of the scar by Nestin, GAP43 and Neurofilament-M fibres. Sham animals underwent the identical surgical procedure except the coronary artery was not ligated. Experimental model of type I diabetes was induced following a single intraperitoneal injection of streptozotocin (60 mg/kg) in adult male Sprague Dawley rats (9–11 weeks old; Charles Rivers, Canada) [27]. In a first study, adult rats were injected with streptozotocin and 1 week later subjected to permanent coronary artery ligation. This study was halted because of the high mortality rate of diabetic rats following surgery (please see



Results section). An alternative approach was employed as a proof of concept and 3-day post-MI rats were injected with streptozotocin and sacrificed 7 days later. In this study, all diabetic post-MI rats survived the protocol. In parallel, post-MI rats were sacrificed 10 days after surgery. Lastly, seven days after the injection of adult male Sprague Dawley with streptozotocin, type I diabetic rats ( $n = 5$ ) were administered 6-hydroxydopamine hydrobromide (Sigma-Aldrich; IV injection of 100 mg/kg/day for 3 days) and sacrificed 2 days after completion of treatment [9,12]. In parallel, sham rats ( $n = 4$ ) were administered 6-hydroxydopamine as described above and sacrificed 2 days after last injection. Plasma glucose levels were measured with a glucometer (Bayer; Model Ascensia Elite XL) from blood samples obtained from the tail vein. Left ventricular function was measured with a microtip pressure transducer catheter (model SPR-407, 2 F, Millar instrument, Houston Texas) and data analyzed with the program IOX version 1.8.9 (Emka Technologies; Falls Church, VA) [9]. At the end of each experiment, the heart was removed, weighed and stored in 2-methylbutane for immunofluorescence or separated into the left ventricle, right ventricle and scar, weighed, stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  and subsequently used for protein analysis. To determine scar area, the infarct region was traced, the outlined region visualized with the Olympus SZX7 microscope (Tokyo, Japan) and the area measured with data acquisition program Stream Basic (Olympus). The use and care of laboratory rats was according to the Canadian Council for Animal Care and approved by the Animal Care Committee of the Montreal Heart Institute.

### **Western blot**

Protein lysates prepared from the left ventricle of normal and diabetic rats and non-infarcted left ventricle and scar of non-diabetic and diabetic infarcted rats were subjected to SDS-electrophoresis, as previously described [27]. Antibodies used include the mouse monoclonal anti-nestin (1:500; Chemicon, Temicula, CA), the rabbit polyclonal GAP43 (1:500; Abcam, Cambridge, MA) and the mouse monoclonal anti-GAPDH (1:50,000; Ambion, Austin TX). Following overnight incubation at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , the appropriate secondary antibody-conjugated to horseradish peroxidase (1:20,000, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) was added and bands visualized utilizing the ECL detection kit (Perkin Elmer).

Films were scanned with Image J software® and the target protein signal was depicted as arbitrary light units normalized to GAPDH protein content.

### **Immunofluorescence**

The heart was excised, immersed directly in 2-methylbutane (temperature maintained at  $-80^{\circ}\text{C}$ ), and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Immunofluorescence on cardiac tissue (cryostat sections of  $14\ \mu\text{m}$  thickness) was performed as previously described [9,27]. Antibodies employed include the mouse monoclonal anti-nestin (1:500; Chemicon), rabbit polyclonal anti-GAP43 (1:150; Abcam) and rabbit polyclonal anti-neurofilament-M (1:500; Chemicon). The nucleus was identified with TO-PRO-3 (InVitrogen;  $1.5\ \mu\text{M}$ ; emission wavelength,  $661\ \text{nm}$ ) staining. Secondary antibodies used were a goat anti-mouse IgG conjugated to conjugated to Alexa-546 (1:600; InVitrogen; emission wavelength,  $570\ \text{nm}$ ) and a goat anti-rabbit IgG conjugated to Alexa-488 (1:800; InVitrogen; emission wavelength,  $520\ \text{nm}$ ). In post-MI and diabetic post-MI rats, neurofilament-M/nestin and GAP43/nestin fibre densities ( $\mu\text{m}^2$ ; area occupied by the fluorescent signal; LSM image Browser) were assessed in the peri-infarct and infarct regions. The fluorescent signal ( $\mu\text{m}^2$ ) was normalized to the peri-infarct/infarct area ( $\text{mm}^2$ ) and calculated as the average of at least 4 distinct fields. We have published several papers employing the latter approach to assess neurofilament-M and nestin fibre density in the adult rat heart [9,12]. Neurofilament-M/nestin and GAP43/nestin fibre densities in sham and diabetic rats treated with 6-hydroxydopamine were measured exclusively in the left ventricle whereas fibres residing at the epicardium were not considered. Non-specific staining was determined following the addition of an isotype control antibody or the conjugated secondary antibody alone. Immunofluorescence was visualized with a  $10\times$ - or  $63\times$ -oil 1.4 NA DIC.

### **Statistics**

Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M, and ( $n$ ) represents the number of rats used per experiment. Cardiac morphology, contractile function, immunofluorescence, plasma glucose and protein data were evaluated by a one-way ANOVA (GraphPad InStat) and a significant difference determined by the Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons post-hoc test.

Scar weight and surface area were evaluated by a student's unpaired t-test and a value of  $P < 0.05$  considered statistically significant.

## 2.4 RESULTS

### **Neurofilament-M and GAP43 immunoreactivity of nestin<sup>(+)</sup> fibres innervating the scar of infarcted rat hearts**

The normal adult Sprague Dawley rat heart contains nestin<sup>(+)</sup> cells intercalated among ventricular myocytes and neurofilament-M immunoreactive fibres innervating the myocardium (Figure 1A & B). The co-expression of the intermediate filament proteins neurofilament-M and nestin was not observed in the normal adult rat heart. Twenty-four hours following permanent coronary artery ligation of the adult heart, the ischemic region was apparent and innervated by nestin<sup>(+)</sup> fibres. However, the co-expression of neurofilament-M in nestin<sup>(+)</sup> fibres innervating the ischemic region of 1-day post-MI rats was not detected. By contrast, in the peri-infarct/infarct region of 4 day post-MI rat hearts, innervating nestin<sup>(+)</sup> fibres co-expressing neurofilament-M were observed and neurofilament-M/nestin<sup>(+)</sup> fibres persisted in the ischemic region of 7-day post-MI rat hearts (Figure 1C, D & E). GAP43-immunoreactive fibres were detected in the sham heart and a paucity of fibres co-expressed the intermediate filament protein nestin (Figure 1F & G). Twenty-four hours following complete coronary artery ligation of the adult rat heart, innervating GAP43- and nestin co-expressing immunoreactive fibres were observed (Figure 1H, I & J) and persisted in the peri-infarct/infarct region of 4 day post-MI rats. In the peri-infarct/infarct region of 7 day post-MI rat hearts, the appearance of GAP43/nestin<sup>(+)</sup> fibres was markedly reduced. A quantitative analysis revealed that a population of neurofilament-M/nestin<sup>(+)</sup> fibres were detected innervating the peri-infarct/infarct region of 4-day post-MI rats and a further significant increase in density was observed in 7-day post-MI rats (Figure 1K). By contrast, the density GAP43/nestin<sup>(+)</sup> fibres innervating the peri-infarct/infarct region was increased in 1-day post-MI rats and remained significantly elevated in 4-day post-MI rats (Figure 1K) as compared to sham rats. In 7-day post-MI rats, the density of GAP43/nestin<sup>(+)</sup> fibres innervating the peri-infarct/infarct region rats had returned to levels observed in the sham heart (Figure 1K).

Figure 1

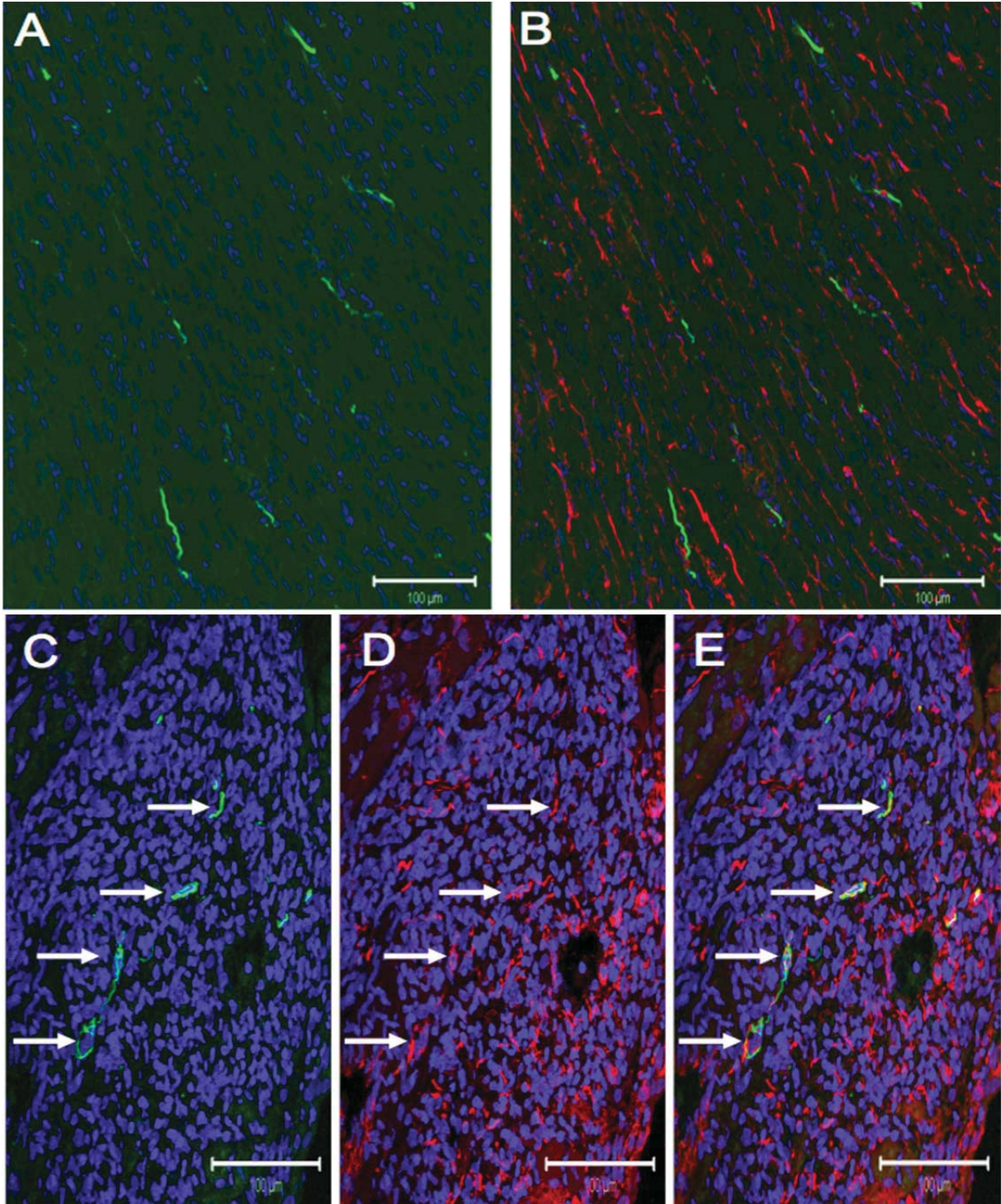
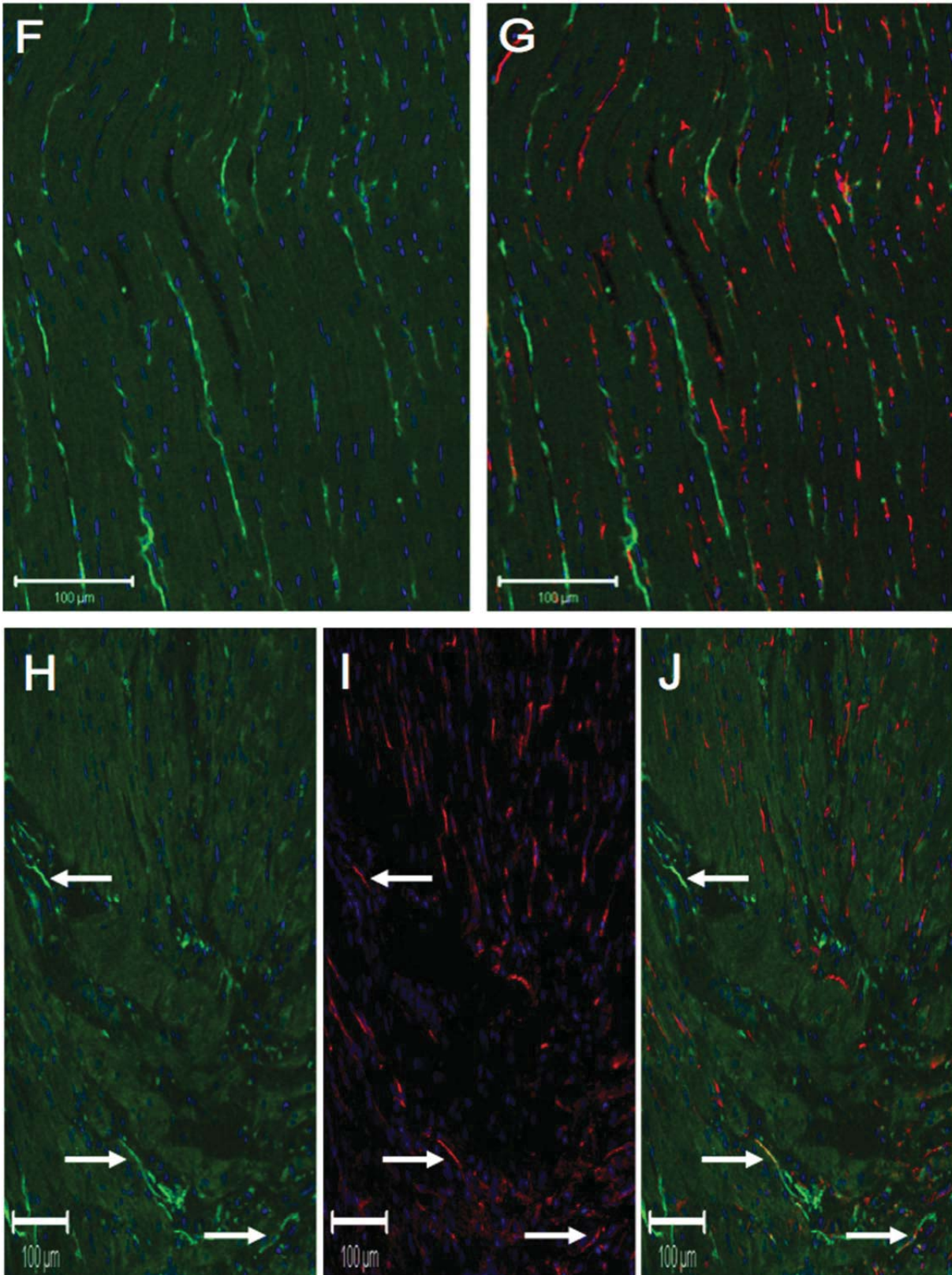
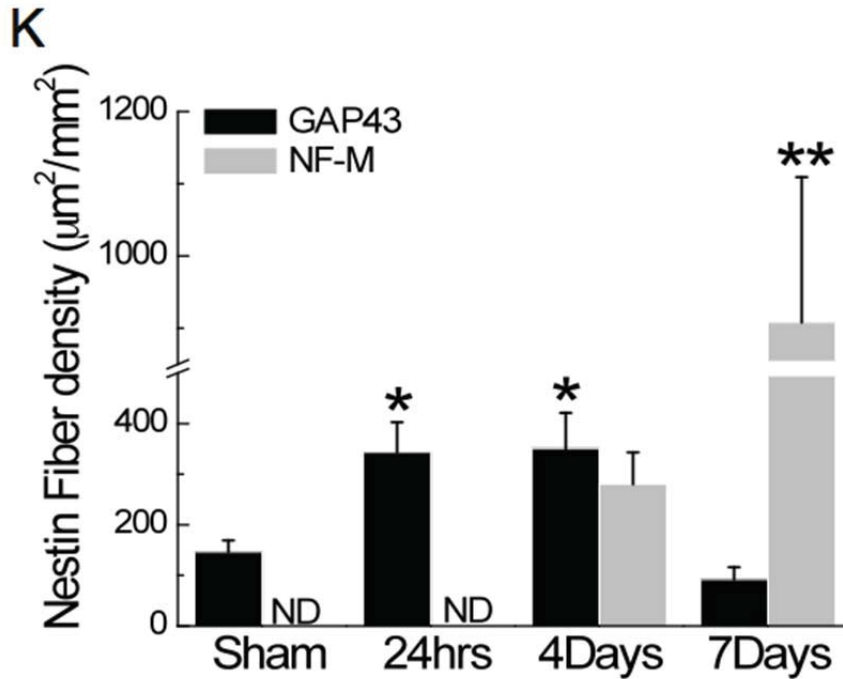




Figure 1 (Suite)





**Figure 1: Neurofilament-M and GAP43 expression by nestin<sup>(+)</sup> cells in the heart of sham and 1 week post-MI rat hearts**

(Panels A & B) In the left ventricle of sham rats, neurofilament-M<sup>(+)</sup> (green fluorescence) and nestin<sup>(+)</sup> (red fluorescence) fibres were detected and co-expression of the intermediate filament proteins was not observed. (Panels C, D & E) In the peri-infarct/infarct region of a 4-day post-MI rat heart, innervating neurofilament-M<sup>(+)</sup> fibres were detected and the preponderance physically associated with nestin<sup>(+)</sup> fibres (indicated by arrow). Neurofilament-M<sup>(+)</sup> fibres lacking nestin co-expression were also identified (indicated by arrowhead). (Panels F & G) GAP43<sup>(+)</sup> (green fluorescence) and nestin<sup>(+)</sup> (red fluorescence) fibres were detected in the normal rat heart and a paucity co-expressed both proteins. (Panels H, I & J) GAP43/nestin<sup>(+)</sup> co-expressing fibres (indicated by arrow) were detected innervating the peri-infarct/infarct region 24 hrs after complete coronary artery ligation. The nucleus was identified with TO-PRO-3 staining (blue fluorescence). (Panel K) The density of GAP43/nestin<sup>(+)</sup> fibres innervating the peri-infarct/infarct region was increased 24 hrs after myocardial infarction and preceded the appearance of neurofilament-M in nestin<sup>(+)</sup> cells. With ongoing scar formation/healing, the density of GAP43/nestin<sup>(+)</sup> fibres progressively decreased whereas a concomitant increase in neurofilament-M/nestin<sup>(+)</sup> fibre density was apparent 4 and 7 days after myocardial infarction. (\*) denotes  $P < 0.05$  versus sham, (\*\*)  $P < 0.05$  versus 4 day infarcted rat hearts and (ND) not detected.



## **The impact of type I diabetes on neural remodelling of the scar in post-myocardial infarcted rats**

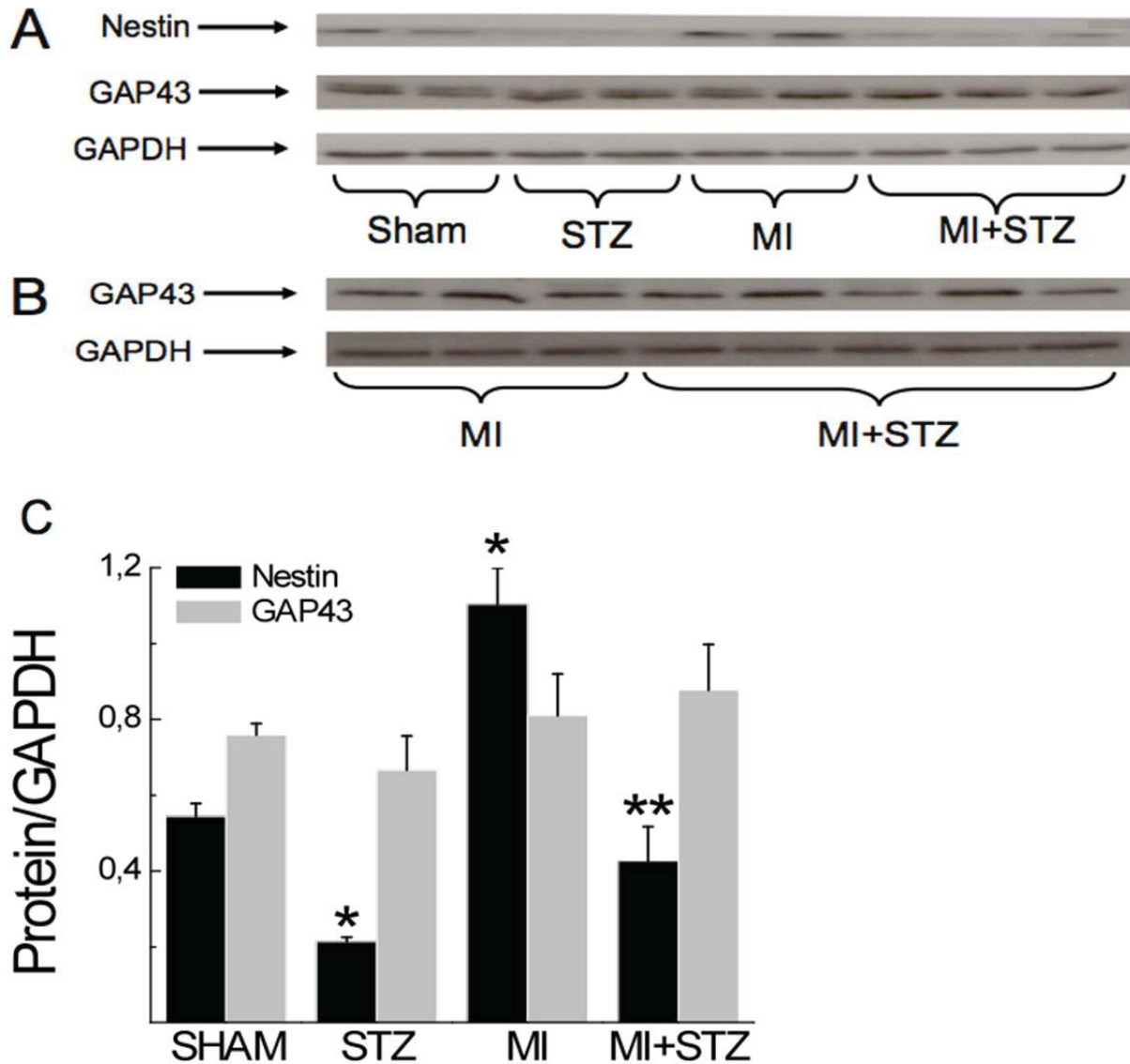
Experimental type 1 diabetes was induced in adult male Sprague Dawley rats following a single injection of streptozotocin (STZ; 60 mg/kg). One week later, the heart of type I diabetic rats ( $n = 23$ ) underwent permanent coronary artery ligation. Within 24–48 hrs of coronary artery ligation, 70% (16/23 rats) of type I diabetic rats died. One week after surgery, 22% (5/23) of the surviving type I diabetic rats that underwent surgery did not have an infarct. Only 8% (2/23 rats) of type I diabetic rats that underwent permanent coronary artery ligation had an identifiable scar. No deaths were observed in sham rats injected with streptozotocin suggesting that the high mortality rate observed after coronary artery ligation was directly attributed to myocardial infarction. Unfortunately, the high mortality rate of type I diabetic rats after permanent coronary artery ligation precluded further continuation of experimental protocol. Therefore, as a proof of concept, type I diabetes was induced in 3-day post-MI rats. The 3-day post-MI time point was chosen as the appearance of neurofilament-M/nestin<sup>(+)</sup> fibres was at an incipient stage during the acute phase of scar formation/healing (Figure 1K). In the MI group, 25% (6/24 rats) died within 24-48 hrs after coronary artery ligation. Interestingly, no deaths were observed 7 days after streptozotocin injection of 3-day post-MI rats despite the induction of a comparable hyperglycaemic environment as observed in diabetic rats that underwent coronary artery ligation. Left ventricular contractile function was significantly depressed in post-MI rats and diabetic rats as compared to sham rats (Table 1). Seven days following streptozotocin injection of 3-day post-MI rats, mean arterial pressure and left ventricular contractile indices were further decreased as compared to post-MI rats (Table 1). Despite the superimposition of type I diabetes to 3-day post-MI rats, scar weight and surface area were not significantly different as compared to post-MI rats (Table 1).

**Table 1 : Body weight, heart weight and hemodynamic parameters of sham, streptozotocin-treated (STZ), myocardial infarcted (MI) and streptozotocin-treated myocardial infarcted (MI + STZ) rats**

	Body weight (grams)	Heart weight (grams)	MAP (mmHg)	LVSP (mmHg)	LV + dP/dt (mmHg/sec)	LV - dP/dt (mmHg/sec)	Scar weight (grams)	Scar area (cm <sup>2</sup> )	Plasma glucose (mM)
sham (n=8)	350 ± 19	1.13 ± 0.05	126 ± 4	147 ± 5	6859 ± 2241	5832 ± 258	-	-	7 ± 1
STZ (n=7)	315 ± 6	1.08 ± 0.06	88 ± 3*	112 ± 5*	6106 ± 322*	4144 ± 323*	-	-	33 ± 1*
MI (n=7-8)	335 ± 8	1.14 ± 0.08	108 ± 3*	134 ± 5	5762 ± 172*	4392 ± 280*	0.055 ± 0.008	0.678 ± 0.11	8 ± 2
MI + STZ (n=8-12)	266 ± 8***	0.932 ± 0.05***	81 ± 3**	97 ± 2***	4658 ± 115***	2935 ± 103***	0.058 ± 0.004	0.754 ± 0.06	29 ± 1*

MI indicates myocardial infarction; MAP, mean arterial pressure; LVSP, left ventricular systolic pressure; LV + dP/dt, rate of left ventricular contraction; LV - dP/dt rate of left ventricular relaxation. Data are presented as mean ± S.E.M, evaluated by a Student's unpaired t-test or a Newman-Keuls Multiple Comparisons post-hoc test, (\*) represents  $P < 0.05$  versus sham, (\*\*\*) represents  $P < 0.05$  versus sham and MI, (\*\*\*) versus sham, MI and STZ and (n) number of rats examined.

In the non-infarcted left ventricle of post-MI rats, nestin protein expression was significantly increased as compared to sham rats (Figure 2A & C). In the left ventricle of diabetic rats, nestin protein levels were markedly reduced as compared to sham rats (Figure 2A & C). In the non-infarcted left ventricle of diabetic post-MI rats, nestin protein levels were modestly increased as compared to diabetic rats but did not reach statistical significance. However, nestin protein levels in the non-infarcted left ventricle of diabetic post-MI rats remained significantly lower compared to post-MI rats (Figure 2A & C). Nestin protein content (normalized to GAPDH) was also reduced in the infarct region of diabetic post-MI rats ( $0.47 \pm 0.11$ ;  $n = 8$ ;  $P < 0.05$  versus post-MI rats) as compared to post-MI rats ( $0.83 \pm 0.10$ ;  $n = 6$ ). By contrast, GAP43 protein levels in the heart of sham, diabetic, post-MI and diabetic post-MI rats were comparable (Figure 2A & C). Likewise, GAP43 protein expression in the scar of diabetic post-MI rats was similar to post-MI rats (Figure 2B).

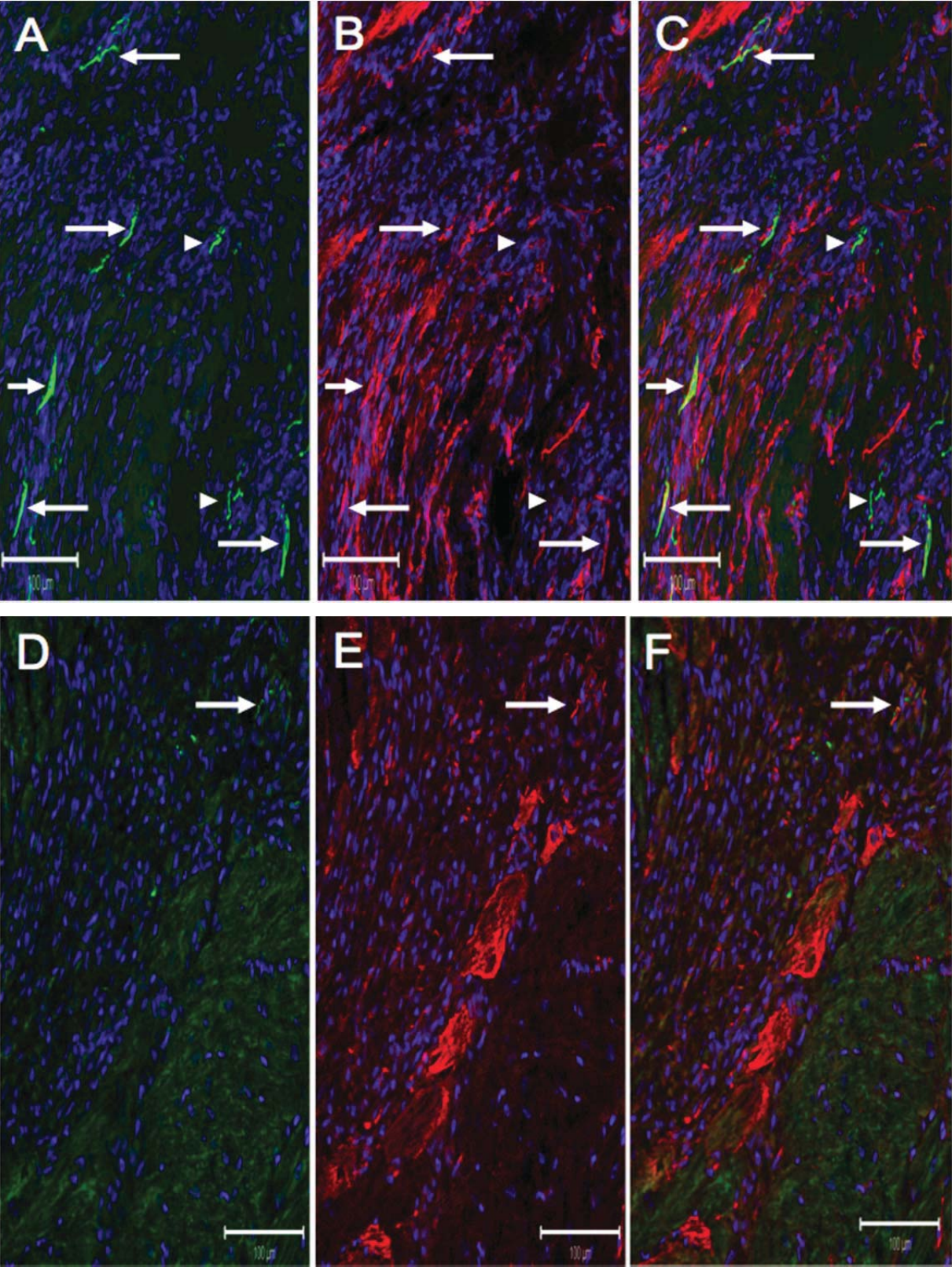


**Figure 2 : Nestin and GAP43 protein expression in non-diabetic and diabetic infarcted rat hearts**

(Panel A) Nestin expression was increased in the non-infarcted left ventricle of myocardial infarcted (MI) rats. In streptozotocin (STZ) induced diabetic rats, nestin protein expression was diminished as compared to sham rats. Ventricular nestin protein levels remained reduced following the superimposition of type I diabetes on 3-day post-MI rats (MI + STZ) as compared to post-MI rats. Ventricular GAP43 protein levels were comparable in sham, diabetic, post-MI and diabetic post-MI rats. (Panel B) GAP43 expression was similar in the scar of myocardial infarcted (MI) and diabetic post-MI rats (MI + STZ). (Panel C) Semi-quantitative assessment of nestin and GAP43 expression in the left ventricle of sham (n = 4-5) and diabetic rats (STZ; n = 4) and the non-infarcted left ventricle of post-MI (MI; n = 4) and diabetic post-MI rats (MI + STZ; n = 6). Data was normalized to GAPDH protein expression, (\*) denotes  $P < 0.05$  versus sham and (\*\*)  $P < 0.05$  versus MI.



Figure 3



### **Figure 3 : The impact of type I diabetes on the neurogenic response of cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> cells during scar formation/healing of the myocardial infarcted rat heart**

(Panels A, B & C) Neurofilament-M<sup>(+)</sup> (green fluorescence) and nestin<sup>(+)</sup> (red fluorescence) fibres were detected innervating the peri-infarct/infarct region of a post-MI rat heart and co-expression was evident by the emergence of a yellow fluorescence (indicated by arrow). Neurofilament-M<sup>(+)</sup> fibres lacking nestin co-expression were also identified (indicated by arrowhead). (Panels D, E & F) The reparative fibrotic response of diabetic post-MI rats was associated with a paucity of innervating neurofilament-M/nestin<sup>(+)</sup> fibres (indicated by arrow) in the peri-infarct/infarct region. Nestin<sup>(+)</sup> cardiac myocyte-like cells were detected bordering the scar region and residual nestin<sup>(+)</sup> cells and fibres were identified in the peri-infarct/infarct region.

In the heart of 10-day post-MI rats, the reparative fibrotic response was associated with neurofilament-M<sup>(+)</sup> fibres ( $754 \pm 126 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ ;  $n = 3$ ) innervating the peri-infarct/infarct region and the majority co-expressed nestin ( $608 \pm 79 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ ;  $n = 3$ ) (Figure 3A, 3B & 3C). In the heart of diabetic post-MI rats (Figure 3D, E & F), the density of neurofilament-M<sup>(+)</sup> ( $244 \pm 96 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ ;  $n = 3$ ;  $P < 0.05$  versus MI rats) and neurofilament-M/nestin<sup>(+)</sup> fibres ( $71 \pm 34 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ ;  $n = 3$ ;  $P < 0.01$  versus MI rats) innervating the peri-infarct/infarct region were significantly reduced as compared to post-MI rats. The residual expression of the intermediate filament protein in the infarct region of diabetic post-MI rats was attributed at least in part to the continued appearance of nestin<sup>(+)</sup> cells with distinct processes and nestin<sup>(+)</sup> cardiomyocyte-like cells (Figure 3E).

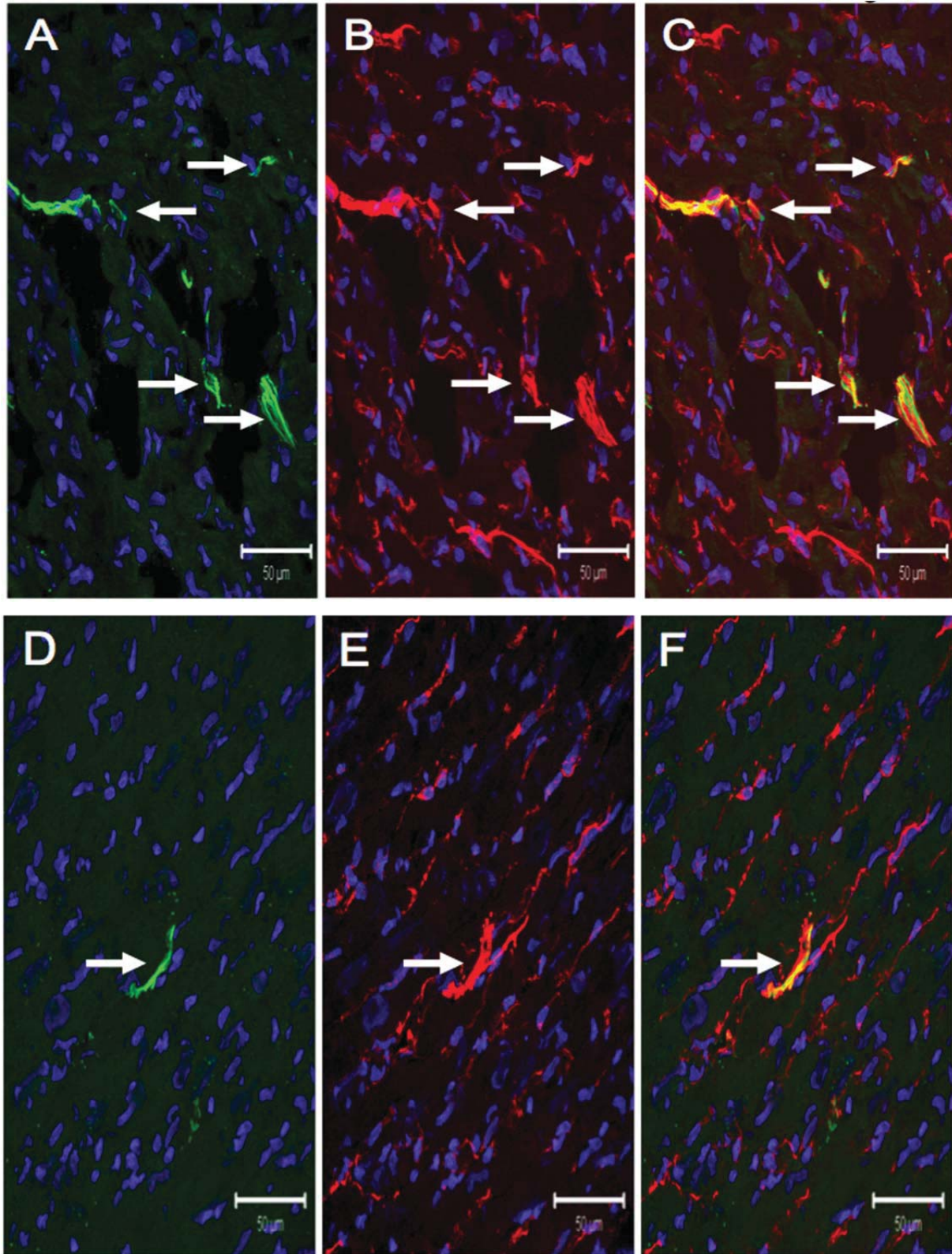
### **The impact of type I diabetes on neural remodelling of the heart following 6-hydroxydopamine administration**

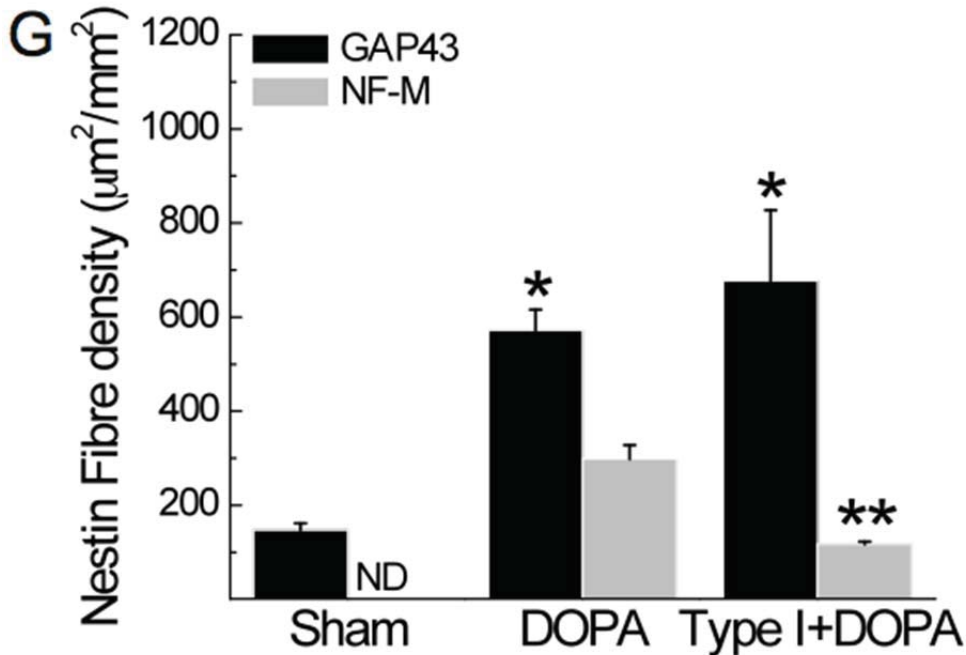
The present study has demonstrated that the superimposition of type I diabetes on MI rats attenuated the neurogenic response of nestin<sup>(+)</sup> cells during reparative fibrosis. To complement and further support these data, additional experiments were performed to test the hypothesis that a prevailing type I diabetic environment would likewise suppress the differentiation of cardiac nestin<sup>(+)</sup> cells to a neuronal-like phenotype in response to a neurogenic stimulus. Work from our lab has previously demonstrated that 6-hydroxydopamine administration to normal adult rats promoted the *de novo* synthesis of neurofilament-M by cardiac nestin<sup>(+)</sup> cells [9,12]. In this regard, 6-hydroxydopamine was administered to

streptozotocin-injected rats with established hyperglycaemia. Type I diabetic rats were injected daily for a period of 3 days with 6-hydroxydopamine and sacrificed 2 days later. In 6-hydroxydopamine-treated rats ( $n = 4$ ; plasma glucose =  $7.9 \pm 0.1$  mM), GAP43/nestin<sup>(+)</sup> and neurofilament-M/nestin<sup>(+)</sup> fibres (Figure 4A, B & C) were detected innervating the left ventricle. Following 6-hydroxydopamine administration of type I diabetic rats ( $n = 5$ ; plasma glucose =  $26 \pm 3.9$  mM), GAP43/nestin<sup>(+)</sup> fibres innervating the left ventricle persisted whereas neurofilament-M/nestin<sup>(+)</sup> fibres (Figure 4D, E & F) were less apparent. A quantitative analysis revealed that the density of GAP43/nestin<sup>(+)</sup> fibres in the heart of 6-hydroxydopamine-treated rats was increased as compared to sham rats and remained significantly elevated following 6-hydroxydopamine administration of type I diabetic rats (Figure 4G). The density of neurofilament-M/nestin<sup>(+)</sup> fibres in the heart of 6-hydroxydopamine-treated rats was also significantly increased as compared to sham rats (Figure 4G). By contrast, a significant reduction in the density of neurofilament-M/nestin<sup>(+)</sup> fibres innervating the myocardium was observed in 6-hydroxydopamine-treated type I diabetic rats as compared to 6-hydroxydopamine-treated rats (Figure 4G).



Figure 4





**Figure 4 : The impact of type I diabetes on the neurogenic response of cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> cells following administration of 6-hydroxydopamine**

(Panels A, B & C) Sham rats treated with 6-hydroxydopamine promoted the *de novo* synthesis of neurofilament-M (green fluorescence) by cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> (red fluorescence) cells and the intermediate filament proteins were physically associated as reflected by the emergence of a yellow fluorescence (indicated by arrow). (Panels D, E, & F) In type I diabetic rats, the *de novo* synthesis of neurofilament-M (green fluorescence) by cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> cells (red fluorescence) was attenuated in response to 6-hydroxydopamine. The nucleus was identified with TO-PRO-3 staining (blue fluorescence). (Panel G) The administration of 6-hydroxydopamine (DOPA) significantly increased the density of GAP43/nestin<sup>(+)</sup> and neurofilament-M/nestin<sup>(+)</sup> fibres in the heart of sham rats. In the left ventricle of type 1 diabetic rats treated with 6-hydroxydopamine (Type I + DOPA), the density of GAP43/nestin<sup>(+)</sup> fibres remained elevated as compared to sham rats treated with 6-hydroxydopamine. By contrast, the *de novo* synthesis of neurofilament-M was partially inhibited as reflected by the significant reduction of neurofilament-M/nestin<sup>(+)</sup> fibre density in the heart of type I diabetic rats treated with 6-hydroxydopamine. (\*) denotes  $P < 0.05$  versus normal, (\*\*)  $P < 0.05$  versus 6-hydroxydopamine-treated normal rats (DOPA) and (ND) not detected.

## 2.5 DISCUSSION

The rodent heart contains resident nestin<sup>(+)</sup> cells that exhibit properties of a neural progenitor/stem cell population [9,11-15]. Consistent with this premise, the plating of cardiac-derived nestin<sup>(+)</sup> cells in a defined induction milieu revealed that a subpopulation differentiated to a neuronal phenotype characterized by the loss of nestin expression and concomitant upregulation of neurofilament-M and beta III-tubulin [12]. The *in vitro* findings were reproduced *in vivo* as the *de novo* synthesis of neurofilament-M by a subpopulation of cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> cells and subsequent physical association of the intermediate filament proteins represents a seminal event of reparative fibrosis following ischemic injury of the adult rat heart [9,12].

### **Transient upregulation of GAP43 by cardiac nestin<sup>(+)</sup> cells during reparative fibrosis**

Previous studies have identified growth associated protein 43 (GAP43) as an early and important mediator of neurogenesis in development and learning and increased expression was reported during the regeneration of injured peripheral nerves [16-19]. *In vitro* studies have further revealed that skin-derived cells downregulate nestin and concomitantly express GAP43 during a transition from a proliferative precursor to a neuronal phenotype [13]. Despite these findings, the expression and temporal pattern of GAP43 regulation during the transition of a neural progenitor/stem cell population to a neuronal phenotype during wound healing remains unexamined. Therefore, the present study tested the hypothesis that the *de novo* synthesis of neurofilament-M by a subpopulation of cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> cells during the early phase of reparative fibrosis was preceded by the transient upregulation of GAP43. In the normal adult rat heart, a paucity of GAP43<sup>(+)</sup> fibres innervating the left ventricle co-expressed the intermediate filament protein nestin. Twenty-four hours after complete coronary artery ligation, GAP43/nestin<sup>(+)</sup> fibres were detected innervating the peri-infarct/infarct region of the ischemically damaged rat heart, remained elevated in 4 days post-MI rats and gradually returned to levels observed in sham rats 7 days after myocardial infarction. By contrast, the co-expression of nestin and neurofilament-M was not detected in the peri-infarct/infarct region of 1-day post-MI rats. However, with ongoing scar formation/healing, the temporal decrease

of GAP43/nestin<sup>(+)</sup> fibre density was associated with a concomitant increase in the density of innervating neurofilament-M/nestin<sup>(+)</sup> fibres. Collectively, these data have demonstrated that GAP43 was upregulated in cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> cells prior to the *de novo* synthesis of neurofilament-M during wound healing of the ischemically damaged rat heart. The transient induction of GAP43 during the reparative fibrotic response apparently represents an intermediate event implicated in the transition of a subpopulation of cardiac nestin<sup>(+)</sup> cells to a neuronal-like phenotype.

### **High mortality rate of type I diabetic rats was observed following myocardial infarction**

Numerous studies have identified a proliferative role of the intermediate filament protein nestin in various cell types including neural/progenitor stem cells [11]. An additional biological function was identified during axonal sprouting in skeletal muscle. Following muscle injury or in response to a constitutively active neuregulin receptor, newly formed nestin<sup>(+)</sup> fibres were expressed by Schwann cells located at the motor endplate and physically associated with axonal sprouts growing from the nerve terminal [28,29]. The authors suggested that the emergence of nestin<sup>(+)</sup> fibres from Schwann cells may directly support the growth of nerve sprouts possibly acting as a scaffold and/or guidance mechanism. As previously reported and documented in the present study, the reparative fibrotic response of the ischemically damaged rat heart was associated with the *de novo* synthesis of neurofilament-M by a subpopulation of cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> cells. Thereafter, newly formed neurofilament-M was physically associated with nestin<sup>(+)</sup> fibres and innervated the peri-infarct/infarct region. Thus, it is tempting to speculate that the suppression of nestin could significantly compromise the neurogenic response of Schwann cells and/or neural progenitor/stem cells during tissue repair. Impaired wound healing represents an established pathophysiological feature of diabetes related in part to an inadequate neurogenic response [23-26]. In the heart of experimental rat models of type I and II diabetes, nestin protein levels were significantly reduced and not attributed to cellular apoptosis [27]. These data suggested that the downregulation of the intermediate filament protein in a setting of diabetes may significantly limited the neurogenic response of a subpopulation of cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> cells during reparative fibrosis. To directly examine the premise, streptozotocin-induced type I



diabetic rats were subjected to complete coronary artery occlusion. In this initial study, a high mortality rate (70%) was observed 24–48 hrs following permanent coronary artery ligation of the heart of type 1 diabetic rats. An identical observation was reported by Luo and colleagues as permanent coronary artery ligation of the heart of type 1 diabetic mice led to a 2-fold greater increase in mortality within 3–4 days of surgery as compared to non-diabetic post-MI mice [22]. In our study, no deaths were reported in type I diabetic rats supporting that premise that the superimposition of myocardial infarction was directly responsible for the high mortality rate. These data and those reported by Luo and colleagues were consistent with clinical studies indicating that diabetic patients have a higher mortality rate following acute myocardial infarction and an increased risk of progression to heart failure post-infarction as compared to non-diabetic post-MI patients [20,21].

### **The superimposition of type I diabetes on myocardial infarcted rats attenuated the neurogenic response of cardiac nestin<sup>(+)</sup> cells**

The high mortality rate of type I diabetic rats subjected to permanent coronary artery ligation precluded further continuation of the experimental model. Nonetheless, the experimental protocol was adapted and as a proof of concept, streptozotocin was injected in 3 day post-MI rats and sacrificed 7 days later. In contrast to that observed following the superimposition of myocardial infarction on type I diabetic rats, streptozotocin injection of 3 day post-MI rats did not lead to any deaths. As expected, the imposition of type I diabetes on post-MI rats exacerbated left ventricular dysfunction as compared to post-MI rats. In type I diabetic post-MI rats, nestin protein levels of the non-infarcted left ventricle and scar were significantly reduced as compared to post-MI rats. In post-MI rats, neurofilament-M<sup>(+)</sup> fibres were detected innervating the peri-infarct/infarct region and the preponderance physically associated with nestin<sup>(+)</sup> fibres. In the peri-infarct/infarct region of type I diabetic post-MI rat hearts, neurofilament-M<sup>(+)</sup> and neurofilament-M/nestin<sup>(+)</sup> fibre densities were significantly reduced. The inadequate neurogenic response in the scar of type I diabetic post-MI rats was apparently not secondary to a downregulation of GAP43 protein levels. Thus, the reduced neurogenic response in the scar of diabetic post-MI rats was attributed in part to the inadequate *de novo* synthesis of neurofilament-M by a subpopulation of cardiac resident

nestin<sup>(+)</sup> cells. Downregulation of the intermediate filament protein nestin may represent in part an underlying mechanism suppressing the transition of cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> cells to a neuronal-like phenotype. Moreover, we cannot exclude the possibility that the prevailing hyperglycaemic environment may have further inhibited the synthesis of neurofilament-M by cardiac nestin<sup>(+)</sup> cells.

### **The induction of a type I diabetic environment rather than a direct effect of streptozotocin attenuated the neurogenic response of post-MI rats**

The uptake of streptozotocin in pancreatic beta cells is attributed to the presence of the GLUT2 transporter [30]. Following entry and accumulation in beta cells, the alkylating action of streptozotocin leads to toxicity, cell death and subsequent loss of insulin synthesis [30]. By contrast, insulin-producing cells that do not express GLUT2 are resistant to the direct pathological action of streptozotocin [30]. Moreover, organ damage reported in the kidney and liver following streptozotocin administration was likewise attributed to the uptake of the drug by the GLUT2 transporter [30]. Based on these data, the attenuated neurogenic response of cardiac nestin<sup>(+)</sup> cells during reparative fibrosis following the superimposition of type I diabetes may have been related in part to a direct effect of streptozotocin. However, the GLUT2 transporter was not expressed in adult rat brain-derived neural stem cells whereas GLUT1 and GLUT3 were highly abundant and the GLUT2 transcript was undetectable in the adult rodent heart [31,32]. The tissue specific distribution of GLUT2 was consistent with the disparate level of radioactive-labeled streptozotocin detected in the liver and heart following intravenous injection of the adult male rat [33]. In addition, streptozotocin is a highly unstable molecule with a reported biological half-life of ~5 minutes and ~40 minutes in rodents and humans, respectively [34,35]. Therefore, based on the short half-life of streptozotocin and apparent absence of GLUT2 transporter expression in the rodent heart as well as neural progenitor/stem cells, it is highly unlikely that the compromised neurogenic response of cardiac nestin<sup>(+)</sup> cells during reparative fibrosis was related to a direct effect of streptozotocin that persisted for 7 days.



## **A type I diabetic environment attenuated the neurogenic response of cardiac nestin<sup>(+)</sup> cells following 6-hydroxydopamine administration**

To reaffirm that a hyperglycaemic environment rather than a direct effect of streptozotocin suppressed the neurogenic response of cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> cells, 6-hydroxydopamine was administered to rats with established type I diabetes. Work from our lab has previously demonstrated that the treatment of normal adult male rats with 6-hydroxydopamine led to the degeneration of sympathetic fibres and concomitantly induced the *de novo* synthesis of neurofilament-M by a subpopulation of cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> cells [9,12]. Therefore, the following experiments tested the hypothesis that the neurogenic response of nestin<sup>(+)</sup> cells to 6-hydroxydopamine was compromised in the heart of type I diabetic rats. In the left ventricle of 6-hydroxydopamine-treated rats, the density of GAP43/nestin<sup>(+)</sup> and neurofilament-M/nestin<sup>(+)</sup> fibres were significantly increased as compared to non-treated rats. Seven days following streptozotocin injection, 6-hydroxydopamine was administered to type I diabetic rats and the density of GAP43/nestin<sup>(+)</sup> fibres in the left ventricle remained significantly elevated and quantitatively similar to the response observed in 6-hydroxydopamine treated rats. By contrast, the density of neurofilament-M/nestin<sup>(+)</sup> fibres in the left ventricle of 6-hydroxydopamine-treated diabetic rats was significantly reduced. Thus, in response to 6-hydroxydopamine, a type I diabetic environment abrogated the transition of cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> cells to a neuronal-like phenotype via the selective suppression of neurofilament-M synthesis. These data complement the paradigm identified in the heart of 3-day post-MI rats subjected to type I diabetes and further supports the premise that a diabetic milieu rather than a direct effect of streptozotocin compromised the neurogenic response of a subpopulation of cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> cells.

## **2.6 CONCLUSION**

The temporal disparity of GAP43 and neurofilament-M expression by cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> cells during scar formation/healing of the ischemically damaged rat heart suggests that the prior induction of GAP43 may represent an essential intermediate event in the transition to a neuronal-like phenotype. Inadequate wound healing represents a hallmark feature of diabetes related in part to an impaired neurogenic response. The present study has reaffirmed and further expanded on the latter paradigm as the superimposition or the pre-existence of a type I diabetic environment abrogated the neurogenic response of cardiac resident nestin<sup>(+)</sup> cells to ischemia and 6-hydroxydopamine, respectively. These findings may not be limited to the rodent as nestin<sup>(+)</sup> cells were identified in the human heart, brain and skin [9,12,36,37]. Moreover, at least in the human brain and skin, a subpopulation of nestin<sup>(+)</sup> cells exhibited properties of a neural progenitor/stem cell population including neurosphere formation and differentiation to a neuronal cell [36,37]. In this regard, the inadequate differentiation of nestin<sup>(+)</sup> cells to a neuronal phenotype may in part contribute to the impaired neurogenic response reported during wound healing of injured diabetic tissue.

## **COMPETING INTERESTS**

The authors declare that they have no competing interests.

## **AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

AC generated animal models, performed Western blots and involved in drafting of the manuscript. MM: Immunofluorescence. VH: Immunofluorescence. ND: Animal models. AC: Design and coordination of the study and involved in the writing of the manuscript.

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank France Thériault for excellent secretarial assistance and Louis Villeneuve for technical expertise in immunofluorescence. This work was supported by the Heart and Stroke Foundation of Canada/Quebec (**contract grant number:** G-11-CA-4771) and the Canadian Diabetes Association (**contract grant number:** OG-3-11-3267-AC).

## 2.7 REFERENCES

1. Hasan W, Jama A, Donohue T, Wernli G, Onyszchuk G, Al-Hafez B, Bilgen M, Smith PG: Sympathetic hyperinnervation and inflammatory cell NGF synthesis following myocardial infarction in rats. *Brain Res* 2006, 1124:142–154.
2. Vracko R, Thorning D, Frederickson RG: Fate of nerve fibres in necrotic, healing and healed rat myocardium. *Lab Invest* 1990, 63:490–501.
3. Zhang LQ, Laato M: Innervation of normal and hypertrophic human scars and experimental wounds in the rat. *Ann Chir Gynaecol* 2001, 90(Suppl 215):29–32.
4. Zhou S, Chen LS, Miyauchi Y, Miyauchi M, Kar S, Kangavari S, Fishbein MC, Sharifi B, Chen PS: Mechanisms of cardiac nerve fibre sprouting after myocardial infarction in dogs. *Circ Res* 2004, 95:76–83.
5. Du X-J: Sympathoadrenergic mechanisms in functional regulation and development of cardiac hypertrophy and failure: findings from genetically engineered mice. *Cardiovasc Res* 2001, 50:443–453.
6. Woodcock EA, Du X-J, Reichelt ME, Graham RM: Cardiac  $\alpha$ 1-adrenergic drive in pathological remodelling. *Cardiovasc Res* 2008, 77:452–462.
7. Calderone A, Bel-Hadj S, Drapeau J, El-Helou V, Gosselin H, Clement R, Villeneuve L: Scar myofibroblasts of the infarcted rat heart express natriuretic peptides. *J Cell Physiol* 2006, 207:165–173.
8. Colombo F, Gosselin H, El-Helou V, Calderone A:  $\beta$ -adrenergic receptor-mediated DNA synthesis in cardiac fibroblasts proceeds via a phosphatidylinositol 3-kinase dependent pathway refractory to the antiproliferative action of cyclic AMP. *J Cell Physiol* 2003, 195:322–330.
9. Béguin PC, El-Helou V, Gillis MA, Duquette N, Gosselin H, Brugada R, Villeneuve L, Lauzier D, Tanguay JF, Ribuot C, Calderone A: Nestin<sup>(+)</sup> stem cells independently contribute to neural remodelling of the ischemic heart. *J Cell Physiol* 2011, 226:1157–1165.
10. El-Helou V, Dupuis J, Proulx C, Drapeau J, Clement R, Gosselin H, Villeneuve L, Manganas L, Calderone A: Resident nestin<sup>(+)</sup> neural stem cells and fibres were detected in the normal and damaged rat myocardium. *Hypertension* 2005, 46:1219–1225.

11. Calderone A: Nestin<sup>+</sup> cells and healing the infarcted heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012, 302:H1–9.
12. El-Helou V, Beguin PC, Assimakopoulos J, Clement R, Gosselin H, Brugada R, Aumont A, Biemaskie J, Villeneuve L, Leung TK, Fernandes KJ, Calderone A: The rat heart contains a neural stem cell population; role in sympathetic sprouting and angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 2008, 45:694–702.
13. Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabé-Heider F, Biernaskie J, Junek A, Kobayashi NR, Toma JG, Kaplan DR, Labosky PA, Rafuse V, Hui CC, Miller FD: A dermal niche for skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol* 2004, 6:1082–1093.
14. Mignone JL, Kukekov V, Chiang AS, Steindler D, Enikolopov G: Neural stem and progenitor cells in Nestin-GFP transgenic mice. *J Comp Neurol* 2004, 469:311–324.
15. Tomita Y, Matsumura K, Wakamatsu Y, Matsuzaki Y, Shibuya I, Kawaguchi H, Ieda M, Kanakubo S, Shimazaki T, Ogawa S, Osumi N, Okano H, Fukuda K: Cardiac neural stem cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J Cell Biol* 2005, 170:1135–1146.
16. Graselli G, Mandolesi G, Strata P, Cesare P: Impaired sprouting and axonal atrophy in cerebellar climbing fibres following in vivo silencing of growth-associated protein GAP-43. *PLoS One* 2011, 6:e20791.
17. Leu B, Koch E, Schmidt JT: GAP43 phosphorylation is critical for growth and branching of retinotectal arbors in Zebrafish. *Dev Neurobiol* 2010, 70:897–911.
18. Rekart JL, Meiri K, Routtenberg A: Hippocampal-dependent memory is impaired in heterozygous GAP-43 knockout mice. *Hippocampus* 2005, 15:1–7.
19. Xu QG, Midha R, Martinez JA, Guo GF, Zochodne DW: Facilitated sprouting in a peripheral nerve injury. *Neuroscience* 2008, 152:877–887.
20. Beller GA: Coronary heart disease in the first 30 years of the 21<sup>st</sup> century. *Circulation* 2001, 103:2428–2435.
21. Miettinen H, Lehto S, Salomaa V, Mahonen M, Niemela M, Haffner SM, Pyorala K, Tuomilehto J: Impact of diabetes on mortality after the first myocardial infarction. The FINMONICA myocardial infarction register study group. *Diabetes Care* 1998, 21:69–75.
22. Luo M, Guan X, Luczak ED, Lang D, Kutschke W, Gao Z, Yang J, Glynn P, Sossalla S, Swaminathan PD, Weiss RW, Yang B, Rokita AG, Maier LS, Efimov IR, Hund TJ, Anderson ME: Diabetes increases mortality after myocardial infarction by oxidizing CaMKII. *J Clin Invest* 2013, 123:1262–1274.
23. Ebenezer GJ, O'Donnell R, Hauer P, Cimino NP, McArthur JC, Polydefkis M: Impaired neurovascular repair in subjects with diabetes following experimental intracutaneous axotomy. *Brain* 2011, 134:1853–1863.
24. Ieda M, Kanazawa H, Ieda Y, Kimura K, Matsumura K, Tomita Y, Yagi T, Onizuka T, Shimoji K, Ogawa S, Makino S, Sano M, Fukuda K: Nerve growth factor is critical for cardiac sensory innervation and rescues neuropathy in diabetic hearts. *Circulation* 2006, 114:2351–2363.

25. Kennedy JM, Zochodne DW: Impaired peripheral nerve regeneration in diabetes mellitus. *J Peripher Nerv Syst* 2005, 10:144–157.
26. Muangman P, Muffley LA, Anthony JP, Spenny ML, Underwood RA, Olerud JE, Gibran NS: Nerve growth factor accelerates wound healing in diabetic mice. *Wound Repair Regen* 2004, 12:44–52.
27. El-Helou V, Proulx C, Beguin P, Assimakopoulos J, Gosselin H, Clement R, Huot-Marchand J, DeBlois D, Lajoie C, Calderone A: The cardiac neural stem cell phenotype was compromised in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *J Cell Physiol* 2009, 220:440–449.
28. Hayworth CR, Moody SE, Chodosh LA, Krieg P, Rimer M, Thompson WJ: Induction of neuregulin in mouse schwann cells in vivo mimics responses to denervation. *J Neurosci* 2006, 26:6873–6884.
29. Kang H, Tian L, Son YJ, Zuo Y, Procaccino D, Love F, Hayworth C, Trachtenberg J, Mikesh M, Sutton L, Ponomareva O, Mignone J, Enikolopov G, Rimer M, Thompson W: Regulation of the intermediate filament protein nestin at rodent neuromuscular junctions by innervation and activity. *J Neurosci* 2007, 27:5948–5957.
30. Lenzen S: The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008, 51:216–226.
31. Aerni-Flessner L, Abi-Jaoude M, Koenig A, Payne M, Hruz PW: GLUT4, GLUT1 and GLUT8 are the dominant GLUT transcripts expressed in the murine left ventricle. *Cardiovasc Diabetol* 2012, 11:63.
32. Maurer MH, Geomer HK, Burgers HF, Schelshorn DW, Kuschinsky W: Adult neural stem cells express glucose transporters GLUT1 and GLUT3 and regulate GLUT3 expression. *FEBS Lett* 2006, 580:4430–4434.
33. Karunanayake EH, Hearse DJ, Mellows G: The synthesis of [<sup>14</sup>C]Streptozotocin and its distribution and excretion in the rat. *Biochem J* 1974, 142:673–683.
34. Aldophe AB, Glasofer ED, Troetel WM, Weiss AJ, Manthei RW: Preliminary pharmacokinetics of streptozotocin, an antineoplastic antibiotic. *J Clin Pharmacol* 1977, 17:379–388.
35. Schein PS, Loftus S: Streptozotocin: Depression of mouse liver pyridine nucleotides. *Cancer Res* 1968, 28:1501–1506.
36. Yu H, Fang D, Kumar SM, Li L, Nguyen TK, Acs G, Herlyn M, Xu X: Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *Am J Pathol* 2006, 168:1879–1888.
37. Kukekov VG, Laywell ED, Suslov O, Davies K, Scheffler B, Thomas LB, O'Brien TF, Kusakabe M, Steindler DA: Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol* 1999, 156:333–344.

**CHAPITRE 3 : LA NESTINE EST UN MARQUEUR  
PRÉCOCE DE REMODELAGE PULMONAIRE  
SECONDAIRE À L'INFARCTUS DU MYOCARDE ET  
AU DIABÈTE DE TYPE 1**



# Nestin is a Marker of Lung Remodeling Secondary to Myocardial Infarction and Type I Diabetes in the Rat

ANDRÉANNE CHABOT,<sup>1,2</sup> MARC-ANDRE MEUS,<sup>1,2</sup> PATRICE NAUD,<sup>1</sup> VANESSA HERTIG,<sup>1,2</sup> JOCELYN DUPUIS,<sup>1</sup> LOUIS VILLENEUVE,<sup>1</sup> NABEL EL KHOURY,<sup>1,2</sup> CELINE FISET,<sup>1,3</sup> STANLEY NATTEL,<sup>1</sup> JEAN-FRANCOIS JASMIN,<sup>4,5</sup> AND ANGELINO CALDERONE<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Montreal Heart Institute, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup>Département de Physiologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>3</sup>Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>4</sup>Department of Stem Cell Biology & Regenerative Medicine, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania

<sup>5</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, University of the Sciences in Philadelphia, Philadelphia, Pennsylvania

Contract grant sponsor: Heart and Stroke Foundation of Canada/Quebec;

Contract grant number: G-11-CA-4771.

Contract grant sponsor: Canadian Diabetes Association;

Contract grant number: OG-3-11-3267-AC.

[Correction added on 7 October 2014, after first online publication 29 September 2014: The citation year has been corrected to 2015.]

\*Correspondance to: Angelino Calderone, Research Center, Institut de Cardiologie de Montréal, 5000 rue Bélanger Est, Montréal, Québec, HIT 1C8 Canada.

E-mail: angelo.calderone@umontreal.ca

Manuscript Received: 17 April 2014

Manuscript Accepted: 5 June 2014

Accepted manuscript online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 11 June 2014.

DOI: 10.1002/jcp.24696

**Running head:** Nestin and pulmonary remodelling

**Keywords:** pulmonary remodeling, myocardial infarction, type I diabetes, nestin, smooth muscle  $\alpha$ -actin, fibroblasts

### 3.1 ABSTRACT

Upregulation of the intermediate filament protein nestin was identified in a subpopulation of fibroblasts during reactive and reparative fibrosis and directly contributed to the enhanced proliferative phenotype. The present study tested the hypothesis that nestin was expressed in lung fibroblasts and the pattern of expression represented a distinct marker of pulmonary remodeling secondary to myocardial infarction and type I diabetes. Nestin<sup>(+)</sup> fibroblasts were detected in rat lungs and a subpopulation exhibited a myofibroblast phenotype delineated by the co-expression of smooth muscle  $\alpha$ -actin. In the lungs of myocardial infarcted rats, interstitial collagen content and nestin mRNA/protein levels were significantly increased despite the absence of secondary pulmonary hypertension, whereas smooth muscle  $\alpha$ -actin protein expression was unchanged. Exposure of rat pulmonary fibroblasts to pro-fibrotic stimuli angiotensin II and transforming growth factor- $\beta$  significantly increased nestin protein levels. In the lungs of type I diabetic rats, the absence of a reactive fibrotic response was associated with a significant downregulation of nestin mRNA/protein expression. Nestin was reported a target of miR-125b, albeit miR-125b levels were unchanged in pulmonary fibroblasts treated with pro-fibrotic stimuli. Nestin<sup>(+)</sup> cells lacking smooth muscle  $\alpha$ -actin/collagen staining were also identified in rodent lungs and a transgenic approach revealed that expression of the intermediate filament protein was driven by intron 2 of the nestin gene. The disparate regulation of nestin characterized a distinct pattern of pulmonary remodeling secondary to myocardial infarction and type I diabetes and upregulation of the intermediate filament protein in lung fibroblasts may have facilitated in part the reactive fibrotic response.

## 3.2 BACKGROUND

It has been clinically established that the long term prognosis of myocardial infarcted patients that develop secondary pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction was poor (Abramson *et al.* 1992; Ghio *et al.* 2001). Alveolar epithelial cell basement membrane thickening represents a seminal pathophysiological feature of pulmonary hypertension and lung compliance was further compromised by a concomitant reactive fibrotic response (Huang *et al.* 2001; Jasmin *et al.* 2003; Kingsbury *et al.* 2003). Reactive fibrosis was characterized by the uncontrolled synthesis and deposition of extracellular matrix proteins by a population of smooth muscle  $\alpha$ -actin-expressing fibroblasts denoted as myofibroblasts (Hinz *et al.* 2012). In the lungs of myocardial infarcted rats with established pulmonary hypertension, smooth muscle  $\alpha$ -actin<sup>(+)</sup> myofibroblasts were identified in the alveolar septa whereas a modest number of cells detected in normal lungs (Jasmin *et al.* 2003). An analogous paradigm was reported in patients with post-capillary pulmonary hypertension secondary to left ventricular failure as a significant population of smooth muscle  $\alpha$ -actin<sup>(+)</sup> myofibroblasts was present in the alveolar septa (Kapanci *et al.* 1990). Administration of the angiotensin II type I receptor antagonist irbersartan to myocardial infarcted rats significantly reduced the reactive fibrotic response of the lungs, improved pulmonary function and attenuated right ventricular hypertrophy (Jasmin *et al.* 2003; Nguyen *et al.* 2003). Pulmonary remodeling and dysfunction likewise represent secondary complications of type I and II diabetic patients (Schnack *et al.* 1996; van den Borst *et al.* 2010; van Gent *et al.* 2002; Vracko *et al.* 1979). Epidemiological studies have reported that diabetic patients develop moderate to severe lung dysfunction associated with alveolar epithelial cell basement thickening and excessive deposition of extracellular matrix proteins (Schnack *et al.* 1996; van den Borst *et al.* 2010; van Gent *et al.* 2002; Vracko *et al.* 1979). The secondary reactive fibrotic response reported in the lungs of diabetic patients was recapitulated in streptozotocin-induced diabetes and observed in OVE26 mice that spontaneously develop type I diabetes (Yang *et al.* 2011). Analogous to that observed in myocardial infarcted rats, administration of the angiotensin II type I receptor antagonist losartan inhibited the reactive fibrotic response in the lungs of experimental type I diabetes (Yang *et al.* 2011).

The intermediate filament protein nestin was first identified in CNS-residing neural progenitor/stem cells (Lendahl *et al.* 1990). The 240 kDa protein is a member of the class VI family of intermediate filament proteins and in contrast to other proteins, nestin is unable to self assemble and form homodimers because of a short NH<sub>2</sub>-terminus (Wiese *et al.* 2004). Therefore, nestin forms heterodimers with alternative intermediate filament proteins including desmin and vimentin (Wiese *et al.* 2004). Several studies have reported that nestin expression was not limited to neural progenitor/stem cells as the intermediate filament protein was detected in skeletal muscle during development, induced in vascular cells during *de novo* blood vessel formation following injury and in diverse forms of cancer (Aihara *et al.* 2004; Ishiwata *et al.* 2011; Mokry *et al.* 2004; Oikawa *et al.* 2010; Sejersen *et al.* 1993). Biologically, nestin expression was implicated in cell proliferation and/or invasiveness (Aihara *et al.* 2004; Huang *et al.* 2009; Xue *et al.* 2010). In various fibroproliferative diseases and during the reparative fibrotic response of the infarcted heart, nestin protein levels were increased and detected in a subpopulation of smooth muscle  $\alpha$ -actin<sup>(+)</sup> myofibroblasts (Béguin *et al.* 2012; Sakairi *et al.* 2007; Tomioka *et al.* 2010). Based on these observations, the present study tested the hypothesis that nestin was expressed in lung fibroblasts and the pattern of expression represented a marker of pulmonary remodeling secondary to myocardial infarction and experimental type I diabetes.

### **3.3 METHODS**

#### **Ethical approval**

The use and care of laboratory rats was according to the Canadian Council for Animal Care and approved by the Animal Care Committee of the Montreal Heart Institute. The use of human pulmonary tissue was approved by the Clinical Ethics board of the Montreal Heart Institute.

## **Animal Models and Pulmonary Tissue from Heart Failure Patients**

The myocardial infarct model and streptozotocin-induced model of type I diabetes were established in adult male Sprague Dawley rats (9-11 weeks old; Charles Rivers, Canada), as previously described (El-Helou *et al.* 2009; Jasmin *et al.* 2003; Nguyen *et al.* 2003). Ventricular contractility was measured with a Millar catheter as previously described (Jasmin *et al.* 2003; Nguyen *et al.* 2003). Nestin-GFP male mice (~12 weeks old) were generated by Dr. Enikolopov, housed and bred at Thomas Jefferson University, subjected to sham or complete coronary artery ligation and sacrificed 1 week later. The transgenic mouse has the 5.8 kb fragment of the promoter region and the 1.8 kb fragment containing the second intron of the nestin gene combined with the cDNA of the enhanced version of the green fluorescent protein (GFP) (El-Helou *et al.* 2013; Mignone *et al.* 2004). At the end of each experiment, the heart and lungs were removed, weighed and pulmonary lobes fixed in formalin or 2-methylbutane for immunofluorescence, stored at -80°C for protein/gene expression or used to isolate pulmonary fibroblasts. Scar area was determined as previously described (El-Helou *et al.* 2013).

Autopsy reports on patients were evaluated and subjects with a diagnosis of heart failure were randomly selected. Inclusion criteria were a pathologic and clinical diagnosis of heart failure without evidence of additional lung disease.

## **In vitro experiments on pulmonary fibroblasts**

Pulmonary fibroblasts from neonatal and adult rats were isolated from lobe P3 and cultured as previously described (Béguin *et al.* 2012). For growth studies, protein and gene expression, 1<sup>st</sup> passage neonatal pulmonary fibroblasts were plated at a density of ~250 cells/mm<sup>2</sup> and ~500 cells/mm<sup>2</sup> respectively in DMEM supplemented with 7% fetal bovine serum (FBS) for 24 hours. Cells were subsequently washed; the media replaced with serum-free DMEM supplemented with insulin/selenium/transferrin and experiments performed 48 hours later. Pulmonary fibroblasts were treated with angiotensin II (AII, 1 μM; Sigma-Aldrich), transforming growth factor-β<sub>1</sub> (TGF-β<sub>1</sub>, 5 ng/ml; R&D Systems), transforming growth factor-β<sub>3</sub> (TGF-β<sub>3</sub>, 5 ng/ml; R&D Systems) or 10% FBS for 24 hours.

Protein and DNA synthesis were determined by  $^3\text{H}$ -leucine (2  $\mu\text{Ci/ml}$ ; MP Biomedicals) and  $^3\text{H}$ -thymidine (1  $\mu\text{Ci/ml}$ ; Perkin-Elmer) uptake, respectively (Béguin *et al.* 2012).

### **Western blot**

Protein lysates (30  $\mu\text{g}$ ) obtained from lobe P2 or cultured pulmonary fibroblasts were subjected to SDS-electrophoresis and antibodies used include the mouse monoclonal anti-nestin (1:500; Chemicon), mouse monoclonal smooth muscle  $\alpha$ -actin (1:10,000; Sigma-Aldrich), rabbit polyclonal anti-aquaporin 5 (1:500; Millipore), rabbit polyclonal anti-pro-surfactant protein C (1:500; Millipore), and mouse monoclonal anti-GAPDH (1:50,000; Ambion). Following overnight incubation at 4°C, the appropriate secondary antibody-conjugated to horseradish peroxidase (1:20,000, Jackson ImmunoResearch) was added, bands visualized utilizing the ECL detection kit (Perkin Elmer), films scanned with Image J software® and the target protein signal was depicted as arbitrary light units normalized to GAPDH protein (Béguin *et al.* 2012).

### **Immunofluorescence & Masson trichrome staining**

Immunofluorescence on lobe P3 or P4 (cryostat sections of 14  $\mu\text{m}$  thickness) was performed with the mouse monoclonal anti-nestin (1:400; Chemicon), rabbit polyclonal anti-smooth muscle  $\alpha$ -actin (1:200; Abcam), rabbit polyclonal anti-aquaporin 5 (1:200; Millipore) and rabbit polyclonal anti-pro-surfactant protein C (1:200; Millipore), as previously described (El-Helou *et al.* 2008). The lungs of transgenic mice were fixed in formalin, tissue sections of 6-8  $\mu\text{m}$  thickness were prepared, subjected to the antigen retrieval method and stained with the mouse monoclonal anti-nestin (1:150), rabbit polyclonal anti-smooth muscle  $\alpha$ -actin (1:100) and chicken anti-GFP (1:100; Chemicon), as previously described (El-Helou *et al.* 2013). Human lung samples were embedded in paraffin, serial cryostat sections of 6  $\mu\text{m}$  were prepared, subjected to the antigen retrieval method and stained with mouse monoclonal anti-human nestin (1:100; Santa Cruz) and rabbit polyclonal anti-smooth muscle  $\alpha$ -actin (1:100; Abcam), as previously described (El-Helou *et al.* 2008). Primary and 1<sup>st</sup> passage



pulmonary fibroblasts were plated on glass coverslips for 24-72 hrs, fixed with 4% paraformaldehyde and stained with the mouse monoclonal anti-nestin (1:500), rabbit polyclonal anti-smooth muscle  $\alpha$ -actin (1:200; Abcam) and rabbit polyclonal anti-collagen type I (1:400; Abcam). The nucleus was identified with TO-PRO-3 (Invitrogen; 1.5  $\mu$ M; emission wavelength, 661 nm) staining. Secondary antibodies used were a goat anti-mouse IgG conjugated to Alexa-555 (1:800; Invitrogen; emission wavelength, 570 nm), a goat anti-rabbit IgG conjugated to Alexa-488 (1:800; Invitrogen; emission wavelength, 520 nm) or a goat anti-chicken IgG conjugated to Alexa-555 (1:800; Invitrogen; emission wavelength, 570 nm). Non-specific staining was determined by the addition of an isotype control antibody or the conjugated secondary antibody alone. Immunofluorescence was visualized with a 10X- or 63X-oil 1.4 NA DIC. Masson trichrome staining of rat lungs was performed as previously described (Jasmin *et al.* 2003).

### **Taqman quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Pulmonary lobe P1 and neonatal rat pulmonary fibroblasts were homogenized in lysis buffer provided by the miRvana kit (Ambion). Messenger RNAs were reverse-transcribed with the High-capacity Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Nestin mRNA levels were determined with the molecule SYBR Green (Applied Biosystems), primers used were rat nestin; forward 5'-TGCAGGCCACTGATAAGTTCCA-3' and reverse 5'-TTCTCCTGCTCCAGGGCTTCCA-3' and gene expression normalized by the geometric mean of HPRT and GAPDH mRNA (primers obtained from Applied Biosystems) (El-Helou *et al.* 2013). Quantitative PCR was performed with TaqMan probes and expression of the miR-125b family (primers from Applied Biosystems) was normalized to snoRNA U6. Reactions were run on a Stratagene MX3000 and relative gene expression calculated by the  $2^{-\Delta C_t}$  method.

### **Statistics**

Data were presented as the mean $\pm$ S.E.M, and (n) represented the number of rats and/or independent preparations of pulmonary fibroblasts used per experiment. Cardiac and pulmonary morphology, contractile function, plasma glucose levels, growth studies and

protein/gene expression were evaluated by a student's unpaired t-test and a value of  $P < 0.05$  considered statistically significant.

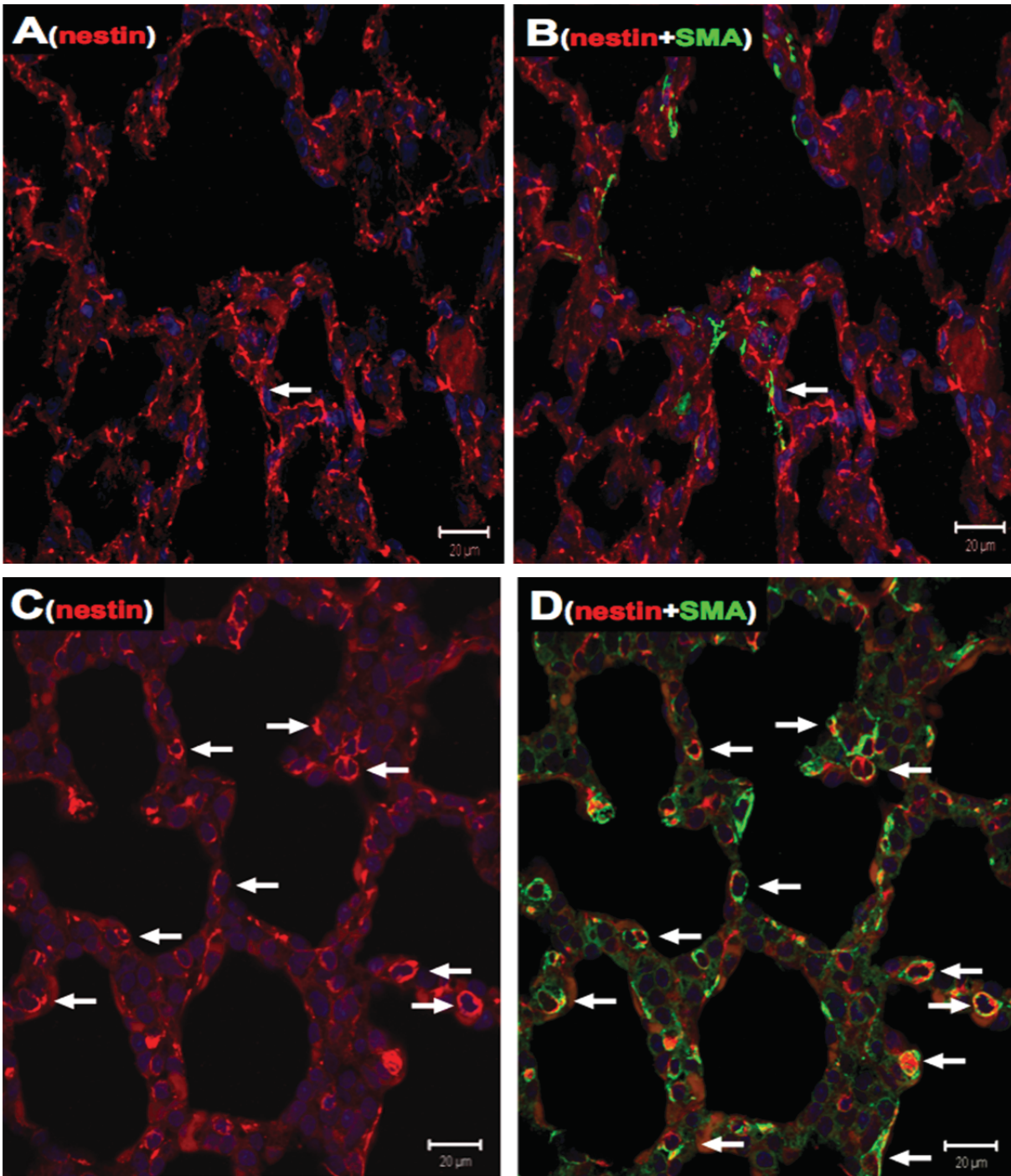
### 3.4 RESULTS

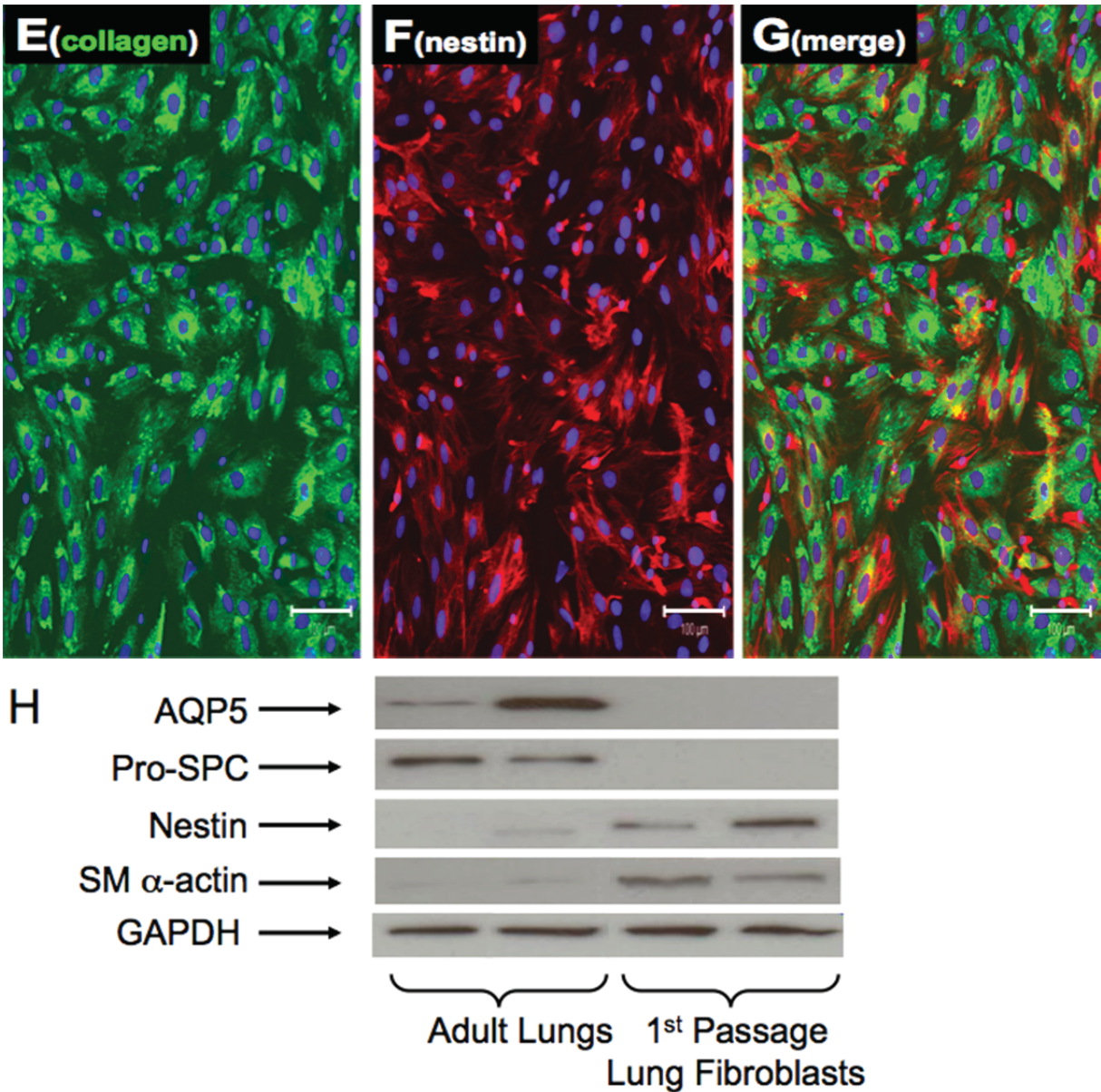
#### **Rat Lungs Contain Nestin<sup>(+)</sup> Fibroblasts and a Subpopulation Co-expressed Smooth Muscle $\alpha$ -actin**

Immunoreactive nestin<sup>(+)</sup> and smooth muscle  $\alpha$ -actin<sup>(+)</sup> cells were detected interspersed among the alveoli and lining the bronchioles of adult male Sprague Dawley rats, whereas staining was absent in columnar or terminal bronchiolar cells (Figures 1A & 1B). The preponderance of nestin<sup>(+)</sup> cells selectively expressed the intermediate filament protein whereas a modest subpopulation co-expressed smooth muscle  $\alpha$ -actin ( $12 \pm 2\%$ ;  $n=3$ ). Nestin immunoreactivity was also detected in endothelial cells of blood vessels in the lungs of normal rats but intensity varied and the ubiquitous staining of the vasculature was not observed. By contrast, nestin staining was not observed in smooth muscle  $\alpha$ -actin<sup>(+)</sup> vascular smooth muscle cells in blood vessels of normal adult rat lungs. Alveolar epithelial type I cells were characterized by aquaporin 5 staining and immunoreactivity detected in broad/flat shaped cells (Suppl Figure 1A). Cytoplasmic pro-surfactant protein C staining of cuboidal-like cells identified alveolar epithelial type II cells (Suppl Figure 1B). Nestin staining was not detected in alveolar epithelial type I or type II cells (Suppl Figures 1A & 1B). In the lungs of neonatal rats, nestin<sup>(+)</sup> cells were likewise interspersed within the alveoli and lining the bronchioles and a greater percentage co-expressed smooth muscle  $\alpha$ -actin ( $58 \pm 2\%$ ;  $n=3$ ;  $P < 0.05$  versus adult) (Figures 1C & 1D). Following isolation and culture, the preponderance of adult and neonatal rat pulmonary fibroblasts co-expressed filamentous and/or granular smooth muscle  $\alpha$ -actin (Suppl Figures 2A-2C), cytoplasmic collagen type 1 and the intermediate filament protein nestin (Figures 1E-1G) whereas aquaporin 5 and pro-surfactant protein C were not detected (Figure 1H). Previous studies have reported that smooth muscle  $\alpha$ -actin<sup>(+)</sup> myofibroblasts were characterized by the enhanced synthesis and deposition of extracellular matrix proteins (Hinz *et al.* 2012; Jasmin *et al.* 2003; Kapanci *et al.* 1990). Despite a significant presence of

smooth muscle  $\alpha$ -actin<sup>(+)</sup> and nestin/smooth muscle  $\alpha$ -actin<sup>(+)</sup> fibroblasts in the lungs of neonatal rats, the interstitial content of total collagen as measured by Masson Trichrome staining was negligible (Figure 2A).

**Figure 1**

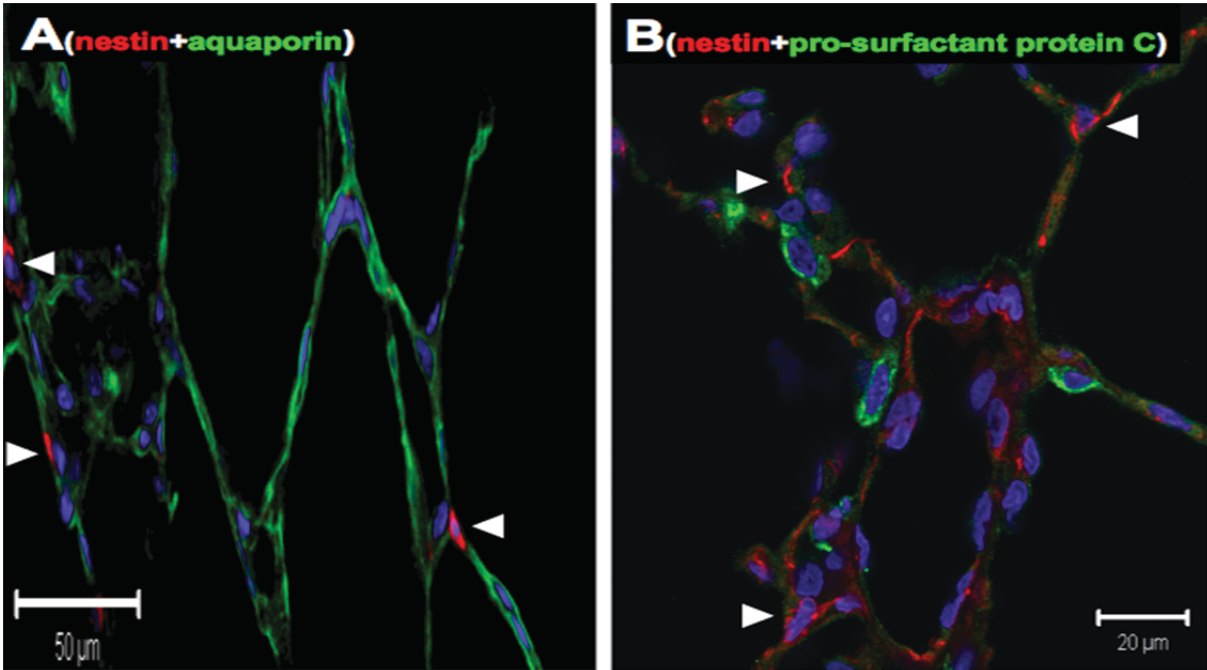




**Figure 1 : Adult and neonatal rat lung contains nestin<sup>(+)</sup> cells and a subpopulation exhibit a myofibroblast phenotype**

(Panels A & B; Scale 20 μm) In adult and (Panels C & D; Scale 20 μm) neonatal rat lungs, smooth muscle α-actin<sup>(+)</sup> (green fluorescence) and nestin<sup>(+)</sup> (red fluorescence) cells were detected. A modest percentage of nestin<sup>(+)</sup> cells co-expressed smooth muscle α-actin (indicated by arrow) in adult lungs whereas a greater percentage was identified in neonatal lungs (Panels E-G; Scale 100 μm) Nestin<sup>(+)</sup> (red fluorescence) pulmonary cells isolated from adult lungs displayed a myofibroblast phenotype characterized by the co-expression collagen type I (green fluorescence) and smooth muscle α-actin (data not shown). (Panel H) Aquaporin 5 (AQP5) and pro-surfactant protein C (Pro-SPC) expression were not detected in nestin<sup>(+)</sup>/smooth muscle α-actin<sup>(+)</sup> 1<sup>st</sup> passage pulmonary fibroblasts. The nucleus was identified by TO-PRO-3 staining (blue fluorescence).

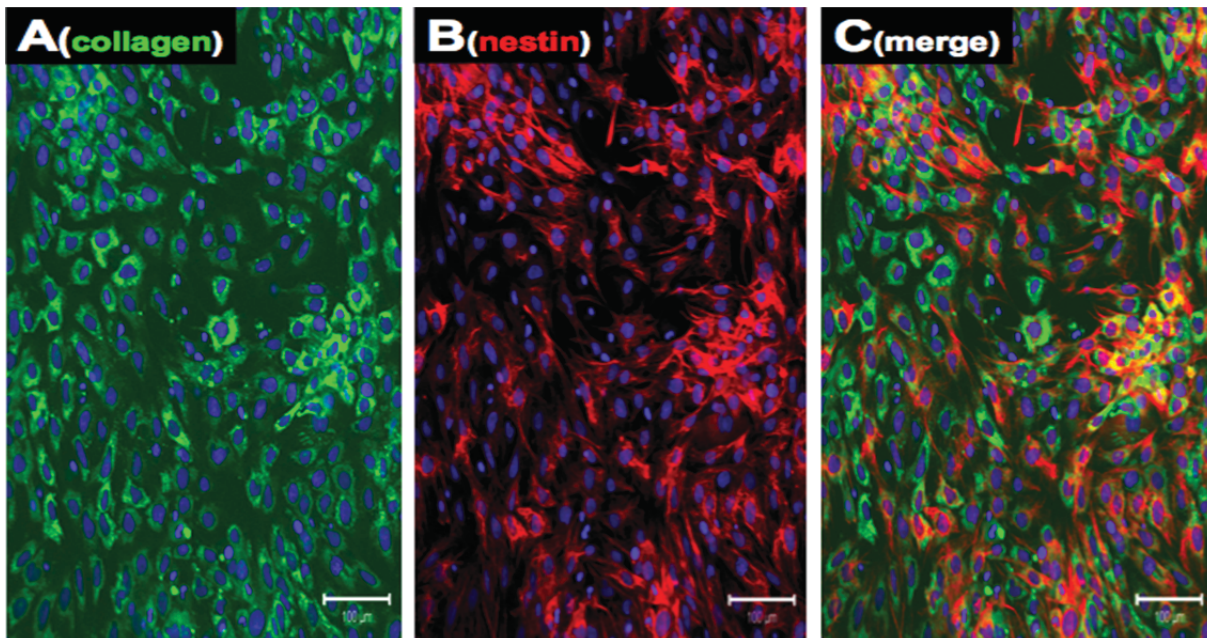




**Suppl Figure 1 : Adult rat lung contains Nestin<sup>(+)</sup> cells, which are not alveolar epithelial type I or type II cells**

In normal adult lungs, nestin immunoreactive cells (red fluorescence; indicated by arrowhead) did not stain for (**Panel A**; Scale 50  $\mu$ m) aquaporin 5 (green fluorescence, marker of alveolar epithelial type 1 cells) or (**Panel B**; Scale 20  $\mu$ m) pro-surfactant protein C (green fluorescence, marker of alveolar epithelial type 2 cells). The nucleus was identified by TO-PRO-3 staining (blue fluorescence).

**Suppl Figure 2**



## **Suppl Figure 2 : Neonatal rat nestin<sup>(+)</sup> pulmonary cells exhibit a myofibroblast phenotype**

Pulmonary cells isolated from neonatal rat lungs displayed a myofibroblast phenotype characterized by the co-expression of collagen type I (**Panel A**; Scale 100  $\mu\text{m}$ ) and nestin (**Panel B**; Scale 100  $\mu\text{m}$ ). **Panel C** represents a merge of the fluorescent signals and the nucleus was identified by TO-PRO-3 staining (blue fluorescence).

### **Nestin Expression in the lungs of 1-week Post-MI Rats and Heart Failure Patients**

One week following permanent coronary artery ligation, scar formation was associated with left ventricular contractile dysfunction, whereas right ventricular contractility, right ventricle and lung weight of 1-week post-MI rats were similar to sham rats (Tables 1 & 2). Despite the absence of pulmonary hypertension, Masson Trichrome staining revealed a reactive fibrotic response as the content of interstitial collagen in the lungs of post-MI rats was significantly increased as compared to sham rats (Figures 2A & 2B). Aquaporin 5 (sham,  $0.42 \pm 0.15$  versus MI,  $0.48 \pm 0.17$ ) and pro-surfactant protein C (sham,  $0.46 \pm 0.06$  versus MI,  $0.63 \pm 0.10$ ) protein levels in the lungs of 1-week post-MI rats ( $n=4$ ) were similar to sham rats ( $n=4$ ) (Figure 2C). However, nestin protein (Figures 2D & 2E) and mRNA (Figure 2F) expression were significantly increased in the lungs of post-MI rats. Smooth muscle  $\alpha$ -actin protein content (Figures 2D & 2E) and the percentage of nestin<sup>(+)</sup> cells that co-expressed smooth muscle  $\alpha$ -actin ( $10 \pm 3\%$ ;  $n=3$  rats) in the lungs of post-MI rats (Figures 2G & 2H) were not significantly different from sham rats. These data suggest that nestin upregulation rather than smooth muscle  $\alpha$ -actin represents an early marker of the reactive fibrotic response in the lungs of 1-week post-MI rats. Nestin and smooth muscle  $\alpha$ -actin co-expression was also detected in a paucity of blood vessels in the lungs of post-MI rats (Figures 2G & 2H). Pulmonary fibroblasts isolated and cultured from the lungs of 1-week post-MI rats were characterized by the co-expression of granular/cytoplasmic collagen type I, smooth muscle  $\alpha$ -actin and the intermediate filament protein nestin (Suppl Figure 3).



Alveolar thickening was observed in lung biopsies taken from patients that succumbed to heart failure ( $n=3$ ) (Figures 2I & 2J). Nestin<sup>(+)</sup> cells were detected interspersed among the alveoli and lining the bronchioles of lungs of heart failure patients and the preponderance lacked smooth muscle  $\alpha$ -actin staining (Figures 2I & 2J). Nestin and smooth muscle  $\alpha$ -actin co-expression was observed in vascular smooth muscle cells of small and large caliber blood vessels and nestin staining identified in endothelial cells (Figures 2I & 2J). These data demonstrate that as observed in rat lungs, nestin-expressing cells lacking smooth muscle  $\alpha$ -actin staining were prevalent in the lungs of heart failure patients and vascular remodeling was further characterized by presence of the intermediate filament protein.

**Table 1 : Body, heart and lung weights of sham and myocardial infarcted rats**

	<b>BW</b> (gr)	<b>LV/BW</b> (mg/gr)	<b>RV/BW</b> (mg/gr)	<b>P1/BW</b> (mg/gr)	<b>P2/BW</b> (mg/gr)	<b>P5/BW</b> (mg/gr)	<b>Scar weight</b> (grams)	<b>Scar Area</b> (cm <sup>2</sup> )
<b>Sham (n=6-7)</b>	<b>304±6</b>	<b>1.74±0.10</b>	<b>0.62±0.03</b>	<b>0.527±0.048</b>	<b>0.600±0.05</b>	<b>0.459±0.043</b>	---	---
<b>MI (n=5-6)</b>	<b>316±9</b>	<b>1.80±0.12</b>	<b>0.68±0.05</b>	<b>0.539±0.030</b>	<b>0.644±0.03</b>	<b>0.463±0.030</b>	<b>0.074±0.01</b>	<b>0.803±0.052</b>

MI indicates myocardial infarction; LV, left ventricle; RV, right ventricle; BW, body weight; P1, lung lobe 1; P2, lung lobe 2; P5, lung lobe 5, data presented as mean±S.E.M, and (n) number of rats examined.

**Table 2 : Left and right ventricular contractile function of sham and 1-week post myocardial infarcted rats**

	<b>LVSP</b> (mmHg)	<b>LVEDP</b> (mmHg)	<b>LV+dP/dt</b> (mmHg/sec)	<b>LV-dP/dt</b> (mmHg/sec)	<b>RVSP</b> (mmHg)	<b>RV+dP/dt</b> (mmHg/sec)	<b>RV-dP/dt</b> (mmHg/sec)
<b>Sham (n=6-7)</b>	<b>136±8</b>	<b>8±1</b>	<b>6240±133</b>	<b>5439±186</b>	<b>27±1</b>	<b>1134±60</b>	<b>853±60</b>
<b>MI (n=5-6)</b>	<b>115±4 *</b>	<b>15±2 *</b>	<b>5356±164 *</b>	<b>4005±141 *</b>	<b>25±1</b>	<b>1035±57</b>	<b>650±71</b>

MI indicates myocardial infarction; LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure; LVSP, left ventricular systolic pressure; LV + dP/dt, rate of left ventricular contraction; LV - dP/dt, rate of left ventricular relaxation; RVSP, right ventricular systolic pressure; RV + dP/dt, rate of right ventricular contraction; RV - dP/dt, rate of right ventricular relaxation. Data are presented as mean±S.E.M., evaluated by a Student's unpaired t-test, (\*) represents  $p < 0.05$  versus sham and (n) number of rats examined.

Figure 2

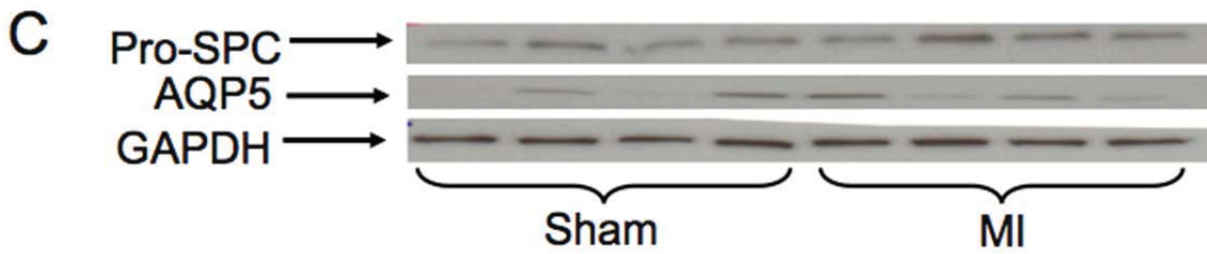
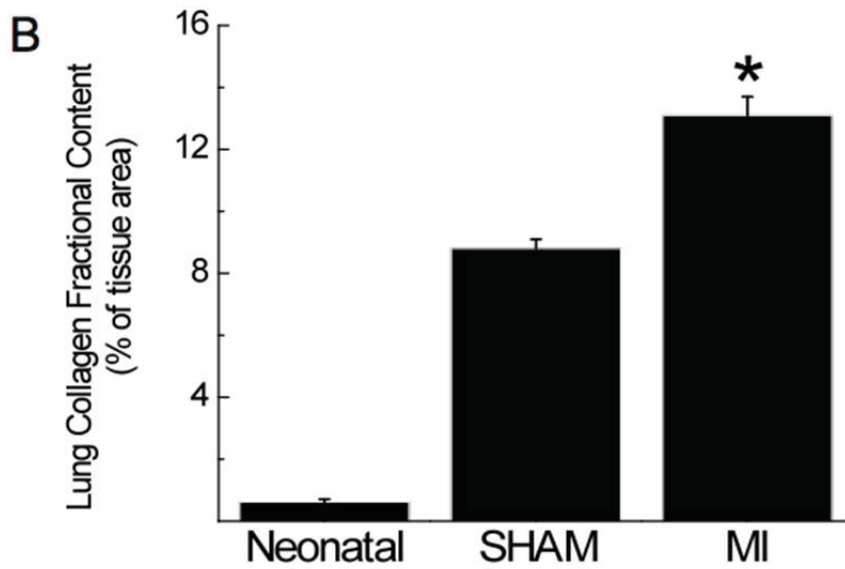
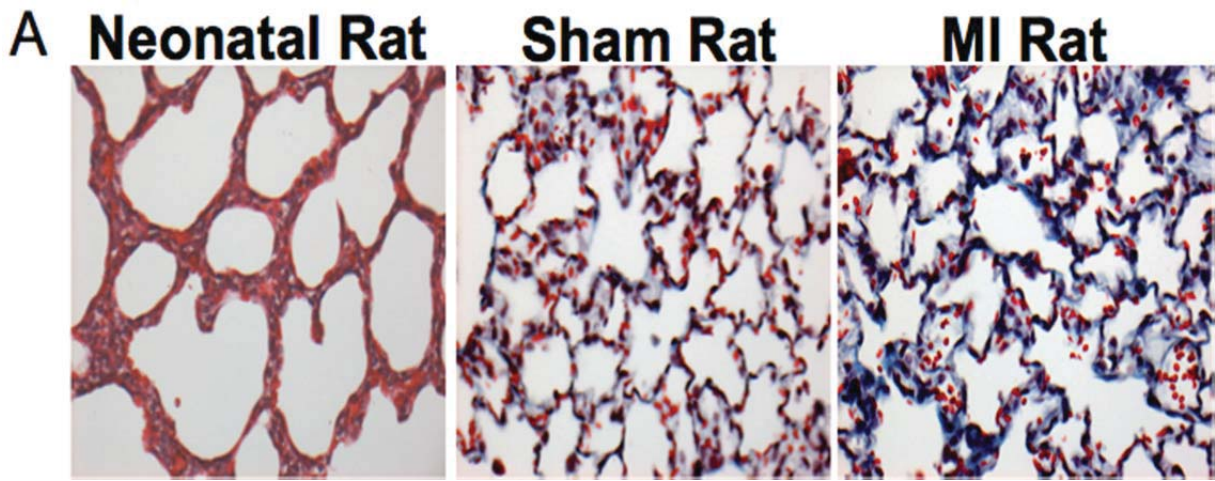


Figure 2 (suite)

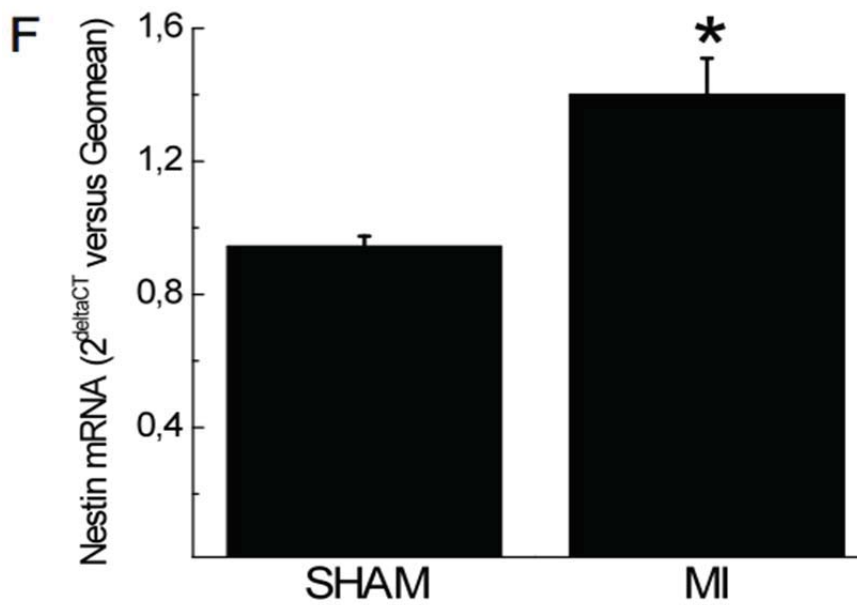
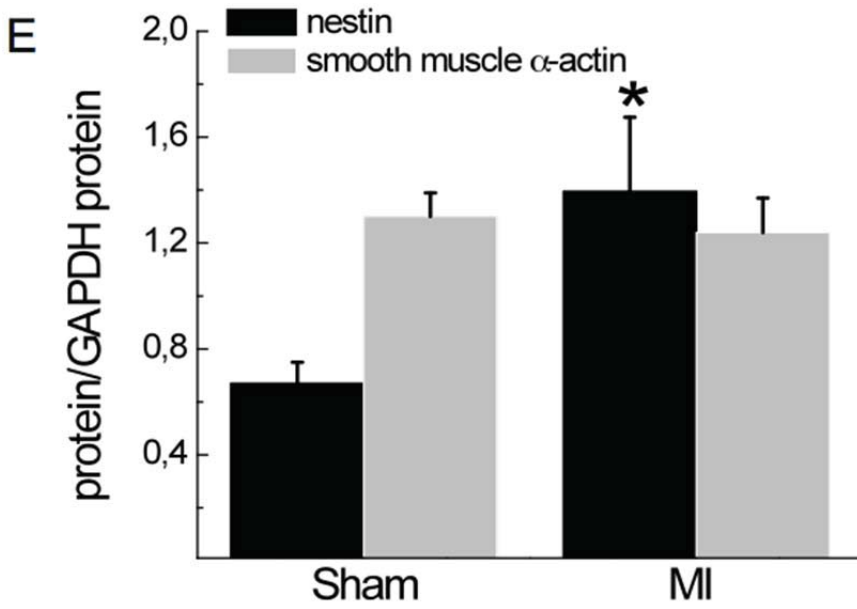
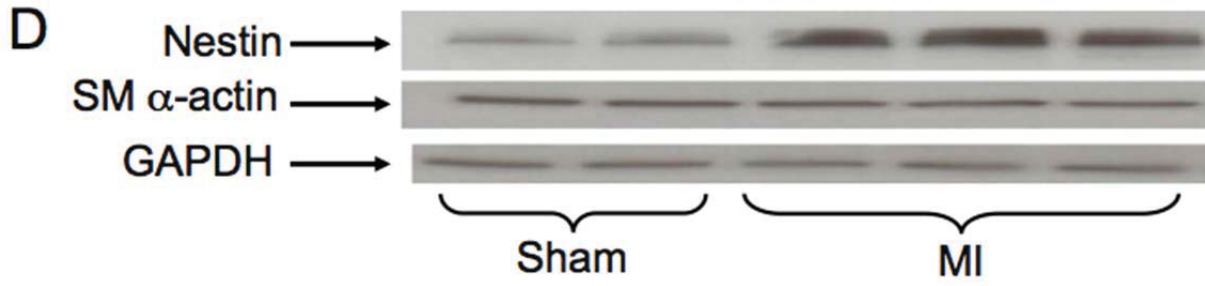
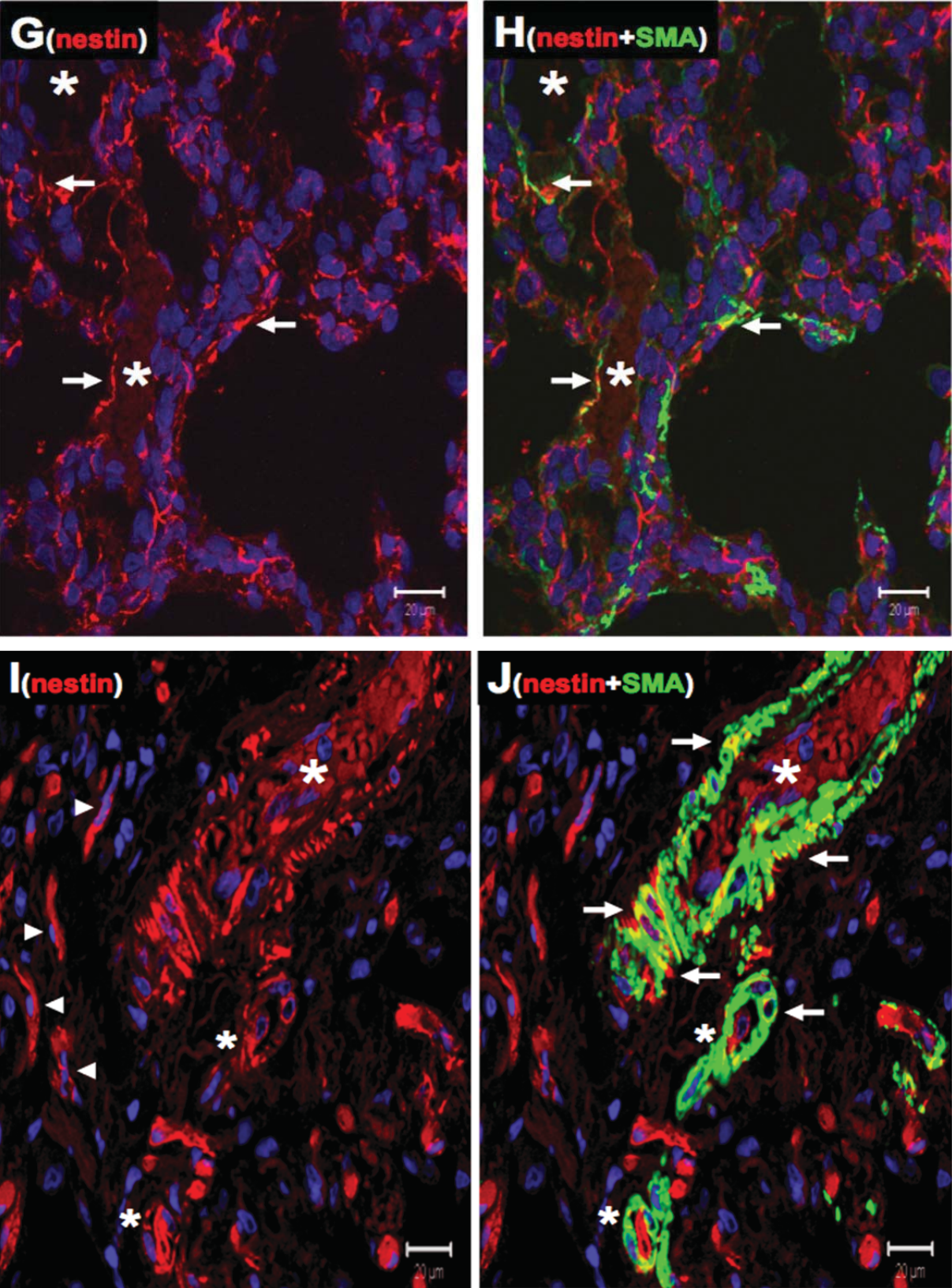


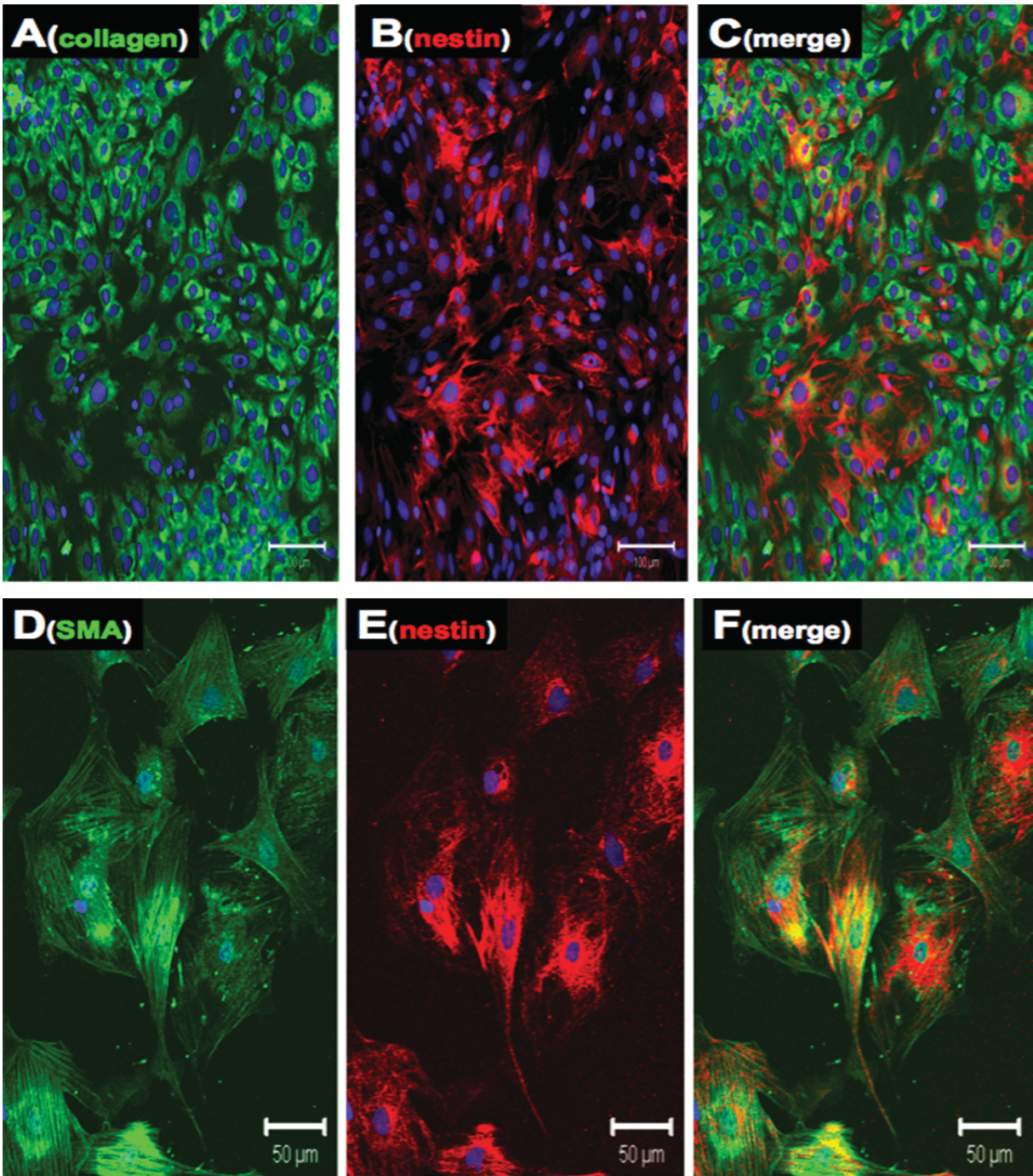
Figure 2 (suite)





**Figure 2 : Pulmonary remodeling of 1-week post-MI rats and patients that succumbed to heart failure**

(Panels A & B) Masson Trichrome staining revealed that collagen levels were negligible in the lungs of neonatal rats whereas the total content of interstitial collagen in the lungs of 1-week post-MI rats was significantly increased as compared to sham rats. Collagen staining were assessed at 40X magnification and (\*) denotes  $P < 0.05$  versus sham. (Panel C) Aquaporin 5 (AQP5) and pro-surfactant protein C (Pro-SPC) protein expression in the lungs of 1-week post-MI rats were similar to sham. By contrast, nestin protein (Panels D & E) and mRNA levels (Panel F) were significantly increased in the lungs of 1-week post-MI rats whereas smooth muscle  $\alpha$ -actin protein content was unchanged. (\*) denotes  $p < 0.05$  versus sham. (Panels G & H; Scale 20  $\mu\text{m}$ ) In the lungs of post-MI rats, smooth muscle  $\alpha$ -actin<sup>(+)</sup> (green fluorescence) and nestin<sup>(+)</sup> (red fluorescence) cells were detected and a modest percentage of nestin<sup>(+)</sup> cells co-expressed smooth muscle  $\alpha$ -actin (indicated by arrow). A paucity of blood vessels (indicated by asterisk) was associated with nestin and smooth muscle  $\alpha$ -actin co-expression. (Panels I & J; Scale 20  $\mu\text{m}$ ) Individual nestin<sup>(+)</sup> (red fluorescence; indicated by arrowhead) cells were detected in the lungs of patients that succumbed to heart failure and the preponderance lacked smooth muscle  $\alpha$ -actin (green fluorescence) staining. However, nestin and smooth muscle  $\alpha$ -actin co-expression were detected in vascular smooth muscle cells of numerous blood vessels (indicated by asterisk) and selective nestin staining identified in endothelial cells. The nucleus was identified by TO-PRO-3 staining (blue fluorescence).



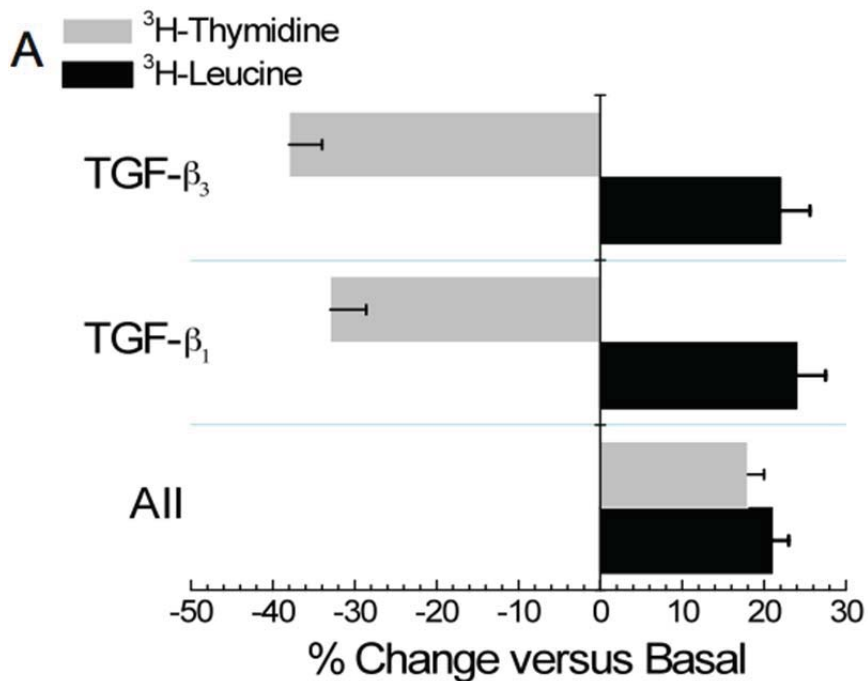
**Suppl Figure 3. MI rat nestin<sup>(+)</sup> pulmonary cells exhibit a myofibroblast phenotype**  
Pulmonary cells isolated from 1-week post-MI rats displayed a myofibroblast phenotype characterized by the co-expression of collagen type I (**Panel A**; Scale 100  $\mu\text{m}$ ) and nestin (**Panel B**; Scale 100  $\mu\text{m}$ ) and smooth muscle  $\alpha$ -actin (**Panel D**; Scale 100  $\mu\text{m}$ ) and nestin (**Panel E**; Scale 100  $\mu\text{m}$ ). **Panels C** and **F** represent a merge of the fluorescent signals and the nucleus was identified by TO-PRO-3 staining (blue fluorescence).

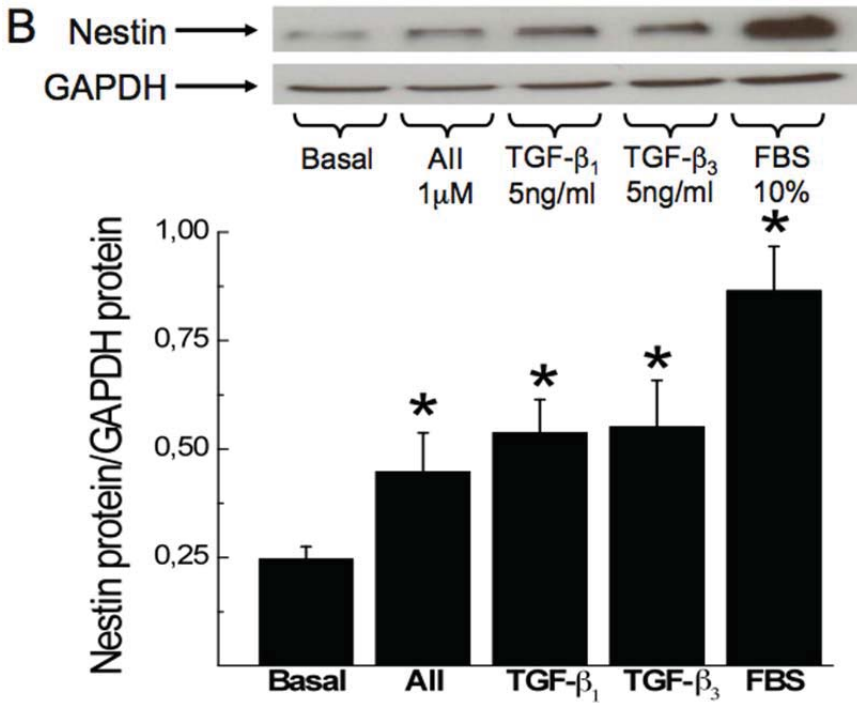


### Pro-fibrotic Stimuli Increased Nestin Expression in Pulmonary Fibroblasts

The exposure of neonatal rat pulmonary fibroblasts to AII ( $10^{-6}$  M) or 10% FBS (data not shown) for 24 hrs significantly increased  $^3\text{H}$ -leucine and  $^3\text{H}$ -thymidine uptake (Figure 3A) and concomitantly upregulated nestin protein levels (Figure 3B). The 24 hr stimulation of rat pulmonary fibroblasts with pro-fibrotic stimuli TGF- $\beta_1$  (5 ng/ml) and TGF- $\beta_3$  (5 ng/ml) significantly increased  $^3\text{H}$ -leucine uptake but attenuated  $^3\text{H}$ -thymidine uptake (Figure 3A). Despite the disparate effect on DNA and protein synthesis, the exposure of pulmonary fibroblasts to TGF- $\beta_1$  and TGF- $\beta_3$  significantly increased nestin protein expression (Figure 3B). The upregulation of nestin by pro-fibrotic peptide growth factors suggest that the increased expression of the intermediate filament protein in the lungs of 1-week post-MI rats may have occurred in part in residing fibroblasts.

Figure 3





**Figure 3 : Profibrotic stimuli induce nestin expression in pulmonary fibroblasts**

(Panel A) The exposure of pulmonary fibroblasts to angiotensin II (AII; 1 μM) for 24 hours increased <sup>3</sup>H-thymidine and <sup>3</sup>H-leucine uptake. Transforming growth factor-β<sub>1</sub> (TGF-β<sub>1</sub>; 5 ng/ml) and transforming growth factor-β<sub>3</sub> (TGF-β<sub>3</sub>; 5 ng/ml) treatment of pulmonary fibroblasts reduced <sup>3</sup>H-thymidine uptake whereas <sup>3</sup>H-leucine uptake was increased. (Panel B) Pulmonary fibroblasts exposed to AII (1 μM), TGF-β<sub>1</sub> (5 ng/ml), TGF-β<sub>3</sub> (5 ng/ml) and FBS (10%) for 24 hours significantly increased nestin protein levels. (\*) denotes  $p < 0.05$  versus sham.

### Nestin Protein and mRNA Levels Reduced in the Lungs of Type I Diabetic Rats

Seven days following streptozotocin (STZ) injection of normal adult male Sprague Dawley rats, plasma glucose levels were significantly elevated, body weight markedly reduced, left ventricular contractile function diminished, whereas right ventricular contractility was normal (Tables 3 & 4). Right ventricle and lung weight were also similar between non-diabetic and type I diabetic rats (Table 3). As compared to normal lungs (Suppl Figures 4A-4C), a marked reduction of nestin<sup>(+)</sup> cells was observed throughout the lungs of type I diabetic rats (Suppl Figures 4D-4F). Furthermore, nestin staining of endothelial cells persisted and smooth muscle α-actin and nestin co-expression was detected in a paucity of blood vessels in the lungs of type I diabetic rats (Suppl Figures 4D-4F). Nestin protein (Figures 4A & 4B) and

mRNA (Figure 4C) levels in the lungs of type I diabetic rats were significantly reduced as compared to non-diabetic rats, whereas smooth muscle  $\alpha$ -actin protein expression was unchanged (Figures 4A & 4B). A secondary pulmonary reactive fibrotic response was not prevalent in type I diabetic rats (Figure 4D). Thus, nestin depletion may have compromised the proliferative phenotype of fibroblasts in the lungs of type I diabetic rats and may explain in part the absence of a reactive fibrotic response during the early stage of the disease.

**Table 3 : Body, heart and lung weights of non-diabetic and STZ-injected rats**

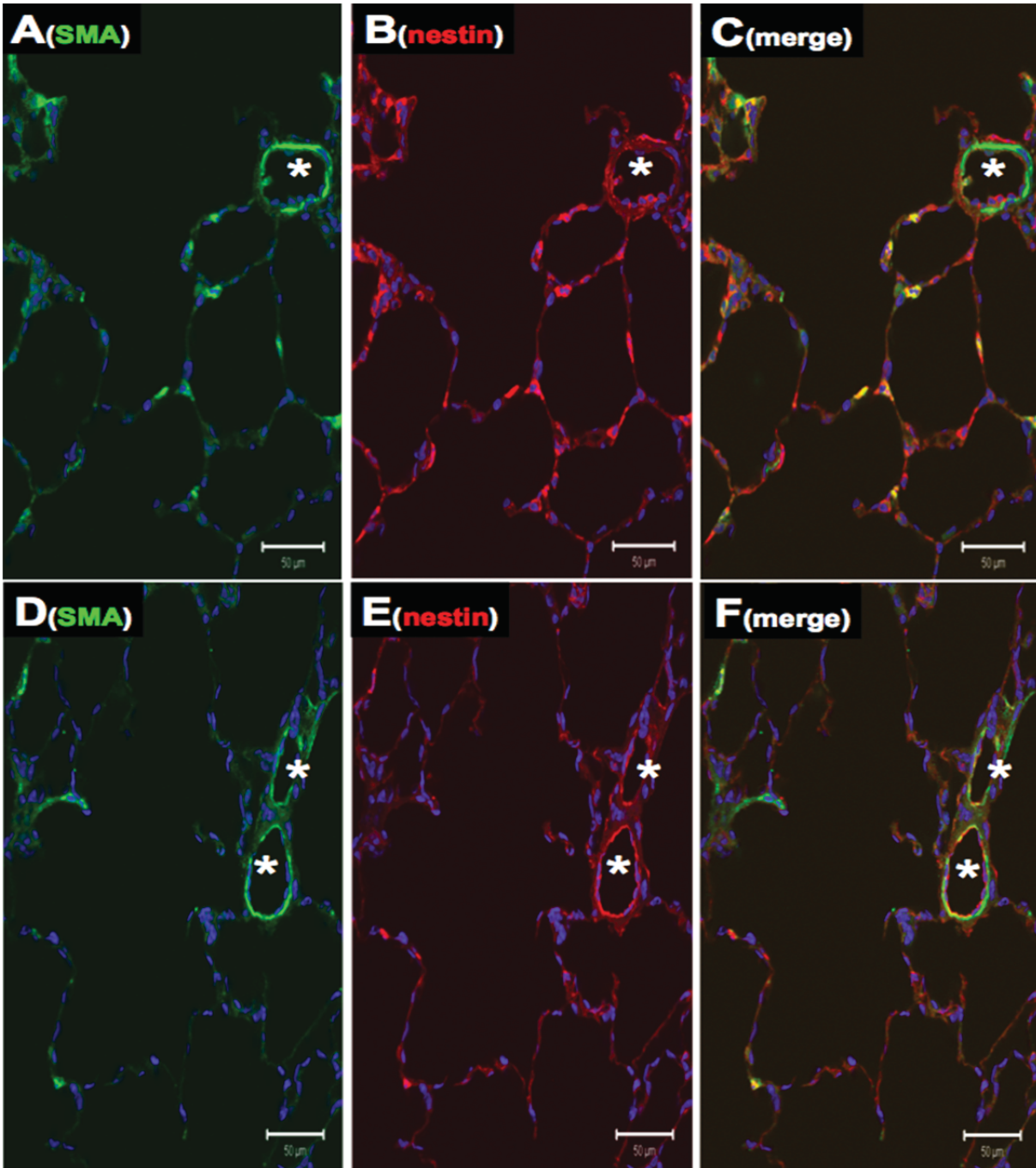
	<b>BW (gr)</b>	<b>LV/BW (mg/gr)</b>	<b>RV/BW (mg/gr)</b>	<b>P1/BW (mg/gr)</b>	<b>P2/BW (mg/gr)</b>	<b>Plasma glucose (mM)</b>
<b>ND (n=5-7)</b>	<b>301±11</b>	<b>1.68±0.04</b>	<b>0.54±0.05</b>	<b>0.575±0.054</b>	<b>0.655±0.056</b>	<b>8.1±1</b>
<b>STZ (n=6-8)</b>	<b>256±6 *</b>	<b>1.39±0.11 *</b>	<b>0.46±0.01</b>	<b>0.519±0.032</b>	<b>0.590±0.012</b>	<b>25±2 *</b>

STZ indicates streptozotocin; LV, left ventricle; RV, right ventricle; BW, body weight; P1, lung lobe 1; P2, lung lobe 2; data presented as mean±S.E.M., evaluated by a Student's unpaired t-test, (\*) represents  $p < 0.05$  versus non-diabetic (ND) and (*n*) number of rats examined.

**Table 4 : Left and right ventricular contractile function of non-diabetic and STZ-injected rats**

	<b>LVSP (mmHg)</b>	<b>LVEDP (mmHg)</b>	<b>LV+dP/dt (mmHg/sec)</b>	<b>LV-dP/dt (mmHg/sec)</b>	<b>RVSP (mmHg)</b>	<b>RV+dP/dt (mmHg/sec)</b>	<b>RV-dP/dt (mmHg/sec)</b>
<b>ND (n=7-8)</b>	<b>134±8</b>	<b>9±2</b>	<b>6548±201</b>	<b>5432±248</b>	<b>26±1</b>	<b>1201±56</b>	<b>852±54</b>
<b>STZ (n=7-8)</b>	<b>104±1 *</b>	<b>8±1</b>	<b>5784±108 *</b>	<b>3944±97 *</b>	<b>29±1</b>	<b>1170±90</b>	<b>776±52</b>

STZ indicates streptozotocin; LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure; LVSP, LV systolic pressure; LV + dP/dt, rate of LV contraction; LV - dP/dt, rate of LV relaxation; RVSP, right ventricular systolic pressure; RV + dP/dt, rate of RV contraction; LV - dP/dt, rate of RV relaxation. Data are presented as mean±S.E.M., evaluated by a Student's unpaired t-test, (\*) represents  $p < 0.05$  versus non-diabetic (ND) and (*n*) number of rats examined.

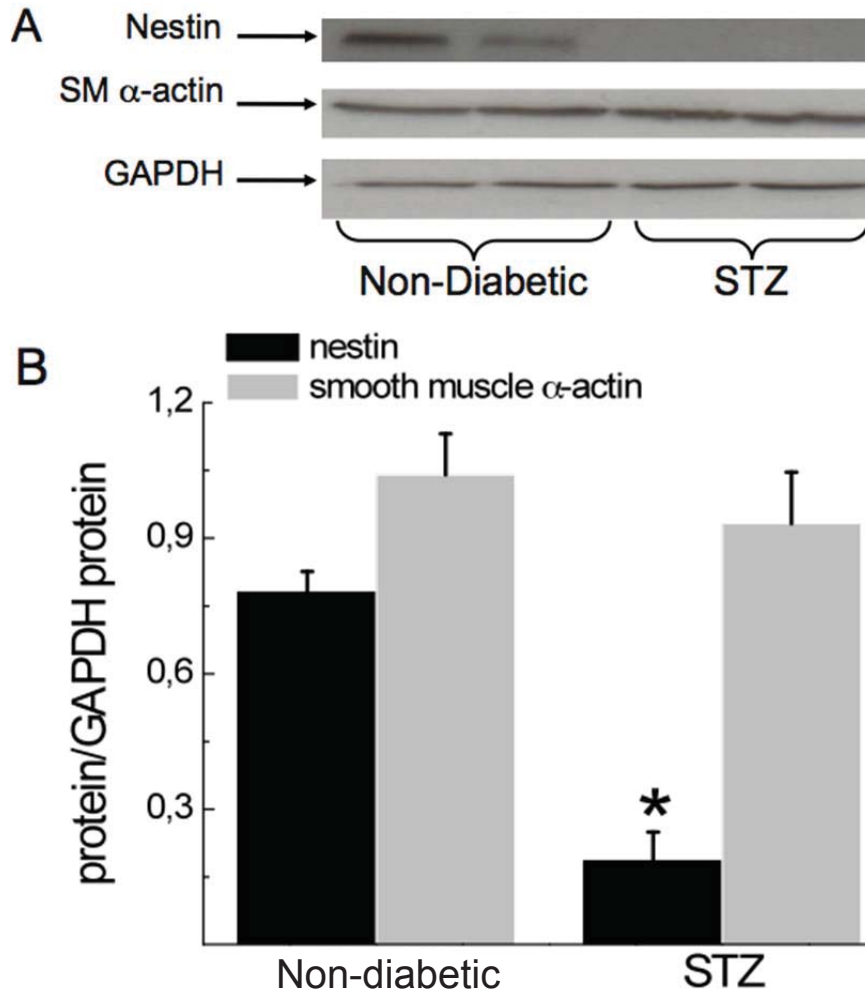


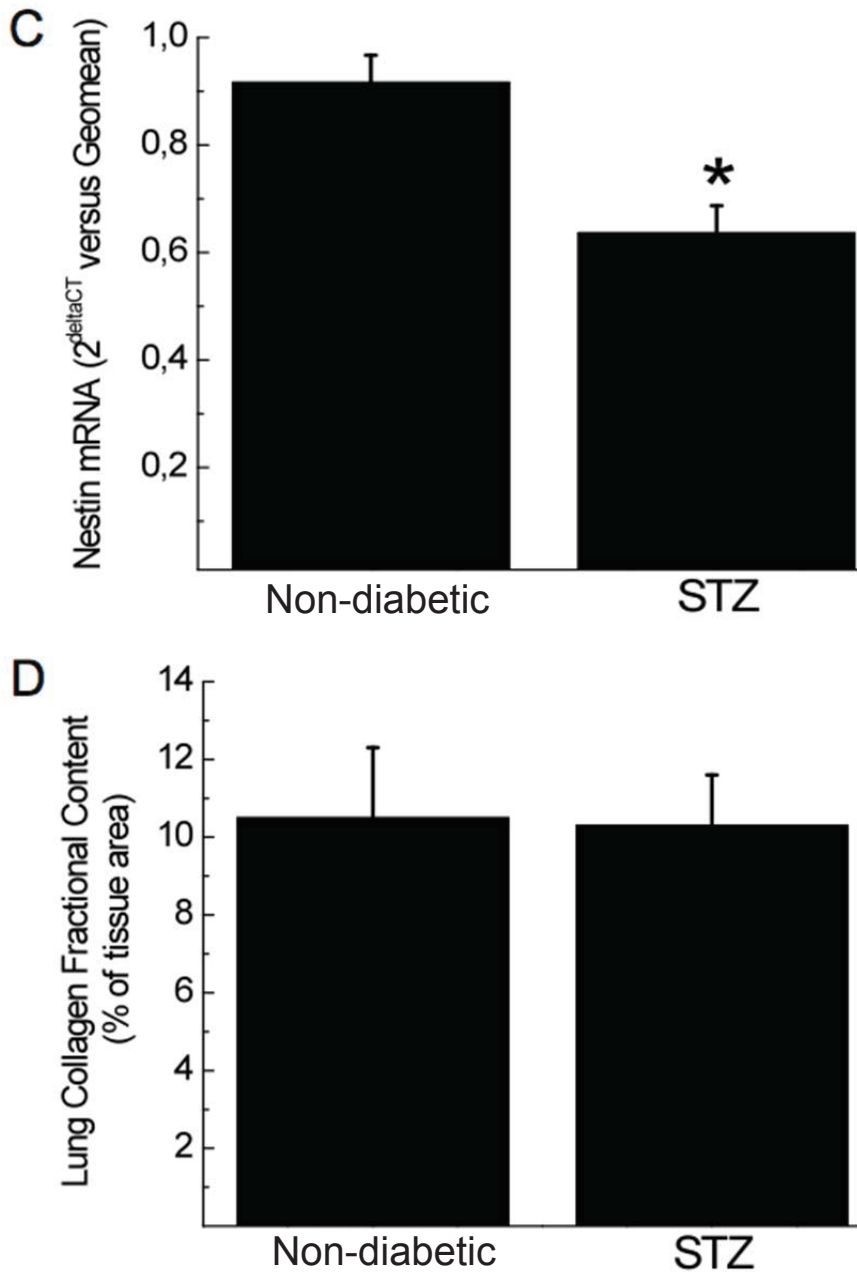
**Suppl Figure 4 : Type I diabetes reduces expression of Nestin<sup>(+)</sup> cells, but the staining persist in pulmonary vascular endothelial cells**

Smooth muscle  $\alpha$ -actin (SMA, **Panel A**; Scale 50  $\mu$ m, green fluorescence) and nestin (**Panel B**; Scale 50  $\mu$ m, red fluorescence) immunoreactive cells were detected in normal rat lungs. Nestin staining was also identified in endothelial cells (blood vessel indicated by asterisk), whereas immunoreactivity was not detected in smooth muscle  $\alpha$ -actin<sup>(+)</sup> vascular smooth muscle cells. (**Panels D-F**; Scale 50  $\mu$ m) In type I diabetic rats, nestin staining was diminished throughout the alveoli. In a modest number of blood vessels (indicated by asterisk), nestin and smooth muscle  $\alpha$ -

actin co-expression was observed and nestin staining of endothelial cells persisted. **Panels C and E** represent a merge of the fluorescent signals and the nucleus was identified by TO-PRO-3 staining (blue fluorescence).

**Figure 4**





**Figure 4 : Pulmonary remodeling of 1-week type I diabetic rats**

(Panels A & B) Nestin protein and (Panel C) mRNA expression were significantly reduced in streptozotocin (STZ) treated rats whereas smooth muscle  $\alpha$ -actin protein levels were unchanged. (\*) denotes  $p < 0.05$  versus non-diabetic rats. (Panel D) Interstitial collagen content in the lungs of type I diabetic rats was similar to non-diabetic rats.



### **miR-125b Expression During Postnatal Lung Development, Following Myocardial Infarction and in Type I Diabetic Rats**

A recent study reported that the 3'-UTR region of the nestin gene was recognized by miR-125b and overexpression in neural progenitor/stem cells downregulated mRNA levels (Cui *et al.* 2012). These data provided the impetus to examine the relationship between nestin and miR-125b during physiological and pathological lung remodeling. In neonatal rat lungs, nestin protein and mRNA levels were robustly expressed and a significant downregulation was observed during postnatal development, whereas smooth muscle  $\alpha$ -actin protein expression remained unchanged (Figures 5A & 5B). An identical paradigm was observed in the lungs of CD-1 mice as nestin protein expression was significantly reduced during postnatal development (neonatal,  $1.04 \pm 0.1$  ( $n=4$ ) versus adult,  $0.16 \pm 0.03$  ( $n=4$ );  $P < 0.01$  versus neonatal) whereas smooth muscle  $\alpha$ -actin protein content was non-significantly increased (neonatal,  $0.204 \pm 0.005$  ( $n=4$ ) versus adult,  $0.38 \pm 0.17$  ( $n=4$ )) (Figure 5A).

The miR-125b family consists of three members; miR-125b, miR-125b-1 and miR-125b-2 and miR-125b levels were the most abundant in neonatal and adult rat lungs (Figures 5C & 5D). The downregulation of nestin protein/mRNA levels (Figure 5C) during postnatal lung development was associated with a reciprocal upregulation of miR-125b, miR-125b-1 and miR-125b-2 levels (Figures 5D & 5E). Conversely, the increased expression of nestin protein/mRNA in the lungs of 1-week post-MI rats (Figure 2F) was associated with a reciprocal downregulation of miR-125b (Figure 5F), miR-125b-1 and miR-125b-2 levels (data not shown).

In the lungs of type I diabetic rats, nestin protein/mRNA downregulation was associated with a concomitant loss of miR-125b (Figure 5G), miR-125b-1 and miR-125b-2 expression (data not shown). The latter findings suggest that the miR-125b family did not target nestin in lung residing cells or the concomitant loss of nestin protein/mRNA and miR-125b expression represented a selective pathological response of type I diabetes. Thus, additional experiments were performed on 1<sup>st</sup> passage rat pulmonary fibroblasts to directly examine whether the observed upregulation of nestin in response to AII, FBS and TGF- $\beta$  was associated with a

concomitant downregulation of the miR-125b family. In pulmonary fibroblasts, miR-125b, miR-125b-1 and miR-125b-2 were detected and miR-125b levels the most abundant (Table 5). Following the 24 hr exposure of pulmonary fibroblasts to AII (1  $\mu$ M), TGF- $\beta_1$  (5 ng/ml) and TGF- $\beta_3$  (5 ng/ml), miR-125b, miR-125b-1 and miR-125b-2 levels were similar to non-stimulated cells (Table 5). Lastly, miR-125b or miR-125b-2 expression in pulmonary fibroblasts was unchanged in response to FBS (10%) whereas a significant upregulation of miR-125b-1 levels was observed (Table 5).

**Figure 5**

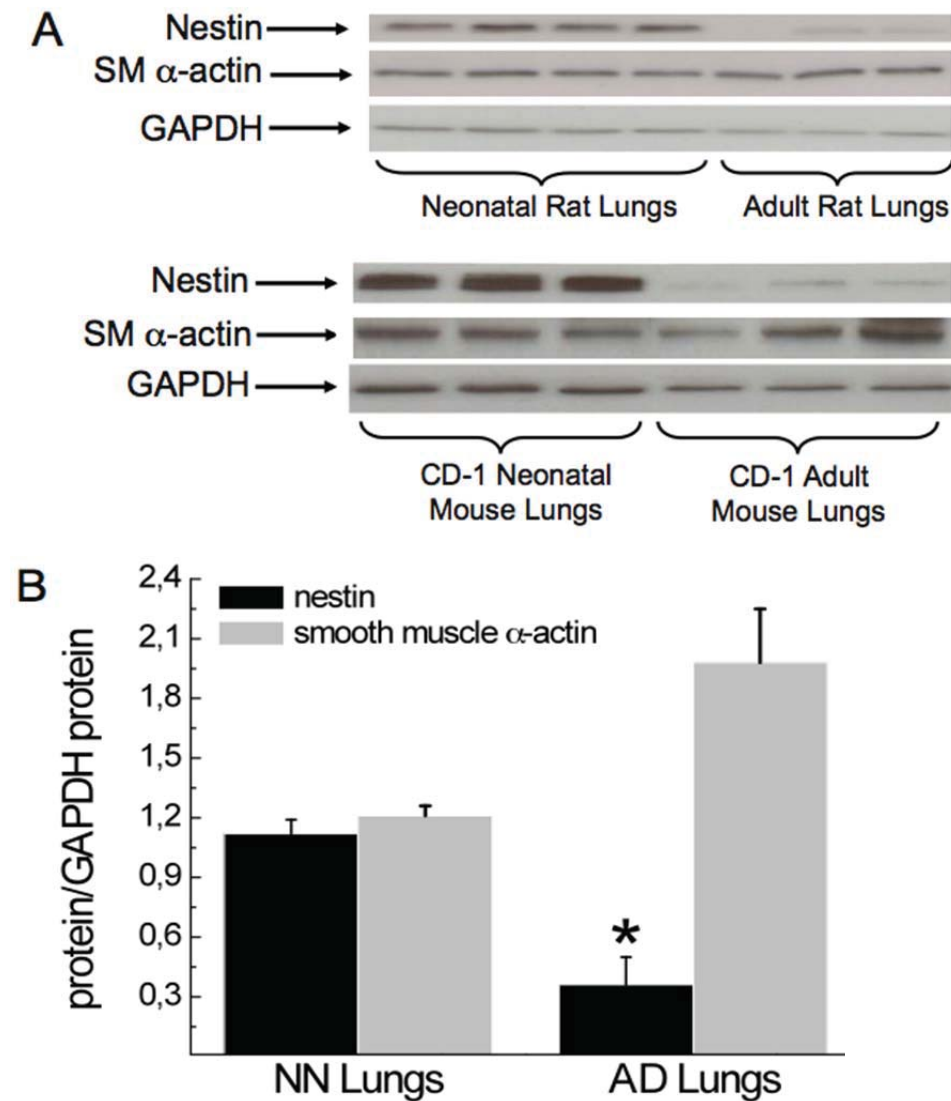
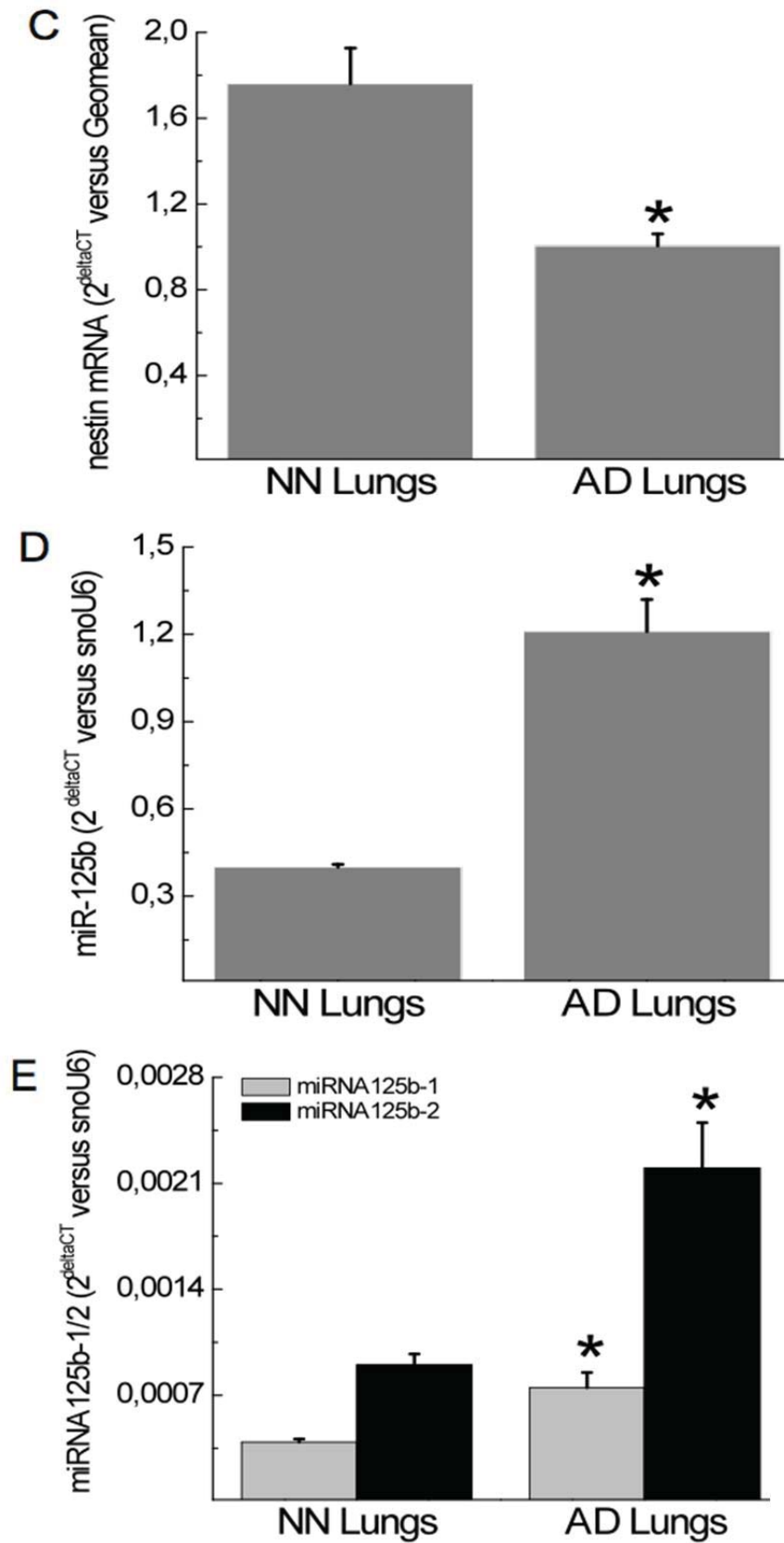
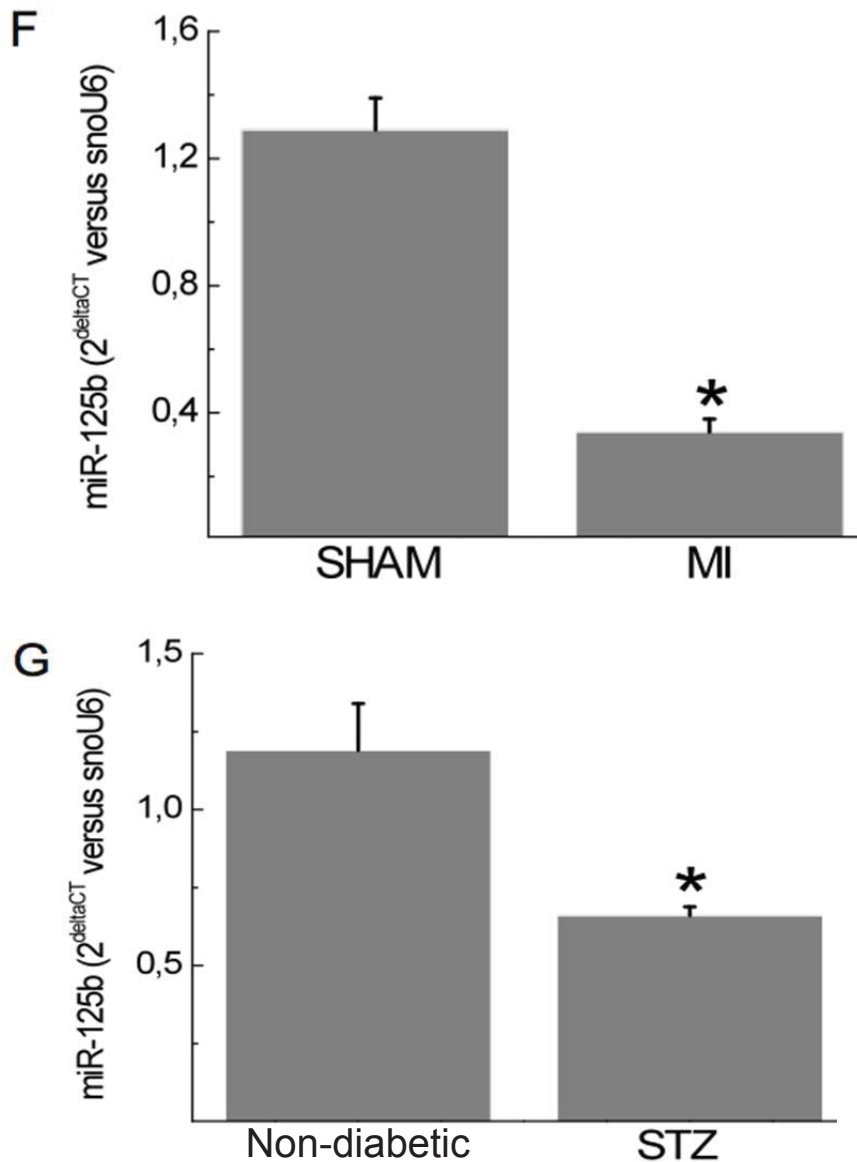


Figure 5 (suite)





**Figure 5 : Nestin and miR-125b expression during physiological and pathological lung remodeling**

(Panels A & B) Nestin protein and (Panel C) mRNA were downregulated during postnatal lung development in the rat and mouse, whereas smooth muscle  $\alpha$ -actin protein levels were unchanged. NN depicts neonatal rat; AD, adult rat, mRNA levels normalized to the geometric mean of HPRT/GAPDH mRNA and (\*) denotes  $P < 0.05$  versus sham. (Panels D & E) miR-125b, miR-125b-1 and miR-125b-2 levels were significantly elevated during postnatal lung development. (Panel F) In the lungs of 1-week post-MI rats and (Panel G) type I diabetic rats (STZ), miR-125b levels were significantly reduced as compared to non-diabetic rats. NN depicts neonatal rat, AD, adult rat, miR-125b, b-1 and b-2 expression was normalized to snoU6 and (\*) denotes  $p < 0.05$  versus sham or non-diabetic rats.

**Table 5 : Regulation of the miR-125b family in neonatal rat pulmonary fibroblasts following exposure to pro-fibrotic stimuli**

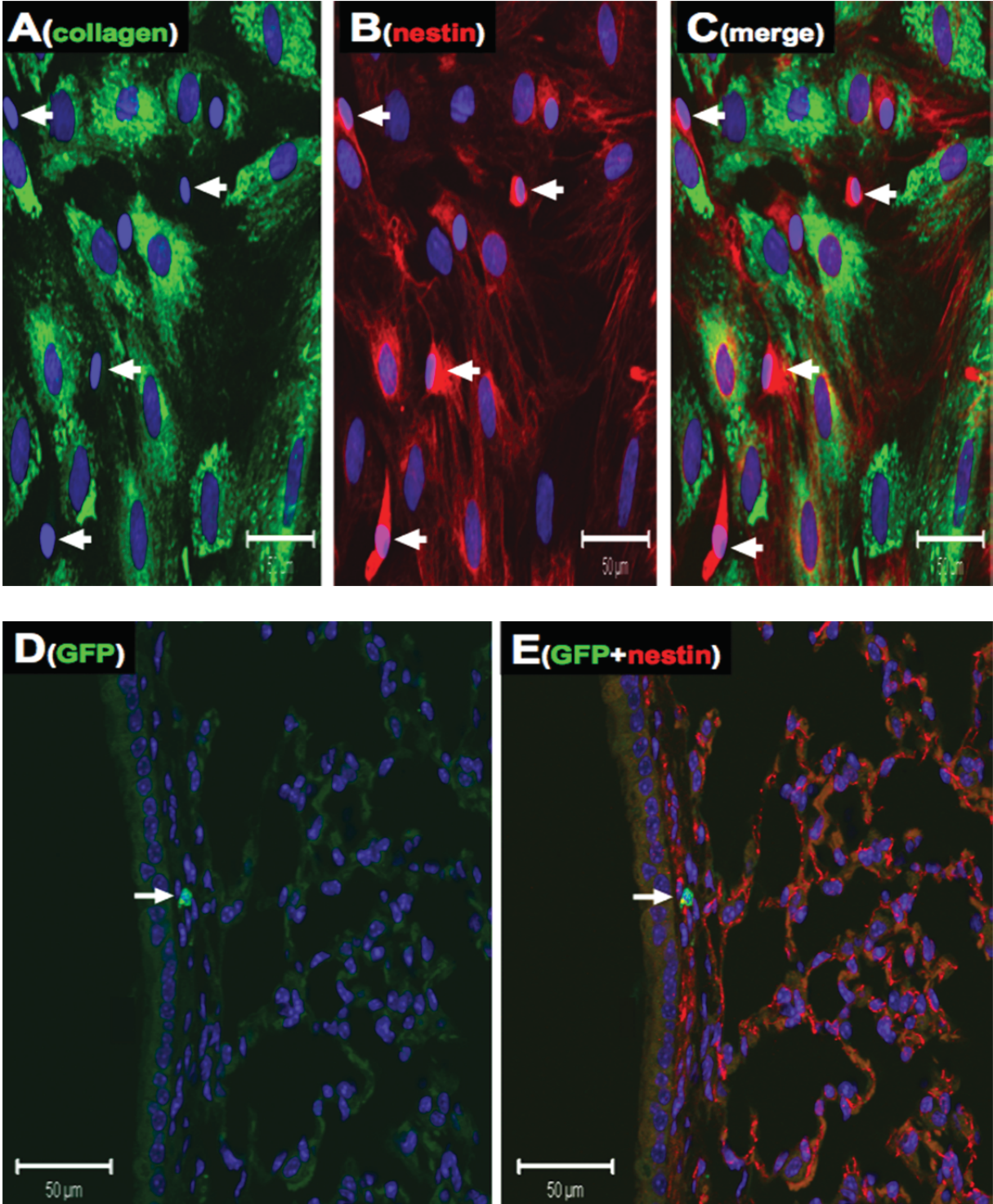
	<b>miR-125b/U6</b>	<b>miR-125b-1/U6</b>	<b>miR-125b-2/U6</b>
<b>Basal (n=3)</b>	<b>1.47±0.01</b>	<b>0.0013±0.0002</b>	<b>0.0023±0.00007</b>
<b>All (1 μM) (n=3)</b>	<b>1.62±0.08</b>	<b>0.0015±0.00008</b>	<b>0.0023±0.0002</b>
<b>TGF-β<sub>1</sub> (5 ng/ml) (n=3)</b>	<b>1.54±0.18</b>	<b>0.0019±0.0004</b>	<b>0.0022±0.0005</b>
<b>TGF-β<sub>3</sub> (5 ng/ml) (n=3)</b>	<b>1.44±0.25</b>	<b>0.0015±0.0002</b>	<b>0.0023±0.0003</b>
<b>FBS (10%) (n=3)</b>	<b>1.70±0.25</b>	<b>0.0026±0.0004 *</b>	<b>0.0020±0.0002</b>

Data are presented as mean±S.E.M and miRNA expression normalized to U6 and (\*) represents  $p < 0.05$  versus basal.

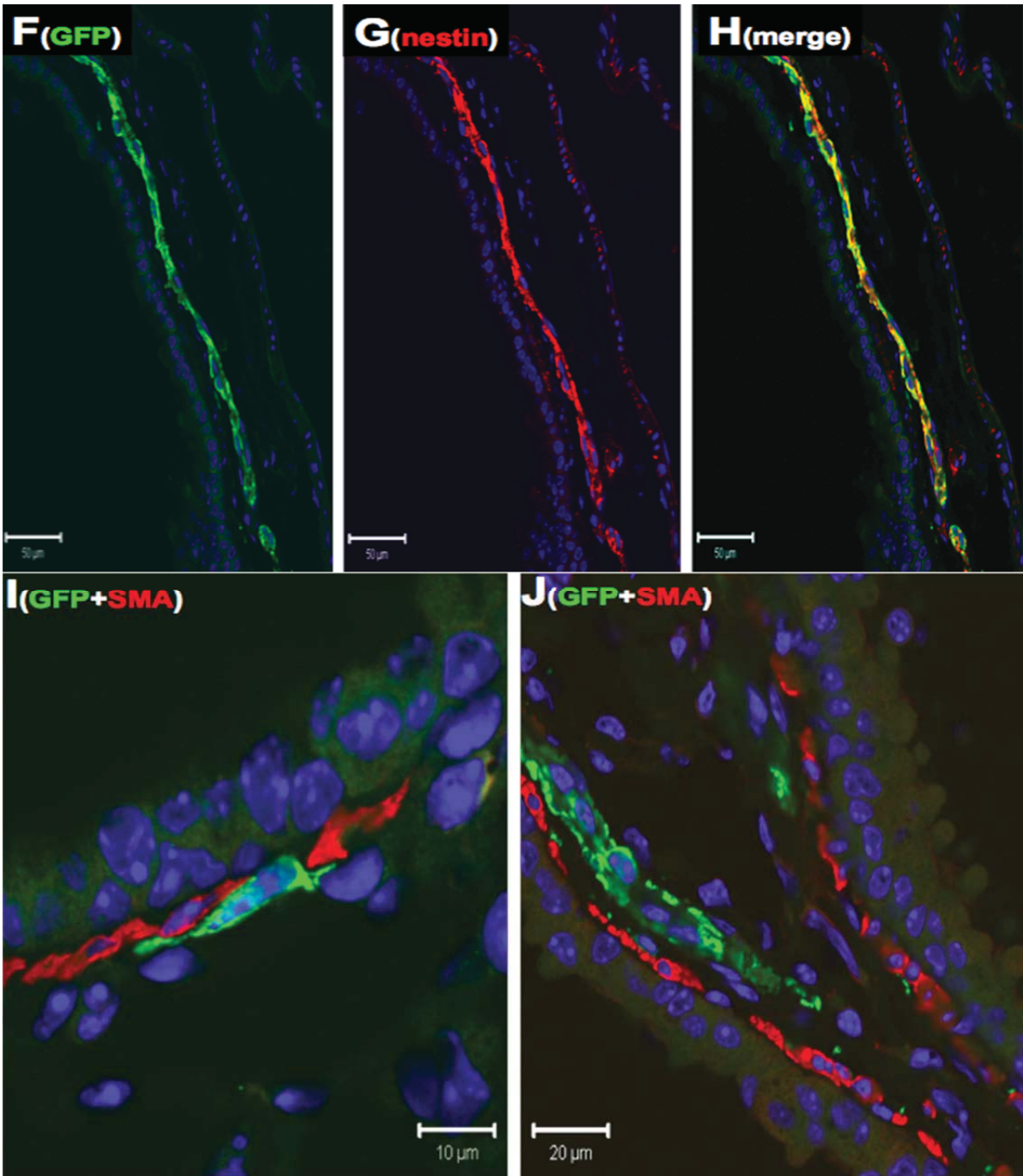
### **A Non-fibroblast Population of Nestin<sup>(+)</sup> Cells Identified in Rodent Lungs**

A modest number of rat lung-derived nestin<sup>(+)</sup> cells morphological distinct from pulmonary fibroblasts were detected during culturing and further characterized by the absence of collagen type I staining (Figures 6A-6C). To further examine the phenotype, a transgenic mouse in which the second intron of the nestin gene drives expression of the reporter gene green fluorescent protein (GFP) was employed (Mignone *et al.* 2004). In the lungs of normal adult transgenic mice ( $n=3$ ), nestin<sup>(+)</sup> cells were detected interspersed within the alveolar region and lining the bronchioles whereas staining of the intermediate filament protein was absent in columnar and bronchiolar cells (Figures 6D-6J). A paucity of GFP<sup>(+)</sup> cells that co-expressed nestin were detected in the lungs of normal transgenic mice (Figures 6D & 6E) whereas the reporter was not detected in blood vessels. One week following permanent coronary artery ligation of the heart, nestin<sup>(+)</sup>/GFP<sup>(+)</sup> cells in the lungs of myocardial infarcted transgenic mice ( $n=3$ ) persisted and the population apparently increased (Figures 6F-6H). GFP staining was not detected in smooth muscle  $\alpha$ -actin<sup>(+)</sup> myofibroblasts in the lungs of post-MI mice (Figures 6I & 6J). Collectively, these data demonstrate that rodent lungs contain a population of nestin-expressing cells phenotypically distinct from residing myofibroblasts.

Figure 6







**Figure 6 : Nestin<sup>(+)</sup> cells morphologically distinct from pulmonary fibroblasts were identified in rodent lungs**

(Panels A-C; Scale 50  $\mu$ m) Nestin<sup>(+)</sup> cells (red fluorescence; indicated by arrow) lacking collagen type I immunoreactivity (green fluorescence) were identified interspersed among nestin<sup>(+)</sup>/collagen<sup>(+)</sup> pulmonary fibroblasts. (Panels D & E; Scale 50  $\mu$ m) A paucity of nestin<sup>(+)</sup> cells (red fluorescence) that co-expressed green fluorescent protein (GFP; green fluorescence; indicated by arrow) were detected in normal transgenic mice in which the reporter was driven by the second intron of the nestin gene. (Panels F-H; Scale 50  $\mu$ m) In the lungs of 1-week post-MI

transgenic mice, the population of nestin<sup>(+)</sup>/GFP<sup>(+)</sup> cells was apparently increased and (**Panels I, Scale 10  $\mu$ m & J, Scale 20  $\mu$ m**) smooth muscle  $\alpha$ -actin (red fluorescence) staining was not detected in GFP<sup>(+)</sup> cells.

### 3.5 DISCUSSION

*In vivo* and *in vitro* data have revealed that adult rat lungs contained nestin<sup>(+)</sup> fibroblasts that expressed collagen type I and a subpopulation exhibited a myofibroblast phenotype denoted by the presence of smooth muscle  $\alpha$ -actin. However, the ubiquitous expression of smooth muscle  $\alpha$ -actin in cultured nestin<sup>(+)</sup> pulmonary fibroblasts was in stark contrast to that observed *in vivo*. Thus, the isolation and culturing of nestin<sup>(+)</sup> lung fibroblasts apparently promoted smooth muscle  $\alpha$ -actin expression. In the lungs of neonatal rats, nestin<sup>(+)</sup>/smooth muscle  $\alpha$ -actin<sup>(+)</sup> myofibroblasts were also detected and compared to adult lungs, a greater percentage was observed. In two distinct models of kidney injury, nestin was expressed in a subpopulation of smooth muscle  $\alpha$ -actin<sup>(+)</sup> myofibroblasts and correlated with the reactive fibrotic response (Sakairi *et al.*, 2007; Tomioka *et al.* 2010). However, despite the presence of a significant number of nestin<sup>(+)</sup>/smooth muscle  $\alpha$ -actin<sup>(+)</sup> myofibroblasts in neonatal rat lungs, the total content of interstitial collagen was negligible. Thus, nestin<sup>(+)</sup>/smooth muscle  $\alpha$ -actin<sup>(+)</sup> myofibroblasts residing in the lungs of neonatal rats were unable to acquire a secretory phenotype characterized by the uncontrolled synthesis/deposition of extracellular matrix proteins as reported during the reactive fibrotic response of damaged tissue.

Rats with large infarcts developed pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy and lung remodeling was further characterized by an increase in alveolar septum thickness and a prominent reactive fibrotic response (Jasmin *et al.* 2003; Nguyen *et al.* 2003). The present study has expanded on these initial findings and observed that a reactive fibrotic response was prevalent in the lungs during the acute phase following infarction of the rat heart in the absence of pulmonary hypertension. Furthermore, the concomitant increase of nestin protein/mRNA levels represented an early marker of pathological pulmonary remodeling secondary to myocardial infarction. By contrast, the reactive fibrotic response in the lungs of

myocardial infarcted rats without established pulmonary hypertension was not associated with the upregulation of smooth muscle  $\alpha$ -actin or the increased appearance of a subpopulation of nestin<sup>(+)</sup>/smooth muscle  $\alpha$ -actin<sup>(+)</sup> myofibroblasts. The increased expression of nestin in the lungs of post-MI rats may have occurred in part in pulmonary fibroblasts as exposure to angiotensin II, TGF- $\beta_1$  and TGF- $\beta_3$  significantly increased expression of the intermediate filament protein (Abbate *et al.* 2002; Hardie *et al.* 2009; Hinz *et al.* 2012; Jasmin *et al.* 2003; Nguyen *et al.* 2003). Therefore, based on its established proliferative role (Aihara *et al.* 2004; Béguin *et al.* 2012; Huang *et al.* 2009; Xue *et al.* 2010), nestin upregulation in pulmonary fibroblasts by pro-fibrotic stimuli may have directly contributed to the inception of the reactive fibrotic response in the lungs of post-MI rats (Sakairi *et al.* 2007; Tomioka *et al.* 2010).

Reparative angiogenesis during wound healing was characterized by the induction of nestin in endothelial and vascular smooth muscle cells of newly formed blood vessels (Aihara *et al.* 2004; Mokry *et al.* 2004; Oikawa *et al.* 2010). In the lungs of myocardial infarcted rats, nestin immunoreactivity in smooth muscle  $\alpha$ -actin<sup>(+)</sup> vascular smooth muscle cells was detected in a paucity of blood vessels. An analogous paradigm was observed in patients that succumbed to heart failure as nestin and smooth muscle  $\alpha$ -actin co-expression was identified in vascular smooth muscle cells and nestin staining of endothelial cells was also detected in blood vessels in the lungs of heart failure patients. Although, biopsies of normal human lungs were not examined, these findings were consistent with previous studies suggesting that the appearance of nestin in vascular smooth muscle and endothelial cells in the lungs of heart failure patients was indicative of vascular remodeling associated with an angiogenic response (Aihara *et al.* 2004; Mokry *et al.* 2004; Oikawa *et al.* 2010). Non-vascular nestin immunoreactive cells were likewise detected in human lungs and the preponderance lacked smooth muscle  $\alpha$ -actin staining. Based on the findings obtained from rat lungs, a subpopulation of nestin<sup>(+)</sup> cells detected in the lungs of heart failure patients may represent pulmonary fibroblasts.

Pulmonary dysfunction represents a secondary complication of diabetic patients characterized by alveolar thickening and reactive fibrosis and the paradigm was recapitulated in the lungs of two rodent models of type I diabetes (Schnack *et al.* 1996; van den Borst *et al.* 2010; van Gent *et al.* 2002; Vracko *et al.* 1979; Yang *et al.* 2011). In the present study, streptozotocin-induced type I diabetes did not lead to a pulmonary reactive fibrotic response during the early stage of the disease but was characterized by a significant downregulation of nestin mRNA/protein levels. Immunofluorescence revealed that nestin staining was markedly diminished throughout the lungs suggesting that loss of the intermediate filament protein occurred at least in part in pulmonary fibroblasts. Previous studies from our lab reported that nestin downregulation in cardiac resident neural progenitor/stem cells in type I diabetic rats was not secondary to a diminished population (El-Helou *et al.*, 2009). Therefore, during the early phase of type I diabetes, the decreased expression of nestin in the lungs of type I diabetic rats may not be attributed to a reduction of the fibroblast population. Thus, the absence of a pulmonary reactive fibrotic response in type I diabetic rats may be related in part to a compromised growth response of nestin-depleted fibroblasts (Aihara *et al.* 2004; Béguin *et al.* 2012; Huang *et al.* 2009; Sakairi *et al.* 2007; Tomioka *et al.*; Xue *et al.* 2010).

As previously observed in the heart (Béguin *et al.* 2012), a significant downregulation of nestin protein/mRNA levels was detected during postnatal lung development in rodents whereas smooth muscle  $\alpha$ -actin protein expression was unchanged. A recent study reported that miR-125b targeted the 3'-UTR region of the nestin gene promoting mRNA destabilization and postnatal development of the mouse heart was associated with the upregulation of miR-125b (Cui *et al.* 2012; Porrello *et al.* 2011). During postnatal lung development and in the lungs of post-MI rats, a reciprocal regulation of nestin protein/mRNA levels and miR-125b expression was observed. By contrast, a concomitant loss of nestin protein/mRNA and miR-125b expression was detected in the lungs of streptozotocin-induced type I diabetic rats. The latter findings suggested that miR-125b may not target the nestin gene in lung residing cells or the loss of miR-125b and nestin expression was selective to type I diabetes. Despite nestin upregulation in pulmonary fibroblasts exposed to AII, TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_3$  and FBS, miR-125b expression remained unchanged. These data suggest that miR-125b did not directly target the

nestin gene in rat lung fibroblasts. Nonetheless, the disparate pattern of miR-125b expression during postnatal lung development and in various disease models supports a potential role in physiological and pathological pulmonary remodeling. Indeed, targets of miR-125b other than nestin have been identified and these mRNAs coded for proteins directly implicated in cell proliferation and apoptosis (Le *et al.* 2009; Sun *et al.* 2013; Zhao *et al.* 2012).

During the *in vitro* expansion of pulmonary derived cells, nestin<sup>(+)</sup> cells morphologically distinct from lung fibroblasts were detected and further characterized by the absence of collagen type I staining. The phenotype of nestin<sup>(+)</sup> cells has been extensively examined in a transgenic model in which the second intron of the nestin gene drives expression of the reporter green fluorescent protein (Mignone *et al.* 2004). The transgenic model originally identified a population of nestin<sup>(+)</sup> neural progenitor/stem cells in the brain and subsequent studies reported the presence of nestin<sup>(+)</sup>/GFP<sup>(+)</sup> cells in the skin, heart and skeletal muscle (Amoh *et al.* 2004; Birbrair *et al.* 2011; El-Helou *et al.* 2013; Mignone *et al.* 2004). In the lungs of normal transgenic mice, a paucity of nestin<sup>(+)</sup>/GFP<sup>(+)</sup> cells were detected in the alveoli and lining the bronchioles. In the lungs of myocardial infarcted mice, an increase in the population of nestin<sup>(+)</sup>/GFP<sup>(+)</sup> cells was evident. By contrast, GFP staining was not detected in smooth muscle  $\alpha$ -actin<sup>(+)</sup> cells, suggesting that nestin expression in myofibroblasts was driven by intron 1 or 3 (Aihara *et al.* 2004; Zimmerman *et al.* 1994). The apparent increase in the number of intron 2 driven nestin<sup>(+)</sup> cells may have significantly contributed in part to the observed upregulation of the intermediate filament protein in the lungs of myocardial infarcted rats. Lastly, previous studies have reported that nestin<sup>(+)</sup>/GFP<sup>(+)</sup> cells differentiated to a vascular cell following injury and an analogous role may also be prevalent during pulmonary remodeling after damage (Amoh *et al.* 2004; El-Helou *et al.* 2013).

### 3.6 CONCLUSION

The present study has demonstrated that the disparate regulation of nestin rather than smooth muscle  $\alpha$ -actin characterized the early pattern of pulmonary remodeling secondary to myocardial infarction and type I diabetes. In the lungs of post-MI rats, a reactive fibrotic response was associated with the upregulation of nestin despite the absence of pulmonary hypertension. Nestin upregulation in pulmonary fibroblasts following exposure to pro-fibrotic stimuli supports the premise that the intermediate filament protein may have facilitated in part the reactive fibrotic response. Nestin<sup>(+)</sup> cells lacking smooth muscle  $\alpha$ -actin immunoreactivity were likewise identified in the lung of patients that succumbed to heart failure and may represent a subpopulation of pulmonary fibroblasts. Lastly, a distinct population of nestin<sup>(+)</sup> cells lacking smooth muscle  $\alpha$ -actin/collagen staining was detected in rodent lungs and a transgenic approach revealed that expression of the intermediate filament protein was driven by the second intron of the nestin gene. Additional studies are required to ascertain the phenotype and biological role of intron 2 driven nestin<sup>(+)</sup> cells following injury and determine whether an analogous population exists in human lungs.

### ACKNOWLEDGMENT

I would like to thank Grigori Enikolopov and Natacha Duquette for the invaluable assistance.

### 3.7 REFERENCES

- Abbate M, Zoja C, Rottoli D, Corna D, Tomasoni S, & Remuzzi G (2002). Proximal tubular cells promote fibrogenesis by TGF-beta1-mediated induction of peritubular myofibroblasts. *Kidney Int* 61, 2066-2077.
- Abramson SV, Burke JF, Kelly JJ Jr, Kitchen JG 3rd, Dougherty MJ, Yih DF, McGeehin FC 3rd, Shuck JW & Phiambolis TP (1992). Pulmonary hypertension predicts mortality and morbidity in patients with dilated cardiomyopathy. *Ann Intern Med* 116, 888-895.
- Aihara M, Sugawara K, Torii S, Hosaka M, Kurihara H, Saito N & Takeuchi T (2004). Angiogenic endothelium-specific nestin expression is enhanced by the first intron of the nestin gene. *Lab Invest* 84, 1581-1592.



- Amoh Y, Li L, Yang M, Moossa AR, Katsuoka K, Penman S & Hoffman RM (2004). Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair-follicle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 13291-13295.
- Béguin P, Gosselin H, Mamarbachi M & Calderone A (2012). Nestin expression is lost in ventricular fibroblasts during postnatal development of the rat heart and re-expressed in scar myofibroblasts. *J Cell Physiol* 227, 813-820.
- Birbrair A, Wang ZM, Messi ML, Enikolopov GN & Delbono O (2011). Nestin-GFP transgene reveals neural precursor cells in adult skeletal muscle. *PLoS One* 3, 6.
- Cui Y, Xiao Z, Han J, Sun J, Ding W, Zhao Y, Chen B, Li X & Dai J (2012). MiR-125b orchestrates cell proliferation, differentiation and migration in neural stem/progenitor cells by targeting nestin. *BMC Neuroscience* 13, 116.
- El-Helou V, Béguin PC, Assimakopoulos J, Clement R, Gosselin H, Brugada R, Aumont A, Biernaskie J, Villeneuve L, Leung TK, Fernandes KJ & Calderone A (2008). The rat heart contains a neural stem cell population; role in sympathetic sprouting and angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 45, 694-702.
- El-Helou V, Chabot A, Gosselin H, Villeneuve L, Clavet-Lanthier ME, Tanguay JF, Enikolopov G, Fernandes KJ, Jasmin JF & Calderone A (2013). Cardiac resident nestin<sup>+</sup> cells participate in reparative vascularisation. *J Cell Physiol* 228, 1844-1853.
- El-Helou V, Proulx C, Assimakopoulos J, Béguin P, Gosselin H, Clement R, Villeneuve L, Huot-Marchand JÉ; Deblois D, Lajoie C & Calderone A (2009). The cardiac neural stem cell phenotype is compromised in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *J Cell Physiol* 220, 440-449.
- Ghio S, Gavazzi A, Campana C, Inserra C, Klersy C, Sebastiani R, Arbustini E, Recusani F & Tavazzi L (2001). Independent and additive prognostic value of right ventricular systolic function and pulmonary artery pressure in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 37, 183-188.
- Hardie WD, Glasser SW & Hagood JS (2009). Emerging concepts in the pathogenesis of lung fibrosis. *Am J Pathol* 175, 3-16.
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmouliere A, Varga J, De Wever O, Mareel M & Gabbiani G (2012). Recent developments in myofibroblast biology. *Am J Pathol* 180, 1340-1355.
- Huang W, Kingsbury MP, Turner MA, Donnelly JL, Flores NA & Sheridan DJ (2001). Capillary filtration is reduced in lungs adapted to chronic heart failure: morphological and haemodynamic correlates. *Cardiovasc Res* 49, 207-217.
- Huang YL, Shi GY, Lee H, Jiang M, Huang BM, Wu HL & Yang HY (2009). Thrombin induces nestin expression via the transactivation of EGFR signalling in rat vascular smooth muscle cells. *Cell Signal* 21, 954-968.
- Ishiwata T, Matsuda Y & Naito Z (2011). Nestin in gastrointestinal and other cancers: effects on cells and tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol* 17, 409-418.

- Jasmin JF, Calderone A, Leung TK, Villeneuve L & Dupuis J (2003). Lung structural remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: complete reversal with irbesartan. *Cardiovasc Res* 58, 621-631.
- Kapanci Y, Burgan S, Pietra GG, Conne B & Gabbiani G (1990). Modulation of actin isoform expression in alveolar myofibroblasts (contractile interstitial cells) during pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 136, 881-889.
- Kingsbury MP, Huang W, Donnelly JL, Jackson E, Needham E, Turner MA & Sheridan DJ (2003). Structural remodelling of lungs in chronic heart failure. *Basic Res Cardiol* 98, 295-303.
- Le MT, Teh C, Shyh-Chang N, Xie H, Zhou B, Korzh V, Lodish HF & Lim B (2009). MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev* 23, 862-876.
- Lendahl U, Zimmerman LB & McKay RD (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 23, 585-595.
- Mignone JL, Kukekov V, Chiang A, Steindler D & Enikolopov G (2004). Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice. *J Comp Neurol* 469, 311-324.
- Mokry J, Cizková D, Filip S, Ehrmann J, Österreicher J, Kolár Z & English D (2004). Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells Dev* 13, 658-664.
- Nguyen QT, Colombo F, Clement R, Rouleau JL & Calderone A (2003). AT1 receptor antagonist therapy preferentially ameliorated right ventricular function and phenotype during the early phase of remodeling post-MI. *Br J Pharmacol* 138, 1485-1494.
- Oikawa H, Hayashi K, Maesawa C, Masuda T & Sobue K (2010). Expression profiles of nestin in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Exp Cell Res* 316, 940-950.
- Porrello ER, Johnson BA, Aurora AB, Simpson E, Nam YJ, Matkovich SJ, Dorn GW, van Rooij E & Olson EN (2011). MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes. *Circ Res* 109, 670-679.
- Sakairi T, Hiromura K, Yamashita S, Takeuchi S, Tomioka M, Ideura H, Maeshima A, Kaneko Y, Kuroiwa T, Nangaku M, Takeuchi T & Nojima Y (2007). Nestin expression in the kidney with an obstructed ureter. *Kidney Int* 72, 307-318.
- Schnack C, Festa A, Schwarzmaier-D'Assie A, Haber P & Scherthaner G (1996). Pulmonary dysfunction in type 1 diabetes in relation to metabolic long-term control and to incipient diabetic nephropathy. *Nephron* 74, 395-400.
- Sejersen T & Lendahl U (1993). Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. *J Cell Sci* 106, 1291-1300.
- Sun YM, Lin KY & Chen YQ (2013). Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. *J Hematol Oncol* 6, 6.
- Tomioka M, Hiromura K, Sakairi IT, Takeuchi S, Maeshima A, Kaneko Y, Kuroiwa T, Takeuchi T & Nojima Y (2010). Nestin is a novel marker for renal tubulointerstitial injury in immunoglobulin A nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 15, 568-574.

- van den Borst B, Gosker HR, Zeegers MP & Schols AM (2010). Pulmonary function in diabetes: a metaanalysis. *Chest* 138, 393-406.
- van Gent R, Brackel HJ, de Vroede M & van der Ent CK (2002). Lung function abnormalities in children with type I diabetes. *Respir Med* 96, 976-978.
- Vracko R, Thorning D & Huang TW (1979). Basal lamina of alveolar epithelium and capillaries: quantitative changes with aging and in diabetes mellitus. *Am Rev Respir Dis* 120, 973-983.
- Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR & Wobus AM (2004). Nestin expression-a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* 61, 2510-2522.
- Xue XJ & Yuan XJ (2010). Nestin is essential for mitogen-stimulated proliferation of neural progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 45, 26-36.
- Yang J, Tan Y, Zhao F, Ma Z, Wang Y, Zheng S, Epstein PN, Yu J, Yin X, Zheng Y, Li X, Miao L & Cai L (2011). Angiotensin II plays a critical role in diabetic pulmonary fibrosis most likely via activation of NADPH oxidase-mediated nitrosative damage. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301, E132-E144.
- Zhao A, Zeng Q, Xie X, Zhou J, Yue W, Li Y & Pei X (2012). MicroRNA-125b induces cancer cell apoptosis through suppression of Bcl-2 expression. *J Genet Genomics* 39, 29-35.
- Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, Cunningham M, McKay R, Gavin B, Mann J, Vassileva G & McMahon A (1994). Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* 12, 11-24.

**CHAPITRE 4 : LA TRANSITION DES CELLULES  
ENDOTHÉLIALES ET ÉPITHÉLIALES À UN  
PHÉNOTYPE MÉSENCHYMATEUX A ÉTÉ  
DÉLIMITÉE PAR L'EXPRESSION DE LA NESTINE**

# Endothelial and Epithelial Cell Transition to a Mesenchymal Phenotype Was Delineated by Nestin Expression

ANDRÉANNE CHABOT,<sup>1,2</sup> VANESSA HERTIG,<sup>1,2</sup> ELENA BOSCHER,<sup>1</sup>  
QUANG TRINH NGUYEN,<sup>1</sup> BENOÎT BOIVIN,<sup>1,3,4</sup> JASMINE CHEBLI,<sup>5</sup> LYSE BISSONNETTE,<sup>6</sup>  
LOUIS VILLENEUVE,<sup>1</sup> EMMANUELLE BROCHIERO,<sup>5</sup> JOCELYN DUPUIS,<sup>1,4</sup>  
AND ANGELINO CALDERONE<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Montreal Heart Institute, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup>Département de Physiologie Moléculaire et Intégrative, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>3</sup>Département de Biochimie et, Montréal, Québec, Canada

<sup>4</sup>Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>5</sup>CRCHUM, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>6</sup>Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, Département de Médecine, Université Laval, Québec, Canada

Conflicts of interest: The authors declare no conflict of interest.

\*Correspondence to: Angelino Calderone, Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec, HIT 1C8, Canada.

E-mail: [angelo.calderone@umontreal.ca](mailto:angelo.calderone@umontreal.ca)

Manuscript Received: 17 September 2015

Manuscript Accepted: 16 November 2015

Accepted manuscript online in Wiley Online Library  
([wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)): 00 Month 2015.

DOI: 10.1002/jcp.25257

**Running title:** Nestin and Pulmonary Mesenchymal Cells

**Keywords:** Nestin • pulmonary fibroblasts • endothelial/epithelial mesenchymal-transition

## 4.1 ABSTRACT

Endothelial and epithelial cell transition to a mesenchymal phenotype was identified as cellular paradigms implicated in the appearance of fibroblasts and development of reactive fibrosis in interstitial lung disease. The intermediate filament protein nestin was highly expressed in fibrotic tissue, detected in fibroblasts and participated in proliferation and migration. The present study tested the hypothesis that the transition of endothelial and epithelial cells to a mesenchymal phenotype was delineated by nestin expression. Three weeks following hypobaric hypoxia, adult male Sprague-Dawley rats characterized by alveolar and perivascular lung fibrosis were associated with increased nestin protein and mRNA levels and marked appearance of nestin/collagen type I<sup>(+)</sup>-fibroblasts. In the perivascular region of hypobaric hypoxic rats, displaced CD31<sup>(+)</sup>-endothelial cells were detected, exhibited a mesenchymal phenotype and co-expressed nestin. Likewise, epithelial cells in the lungs of hypobaric hypoxic rats transitioned to a mesenchymal phenotype distinguished by the co-expression of E-cadherin and collagen. Following the removal of FBS from primary passage rat alveolar epithelial cells, TGF- $\beta_1$  was detected in the media and a subpopulation acquired a mesenchymal phenotype characterized by E-cadherin downregulation and concomitant induction of collagen and nestin. Bone morphogenic protein-7 treatment of alveolar epithelial cells prevented E-cadherin downregulation, suppressed collagen induction but partially inhibited nestin expression. These data support the premise that the transition of endothelial and epithelial cells to a mesenchymal cell may have contributed in part to the appearance nestin/collagen type I<sup>(+)</sup>-fibroblasts and the reactive fibrotic response in the lungs of hypobaric hypoxic rats.

## 4.2 BACKGROUND

Interstitial lung disease encompasses a wide range of acute and chronic pulmonary disorders that lead to moderate or severe abnormalities in respiratory mechanics and gas exchange properties (Raghu & Brown, 2004; Chartrand & Fisher 2015). The uncontrolled synthesis and deposition of extracellular matrix proteins represents a pathological consequence of interstitial lung disease exacerbating compromised pulmonary function (Raghu & Brown,



2004; Hardie et al. 2009). Activated fibroblasts denoted as myofibroblasts were identified as the seminal population implicated in the reactive and reparative fibrotic response of damaged tissue characterized by the expression of the stress filament protein smooth muscle  $\alpha$ -actin and enhanced collagen synthesis (Beguin et al. 2012; Hardie et al. 2009; Jasmin 2003; Hinz 2012). Resistance to cellular apoptosis was further identified as a phenotype of pulmonary myofibroblasts implicated in reactive fibrosis (Hardie et al. 2009). A prevailing issue of interstitial lung disease was the origin of myofibroblasts (Hardie et al. 2009). Resident stromal cells were identified as an important source of activated myofibroblasts in fibrotic tissue including the lungs (Humphreys et al. 2010; Rock et al. 2011). An *in vivo* lineage tracing approach complemented by *in vitro* experiments further revealed that a subpopulation of alveolar type II epithelial cells under the influence of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) underwent differentiation to collagen-producing fibroblasts in a process denoted as Type II epithelial mesenchymal-transition (EMT) (Kage & Borok 2012; Yang et al. 2013; Pain et al. 2014). Akin to epithelial cells, endothelial cells were also shown to differentiate to a fibroblast phenotype during pathological remodeling in a process identified as Type II endothelial mesenchymal-transition (EndMT) (Hashimoto et al. 2010; Piera-Velazquez et al. 2011). Collectively, these observations suggest that resident stromal cells, epithelial and endothelial cells may collectively contribute to the appearance of myofibroblasts but their recruitment and relative importance in the progression of pulmonary fibrosis may be directly influenced by the nature and severity of the underlying disease.

Work from our lab has recently reported that a subpopulation of fibroblasts in the scar and lungs of the infarcted rat heart was characterized by the induction of the intermediate filament protein nestin (Beguin et al. 2012; Chabot et al. 2015). An analogous paradigm was observed following renal injury as the reactive fibrotic response was associated with the increased expression of nestin and appearance of nestin<sup>(+)</sup>-fibroblasts (Sakairi et al. 2007; Tomioka et al. 2010). Furthermore, the magnitude of the reactive fibrotic response in the injured kidney correlated with the density of the nestin<sup>(+)</sup>-interstitial cells (Sakairi et al. 2007). These observations were consistent with the established proliferative and migratory role of nestin thereby providing fibroblasts the optimal phenotype to initiate a rapid and robust reactive fibrotic response (Beguin et al. 2012; Ishiwata et al. 2011; Su et al. 2013; Zhao et al.

2014). Several studies have reported that nestin expression in renal- and lung-derived resident stromal cells was upregulated following exposure to TGF- $\beta$  (Sakairi et al. 2007; Chabot et al. 2015). Nestin was also induced during Type III EMT and implicated in the acquisition of a proliferative and metastatic phenotype (Ishiwata et al. 2011; Hagio et al. 2013; Matsuda et al. 2014). Thus, it is tempting to speculate that one or more of the identified paradigms implicated in the appearance of pulmonary fibroblasts may be characterized by nestin expression. Therefore, the present study tested the hypothesis that nestin was expressed during the transition of endothelial and epithelial cells to a mesenchymal phenotype and further increased in resident pulmonary stromal cells in response to profibrotic peptide growth factors.

### **4.3 MATERIALS AND METHODS**

#### **Ethics Approval**

The use and care of laboratory rats was according to the Canadian Council for Animal Care and approved by the Animal Care Committee of the Montreal Heart Institute and Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

#### **Rat Model of Hypobaric Hypoxia**

Adult male Sprague Dawley rats (5-6 weeks old; Charles Rivers, Wilmington, Massachusetts) were exposed to hypobaric hypoxia for 3 weeks by decompressing the chamber pressure from 101 kPa/760 mmHg to 50 kPa/380 mmHg (Elmedal et al. 2004; Pauvert et al. 2004). The fraction of inspired O<sub>2</sub> by rats exposed to hypobaric hypoxia remained constant at 21%. The chamber was opened twice a week for 30 minutes to clean the cages, provide water and food. Rats had access to *ad libitum* chow and water and were kept in a 12h/12h light/dark cycle. Rats were acclimated to their surroundings for 1 week prior to being randomly assigned to normoxia or hypobaric hypoxia. Prior to sacrifice, mean arterial pressure and ventricular contractility were measured with a microtip pressure transducer catheter (model SPR-407, 2 F, Millar instrument, Houston, Texas) and data analyzed with the program IOX version 1.8.9 (Emka Technologies; Falls Church, Virginia) as previously described (Chabot et al. 2015). Blood hematocrit levels were measured in samples collected

from the jugular vein (Readacrit, BD Clay Adams, Franklin Lakes, New Jersey). Following sacrifice, the heart was removed and fixed in formalin at a pressure of 20 mmHg for Trichrome Masson's staining or separated (right ventricle, RV; left ventricle, LV; and septum), weighed and stored at -80°C for protein and mRNA extraction. RV hypertrophy was established according to Fulton's index [RV weight/LV+septum weight) (Chabot et al. 2011). The pulmonary lobes were removed, weighed, fixed in formalin for Trichrome Masson's staining, 2-methylbutane for immunofluorescence or stored at -80°C for protein and mRNA extraction (Chabot et al.2015; Chabot et al. 2011).

### **Masson Trichrome Staining and Vascular Remodeling**

Collagen content of the right ventricle and lungs was determined by Masson Trichrome staining of formalin fixed tissue and quantitated with the Image-Pro Plus 7.0 program, as previously described (Chabot et al. 2015;Chabot et al. 2011). In the same sections, pulmonary wall thickness (vascular wall thickness/vascular external diameter) and pulmonary wall area (vascular wall area/total vascular area) were assessed with Stream Basic (Olympus, Tokyo, Japan) acquisition program.

### **Isolation and Culturing of Adult Rat Pulmonary Fibroblasts**

Normal adult rat pulmonary fibroblasts were isolated from lobe P3 and cultured as previously described (Chabot et al. 2015). First passage adult pulmonary fibroblasts were plated at a density of 250 cells/mm<sup>2</sup> in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM; low glucose; HyClone Laboratories, Logan, Utah) supplemented with 7% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen Life Technologies, Grand Island, New York) and 2% penicillin-streptomycin for 24-72 hours and fixed with 2% paraformaldehyde. For growth studies, protein and gene expression, cells were plated for 24 hours in 7% FBS, subsequently washed, the media replaced with serum-free DMEM supplemented with insulin-transferrin-selenium (ITS, BD Bioscience, Bedford, Massachusetts) and experiments performed 48 hours later. Pulmonary fibroblasts were subsequently treated for 24 hours with angiotensin II (AII, 1 μM; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri), epidermal growth factor (EGF, 10 ng/ml, PreproTech, Rocky Hill, New Jersey) or FBS 10%.

## **Isolation and Culturing of Adult Rat Alveolar Epithelial Cells and Measurement of TGF- $\beta_1$ in the Supernatant**

Alveolar epithelial type cells were isolated from adult male Sprague-Dawley rats (6–7 wk), as previously described (Leroy et al. 2004; Leroy et al. 2006). Briefly, lungs were excised, extensively washed and treated with elastase (Worthington, Lakewood, New Jersey). Following elastase treatment, lungs were minced and the resulting suspension filtered. Alveolar epithelial cells were collected and purified using a differential adherence technique that yields predominantly Type II cells. Freshly isolated epithelial cells were plated on glass slides (VWR International, Mississauga, Ontario) in minimal essential medium (MEM; Gibco, Life Technologies Inc., Burlington, ON, Canada) containing 10% FBS (Gibco, Life Technologies Inc.), 0.08 mg/l gentamicin, septria (3  $\mu$ g/ml trimethoprim + 17  $\mu$ g/ml sulfamethoxazole), 0.2% NaHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), 10 mM HEPES (Hyclone, Fisher Scientific Ltd.) and 2 mM L-glutamine (Gibco, Life Technologies Inc.). In the first series of experiments, alveolar epithelial cells were grown in MEM-FBS-septria media for 3 days, washed and replaced with MEM supplemented with ITS lacking FBS/septria and transition to a mesenchymal phenotype determined 24 hours later. In parallel experiments, the media was collected 24 hrs after FBS removal and the quantity of TGF- $\beta_1$  secreted by alveolar epithelial cells determined with an ELISA kit (Invitrogen). In a second series of experiments, alveolar epithelial cells were grown in MEM-FBS-septria media until confluency was achieved. Thereafter, a straight lesion was created in the center of the cell monolayer using a sterile 200- $\mu$ l pipette tip (~950  $\mu$ m wide). The wells were washed and the transition of epithelial cells to a mesenchymal phenotype in the lesion area was examined 24 hours later.

### **Western Blot**

Protein lysates (30–60  $\mu$ g) obtained from right ventricle, P2 lobe or cultured pulmonary fibroblasts were subjected to SDS-electrophoresis as previously described (Beguin et al. 2012; Chabot et al. 2015). Antibodies used include the mouse monoclonal anti-nestin (1:500; Chemicon, Temecula, California), mouse monoclonal anti-vimentin (1:500; Santa Cruz biotechnologies, Santa Cruz, California), mouse monoclonal anti-smooth muscle  $\alpha$ -actin

(1:10,000; Sigma-Aldrich), rabbit polyclonal anti-aquaporin 5 (1:500; Millipore, Darmstadt, Germany), rabbit polyclonal anti-prosurfactant protein C (1:500; Millipore, Darmstadt, Germany), mouse monoclonal anti-Bcl-2-associated X protein (Bax, 1:500; Santa Cruz biotechnologies), mouse monoclonal anti-B-cell lymphoma 2 (Bcl-2, 1:500; BD Biosciences), rabbit polyclonal anti-E-cadherin (1:200; Santa Cruz biotechnologies), goat monoclonal anti-CD31 (1:500; Santa Cruz Biotechnologies) and mouse monoclonal anti-GAPDH (1:50,000; Ambion, Austin, Texas). Following overnight incubation at 4°C, the appropriate secondary antibody-conjugated to horseradish peroxidase (1:20,000; Jackson Immunoresearch, West Grove, Pennsylvania) was added, bands visualized utilizing the ECL detection kit (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts), films scanned with Image J software® and the target protein signal was depicted as arbitrary light units normalized to GAPDH protein levels (Beguin et al. 2012; Chabot et al. 2015).

### **Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR)**

Tissues (RV and pulmonary lobe P1) and cultured pulmonary fibroblasts were homogenized in lysis buffer provided by the Pure Link RNA mini-kit (Ambion). Messenger RNAs were reverse-transcribed to cDNAs (complementary Deoxyribonucleic Acid) with the High-Capacity Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, California), mRNA levels were determined with the molecule SYBR Green (Applied BioSystems), and gene expression was normalized to hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT; lungs),  $\beta$ -Actin (pulmonary fibroblasts) or the geometric mean of GAPDH/ $\beta$ -Actin mRNA (right ventricle). Quantitative PCR was performed with TaqMan probes (Applied Biosystems) and specific primers for each gene (Online Data Supplemental Table S1) were determined from the program Ensembl Genome Browser and specificity verified with the program Blast, as previously described (16). The HPRT primers were provided by Applied Biosystems. Reactions were performed on a Stratagene MX3000 (Agilent Technologies, Santa Clara, California) and gene expression calculated by the  $2^{-\Delta Ct}$  method (Chabot et al. 2015).

**Supplemental Table S1. Primers for real-time PCR analysis of mRNA expression**

Gene	Forward	Reverse
<b>Nestin</b>	5'-TGCAGGCCACTGATAAGTTCCA-3'	5'-TTCTCCTGCTCCAGGGCTTCCA-3'
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	5'-CGTGCTAATGGTGGACCGCAACA-3'	5'-AGCTCTGCACGGGACAGCAAT -3'
<b>TGF-<math>\beta</math>3</b>	5'-GCAAGAATCTGCCACGAGA-3'	5'-GACATGGACAGTGGATGCTGAT-3'
<b>Coll <math>\alpha_1</math> type I</b>	5'-CTGACGCATGGCCAAGAAGACA-3'	5'-CGTGCCATTGTGGCAGATACAGAT-3'
<b>Coll <math>\alpha_1</math> type III</b>	5'-GGACCTGGTTTTCTTCTCACCC-3'	5'-AGGTAGTTGCATCCCAATTCA-3'
<b>ANP</b>	5'-AGAGCGGACTAGGCTGCAACA-3'	5'-ATTTGGCTGTTATCTTCGGTA-3'
<b>BNP</b>	5'-TTGGGCAGAAGATAGACCGGAT-3'	5'-GGTCTTCCTAAAACAACCTCA-3'
<b>SERCA2</b>	5'-AGTCCCCGTATCCGATGACA-3'	5'-CATCCTCAGCAGGGACTGGT-3'
<b><math>\alpha</math>MHC</b>	5'-GGAAGAGTGAGCGGCGCATCAAGG- 3'	5'-CTGCTGGAGAGGTTATTCCTCG-3'
<b><math>\beta</math>-Actin</b>	5'-AGGCTCTCTCCAGCCTTCC-3'	5'-CATGGATGCCACAGGATTCC-3'
<b>GAPDH</b>	5'-GGGCTGGCATTGCTCTCA-3'	5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

TGF $\beta$ 1/ TGF $\beta$ 3 indicates transforming Growth Factor  $\beta$ -1 and  $\beta$ -3; Coll  $\alpha_1$  type I/type III, Collagen  $\alpha_1$  type I/type III; ANP, atrial natriuretic peptide; BNP, brain natriuretic peptide; SERCA2, Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase;  $\alpha$ MHC, alpha Myosin Heavy Chain and GAPDH, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

### Immunofluorescence

Immunofluorescence on pulmonary lobe P3/P4 (cryostat sections of 14  $\mu$ m thickness) was performed with the mouse monoclonal anti-nestin (1:400; Chemicon), rabbit polyclonal anti-smooth muscle  $\alpha$ -actin (1:200; Abcam, Cambridge, Massachusetts), rabbit polyclonal anti-collagen type I (1:100; Abcam), goat monoclonal anti-CD31 (1:100; Santa Cruz Biotechnologies) or mouse monoclonal anti-E-cadherin (1:100; BD Biosciences) as previously described (Chabot et al. 2015). The rabbit polyclonal anti-E-cadherin employed for Western blot analysis was not used for immunofluorescence as the antibody did not provide consistent uniform staining of epithelial cells of pulmonary lobes fixed in 2-methylbutane. Immunofluorescence on primary passage adult rat pulmonary epithelial cells and 1<sup>st</sup> passage adult rat pulmonary fibroblasts was performed with the mouse monoclonal anti-nestin (1:400, Chemicon), mouse monoclonal anti-E-cadherin (1:100) rabbit polyclonal anti-smooth muscle  $\alpha$ -actin (1:200; Abcam) or rabbit polyclonal anti-collagen type I (1:400; Abcam). The nucleus



was identified with TO-PRO®3 (1.5  $\mu$ M; emission wavelength, 661 nm, Life Technologies, Carlsbad, California) staining. Secondary antibodies used were a goat anti-mouse IgG conjugated to Alexa-555 (1:800; emission wavelength, 570 nm; Life Technologies), a goat anti-rabbit IgG conjugated to Alexa-488 (1:800; emission wavelength, 520 nm; Life Technologies, Carlsbad, CA), a goat anti-rabbit IgG conjugated to Alexa-647 (1:800; emission wavelength, 668 nm; Life Technologies), a donkey anti-mouse IgG conjugated to Alexa-555 (1:800; emission wavelength, 570 nm; Life Technologies) or a donkey anti-goat IgG conjugated to Alexa-488 (1:800; emission wavelength, 520 nm; Life Technologies). Non-specific staining was determined by the addition of the conjugated secondary antibody alone. Immunofluorescence was visualized using a confocal LSM710 Zeiss microscope with a 20X, 40X- or 63X-oil 1.4 NA DIC. Images were obtained with the Zeiss LSM Image Browser.

## **Statistics**

Data were presented as the mean  $\pm$  S.E.M, (n) represented the number of rats and/or independent preparations of pulmonary fibroblasts/alveolar epithelial cells used per experiment and evaluated by a student's unpaired t-test with a value of  $P < 0.05$  considered statistically significant.

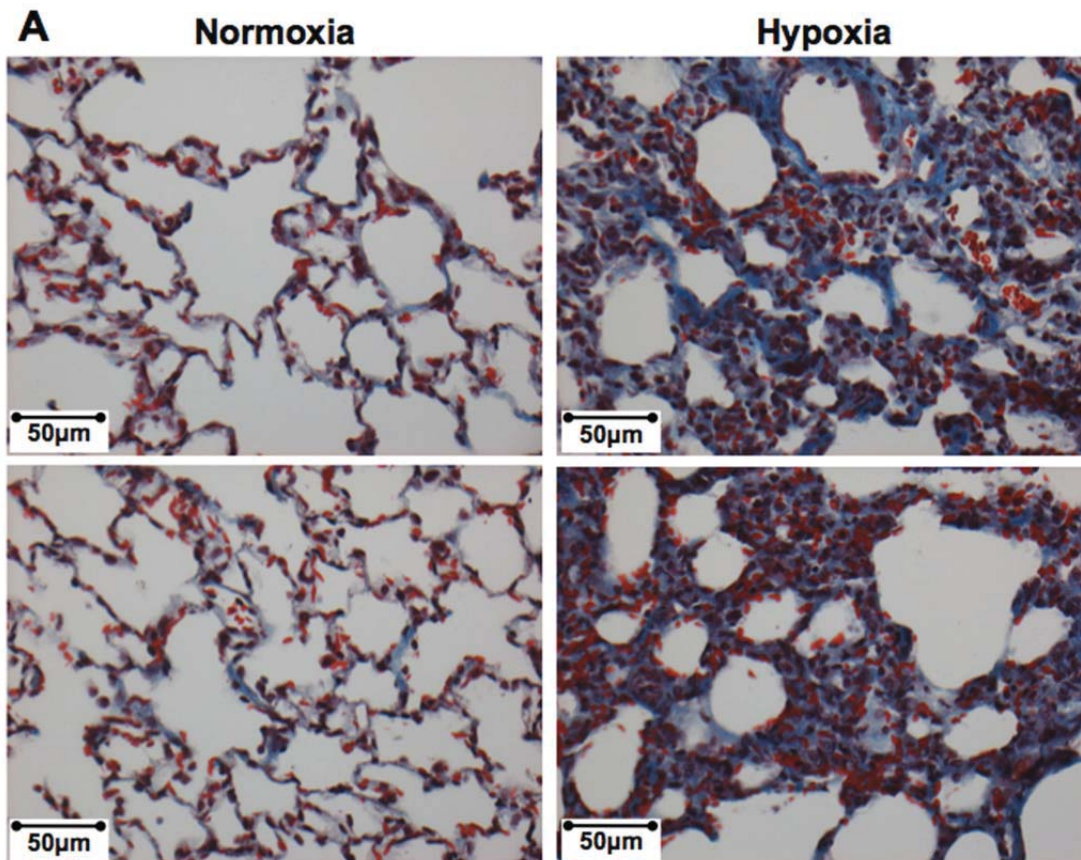
## **4.4 RESULTS**

### **Pulmonary and Cardiac Remodeling Secondary to Hypobaric Hypoxia**

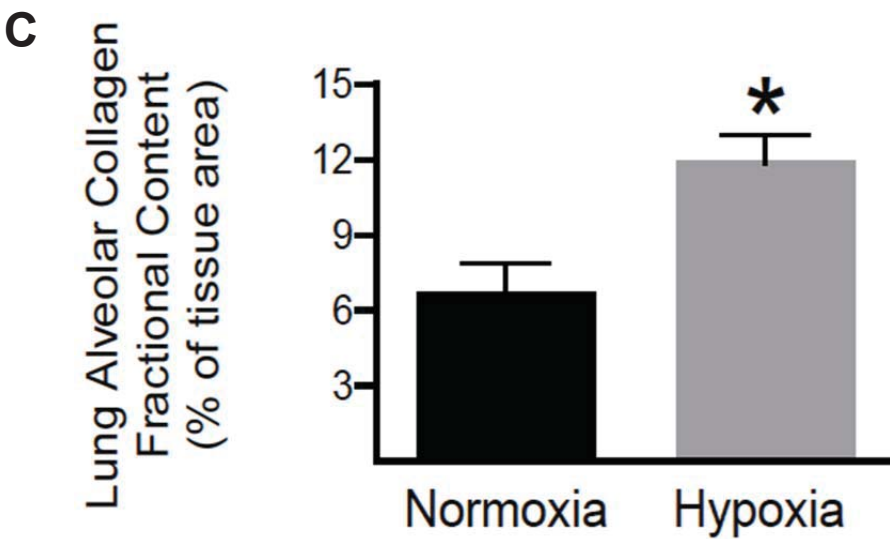
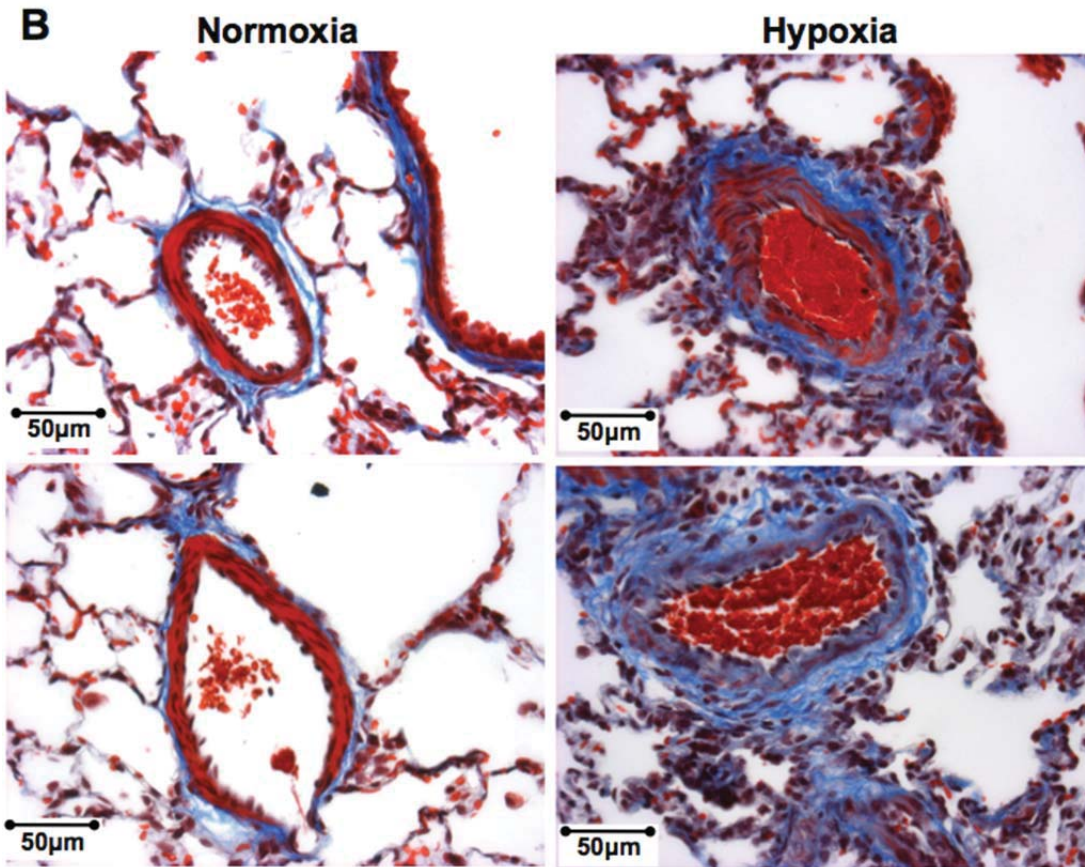
A 3-week exposure of normal adult male Sprague-Dawley rats to hypobaric hypoxia stimulated erythropoiesis and led to the development of pulmonary hypertension, characterized by elevated right ventricular systolic pressure, increased rate of contraction/relaxation and a greater lung weight compared to normoxic rats (Tables 1 & 2). The pulmonary hypertensive response was further associated with lung remodeling highlighted by alveolar thickening and significant collagen deposition (Suppl Figures 1A & 1C). Elevated perivascular collagen deposition (Suppl Figures 1B & 1D) and vascular remodeling characterized by increased wall thickness and concomitant reduction of lumen diameter were also evident in the lungs of hypobaric hypoxic rats (Suppl Figures 1E-1H). At

the transcriptional level, collagen type I, TGF- $\beta_1$  and TGF- $\beta_3$  mRNAs were significantly increased in the lungs of hypobaric hypoxic rats (Figure 1). Lastly, the increased afterload on the right ventricle secondary to pulmonary hypertension induced a hypertrophic response in hypobaric hypoxic rats distinguished by an increase in tissue weight (Tables 1 & 2), up-regulation of prepro-atrial natriuretic peptide (ANP) and -brain natriuretic peptide (BNP) mRNAs, and concomitant downregulation of  $\alpha$ -myosin heavy chain and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase mRNAs (Suppl Figure 2A, 2B, 2C & 2D). However, a concomitant reactive fibrotic response was not coincident with right ventricular hypertrophy as collagen type I and type III mRNA levels and protein deposition in hypobaric hypoxic rats were similar to normoxic rats (Suppl Figures 2E, 2F & 2G).

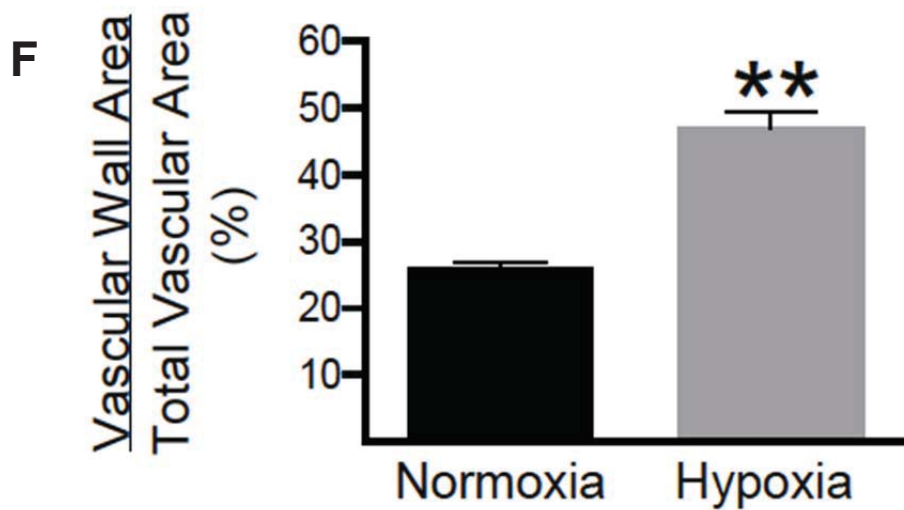
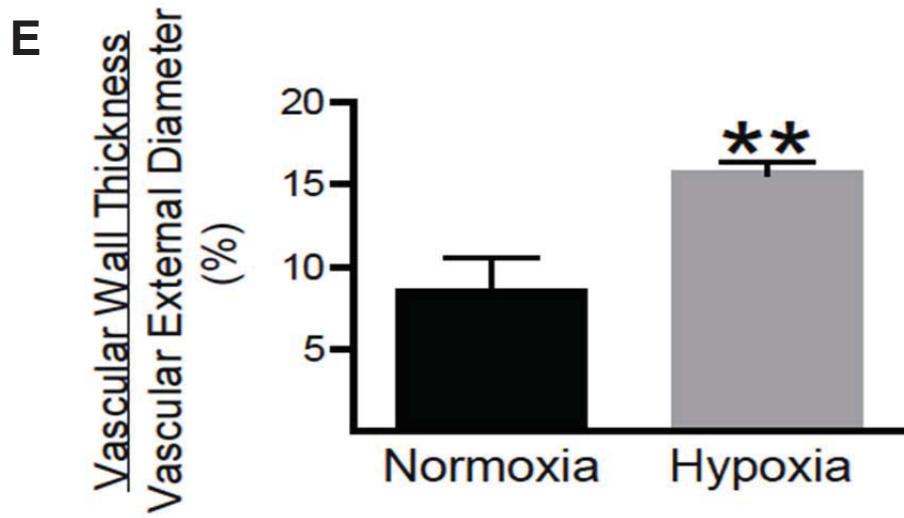
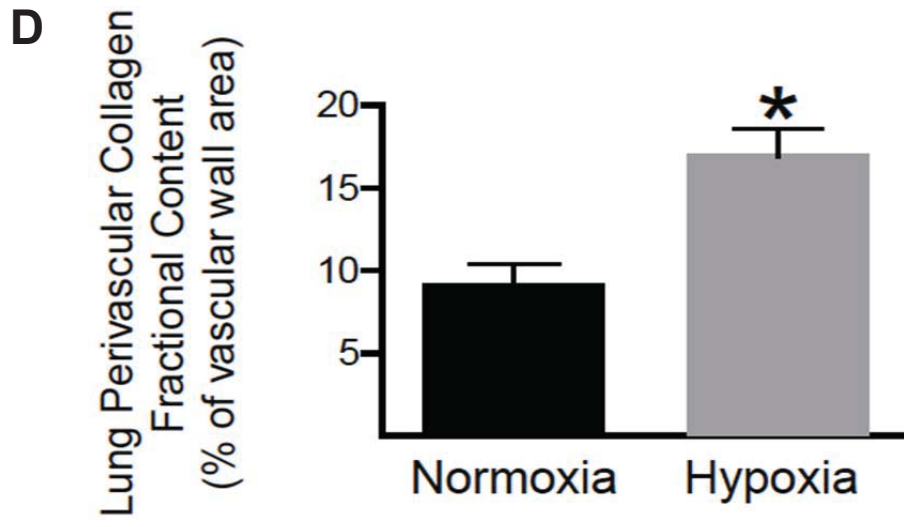
### Supplemental Figure 1



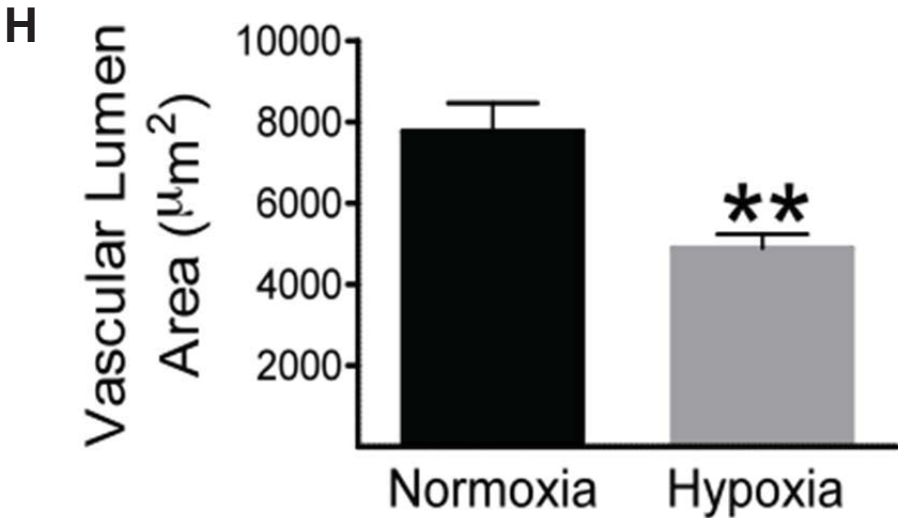
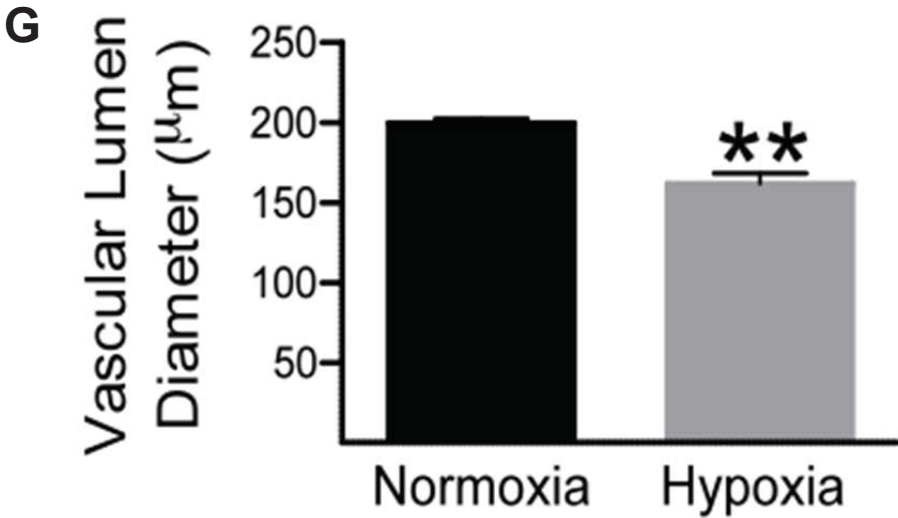
Supplemental Figure 1 (Suite)



Supplemental Figure 1 (Suite)







**Supplemental Figure 1 : Alevolar and perivascular fibrosis and vessel remodeling in rats exposed to hypobaric hypoxia.**

Masson Trichrome staining revealed that collagen deposition was significantly greater in the alveolar (Panels A & C) and perivascular (Panels B & D) regions in the lungs of hypobaric hypoxic rats (hypoxia) as compared to normoxic. Significant vessel remodeling was also observed in hypobaric hypoxic rats characterized by an increase in pulmonary vascular wall thickness (Panel E) and wall area (Panel F) and a concomitant reduction in vascular lumen diameter (Panel G) and area (Panel H). N=4-5 normoxic rats, n=5 hypobaric hypoxic rats, (\*) denotes  $p < 0,05$  versus sham rats and (\*\*\*) denotes  $p < 0,01$  versus sham rats.

**Table 1 : Body, heart and lung weights, hematocrit and Fulton's index of sham and hypobaric hypoxic rats**

	BW (gr)	LV/BW (mg/gr)	RV/BW (mg/gr)	P1/BW (mg/gr)	P2/BW (mg/gr)	P5/BW (mg/gr)	Fulton's Index (%)	Hematocrit (%)
Sham rats (n=6-7)	401±11	1.47±0.05	0.52±0.05	0.38±0.03	0.44±0.02	0.41±0.01	25±2	52±4
Hypobaric hypoxic rats (n=7-8)	320±8*	2.19±0.13*	1.46±0.07*	0.83±0.04*	0.87±0.04*	0.85±0.02*	52±2*	84±2*

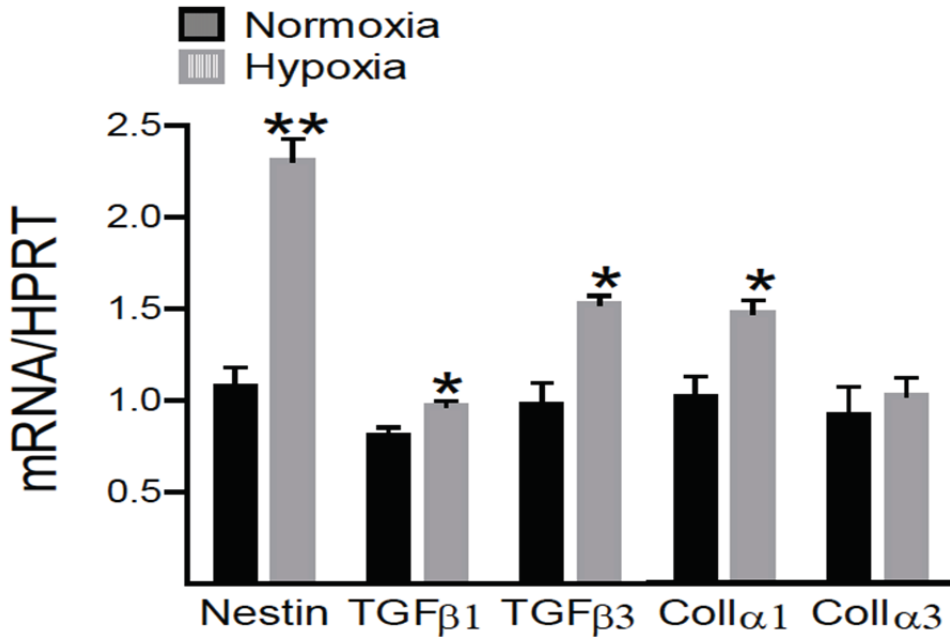
LV indicates left ventricle; RV, right ventricle; BW, body weight; P1, lung lobe 1; P2, lung lobe 2; P5, lung lobe 5, data presented as mean±S.E.M., evaluated by a Student's unpaired t-test, (\*) represents  $p < 0.01$  versus sham and (n) number of rats examined.

**Table 2 : MAP, left and right ventricular contractile function of sham and hypobaric hypoxic rats**

	MAP (mmHg)	LVSP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	LV + dP/dt (mmHg/sec)	LV - dP/dt (mmHg/sec)	RVSP (mmHg)	RV + dP/dt (mmHg/sec)	RV - dP/dt (mmHg/sec)
Sham rats (n=6-7)	108±4	127±6	7±1	7366±476	-8262±526	25±1	1605±111	-1289±64
Hypobaric hypoxic rats (n=7-8)	126±4*	144±7	12±2*	9423±590*	-7940±314	76±5**	3738±297**	-2984±158**

MAP indicates Mean Arterial Pressure; LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure; LVSP, left ventricular systolic pressure; LV + dP/dt, rate of left ventricular contraction; LV - dP/dt, rate of left ventricular relaxation; RVSP, right ventricular systolic pressure; RV + dP/dt, rate of right ventricular contraction; RV - dP/dt, rate of right ventricular relaxation. Data are presented as mean±S.E.M., evaluated by a Student's unpaired t-test, (\*) represents  $p < 0.05$  versus sham, (\*\*) represents  $p < 0.01$  versus sham and (n) number of rats examined.

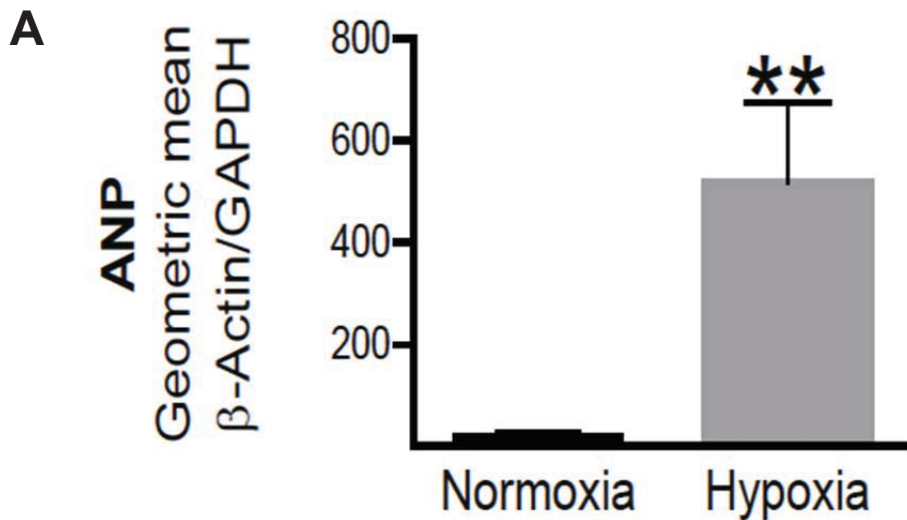




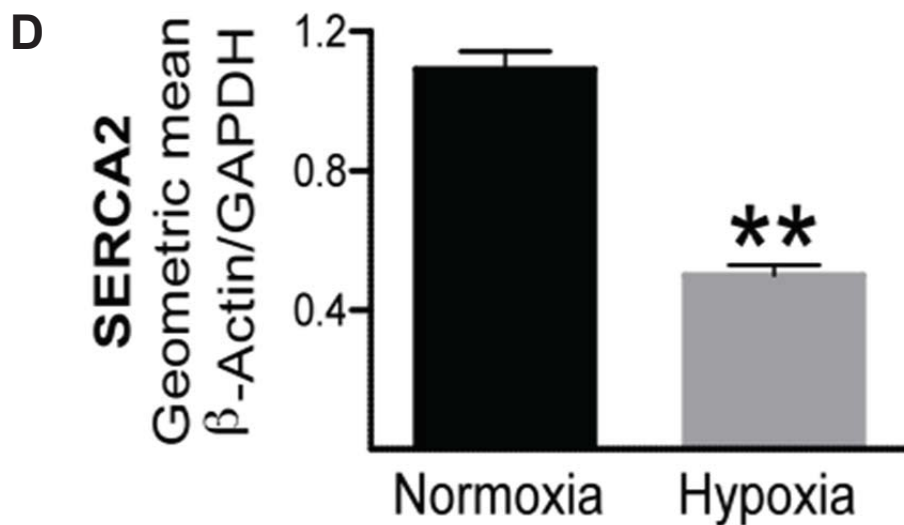
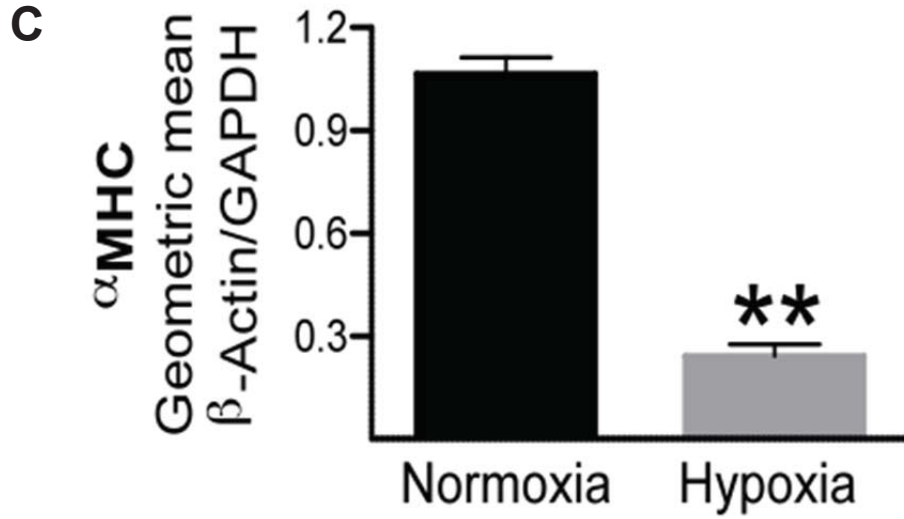
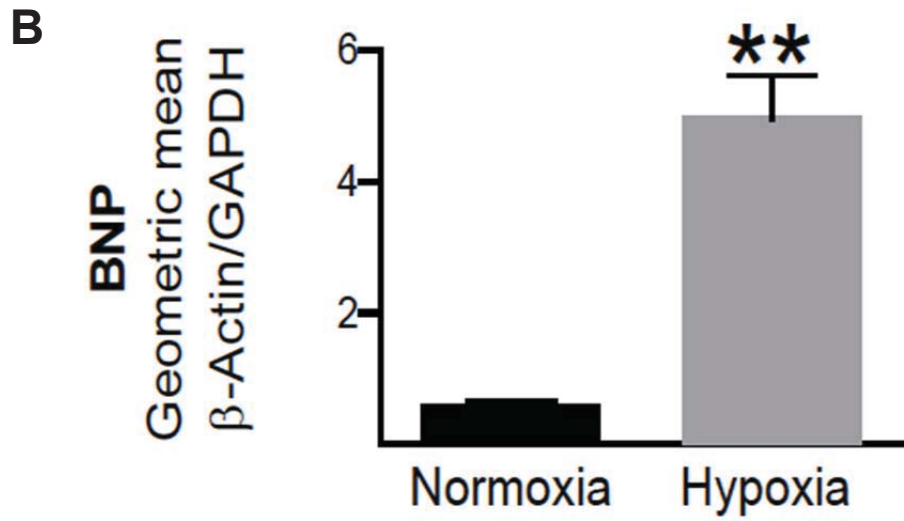
**Figure 1 : Gene expression in the lungs of hypobaric hypoxic rats.**

Nestin, transforming growth factor-β<sub>1</sub> (TGF-β<sub>1</sub>), transforming growth factor-β<sub>3</sub> (TGF-β<sub>3</sub>) and collagen type I (Coll I) mRNA levels were significantly increased in the lungs of rats exposed to hypobaric hypoxia whereas collagen type III (Coll III) mRNA expression was unchanged. Transcript levels were normalized to hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) mRNA expression, n=3-6 for normoxic rats, n=5-7 for hypobaric hypoxic rats, (\*) denotes *P*<0.05 and (\*\*) denotes *P*<0.01 versus normoxic rats.

**Supplemental Figure 2**

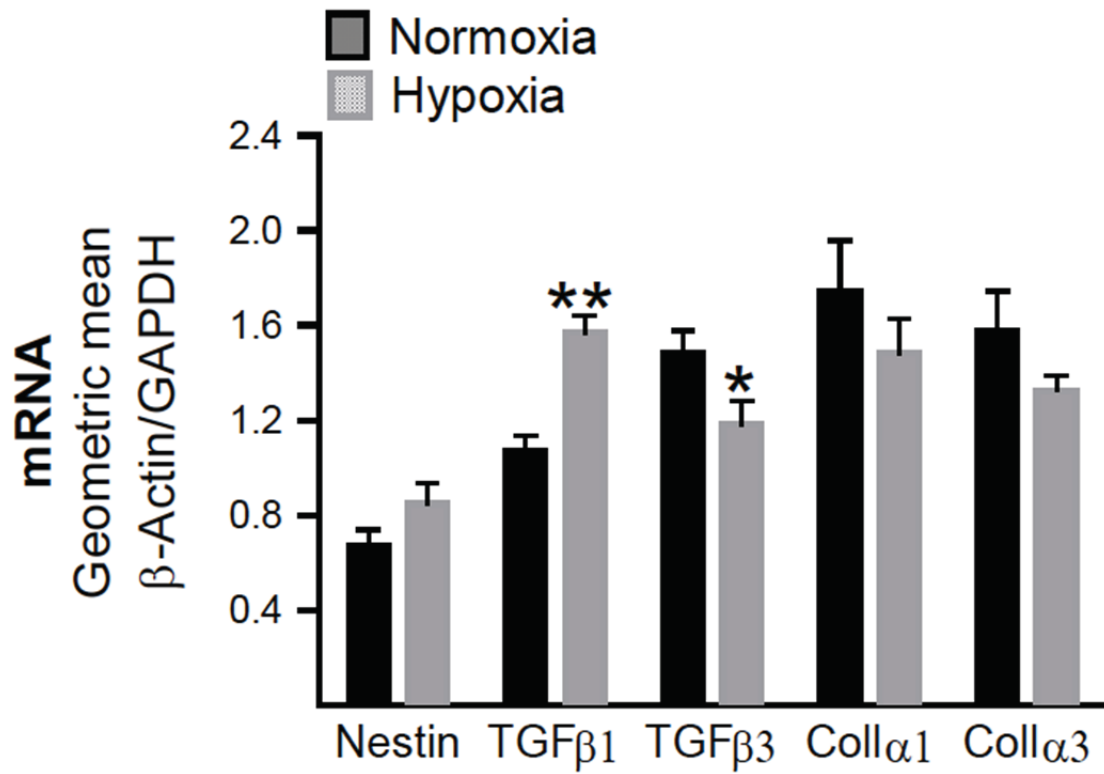


Supplemental Figure 2 (Suite)



Supplemental Figure 2 (Suite)

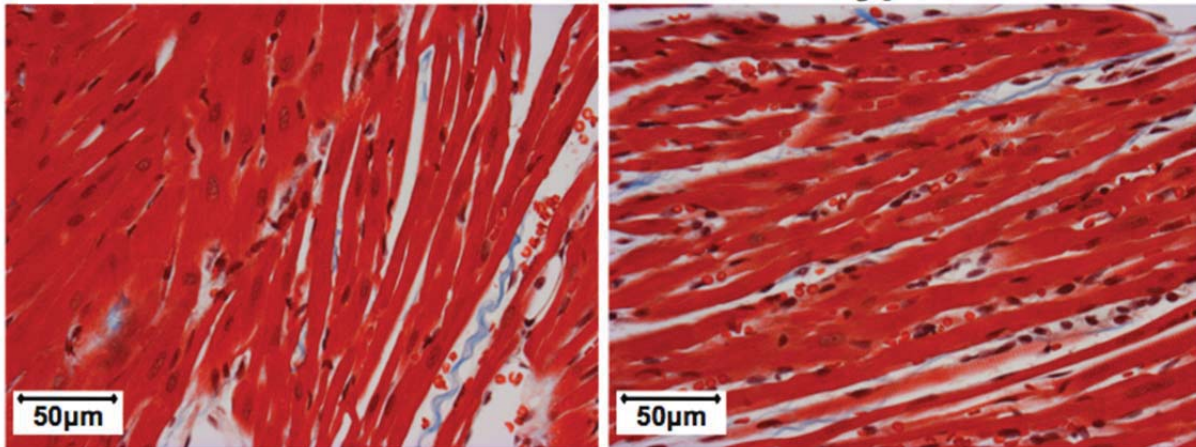
**E**

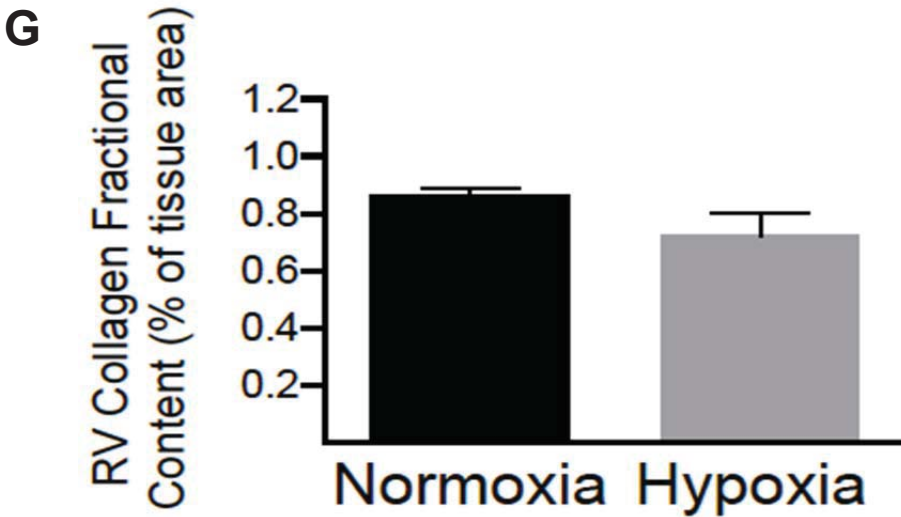


**F**

**Normoxia**

**Hypoxia**





**Supplemental Figure 2 : Right ventricular remodeling of rats exposed to hypobaric hypoxia.**

(Panels A, B, C & D) Right ventricular hypertrophy was observed in rats exposed to hypobaric hypoxia characterized by the increased expression of atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) transcripts and the concomitant downregulation of alpha myosin heavy chain ( $\alpha$ MHC) and sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2). mRNA expression was normalized by geometric mean of  $\beta$ -Actin and GAPDH mRNA levels, n=7 normoxic rats, n=8 hypobaric hypoxic rats, and (\*\*) denotes  $p < 0,01$  versus normoxic rats. (Panel E) Transforming growth factor- $\beta_1$  mRNA levels were significantly greater whereas transforming growth factor- $\beta_3$  mRNA expression was modestly reduced in the right ventricle of rats exposed to hypobaric hypoxia. Nestin, collagen type I and III (Coll I/Coll III) mRNA expression was similar between normoxic and hypobaric hypoxic rats. mRNA expression was normalized by geometric mean of  $\beta$ -Actin and GAPDH mRNA levels, n=7 normoxic rats, n=8 hypobaric hypoxic rats, (\*) denotes  $p < 0,05$ , (\*\*) denotes  $p < 0,01$  versus normoxic rats. (Panels F & G) Masson Trichrome staining revealed that collagen deposition in the right ventricle of hypobaric hypoxic rats (n=3) was similar to normoxic rats (n=3).

### Lung Remodeling and Nestin Expression in Hypobaric Hypoxic Rats

Protein expression of aquaporin 5; a water channel expressed at the apical membrane of alveolar epithelial type I cells was significantly increased in the lungs of 3-week hypobaric hypoxic rats (Figure 2A). By contrast, pro-surfactant C; a marker of alveolar type II cells was significantly reduced in the lungs of hypobaric hypoxic rats as compared to normoxic rats (Figure 2A & 2B). B-cell lymphoma 2 (Bcl2, an anti-apoptotic protein) and Bcl-2-associated X protein (Bax, a proapoptotic protein) levels were similar in hypobaric hypoxic and normoxic rats (Figure 2A & 2C). Nestin protein expression in the lungs of hypobaric hypoxic rats was

significantly elevated (Figure 2D & 2E) and attributed in part to increased levels of the transcript (Figure 1). It has been established that nestin was unable to self-assemble and form homodimers because of a short NH<sub>2</sub>-terminus (Wiese et al. 2004). Thus, nestin formed heterodimers with alternative intermediate filament proteins including vimentin and desmin (Wiese et al. 2004). Consistent with this premise, vimentin protein levels were significantly increased in the lungs of hypobaric hypoxic rats (Figure 2D & 2F). Nestin upregulation was apparently selective to the lungs of hypobaric hypoxic rats as protein (Normoxia=1.69±0.43, n=3; Hypobaric hypoxia=1.36±0.13, n=5, Figure 2E) and mRNA levels (Normoxia=0.67±0.07, n=7; Hypobaric hypoxia=0.85±0.09, n=8, Supplemental Figure 2E) of the intermediate filament protein in the hypertrophied right ventricle were similar to normoxic rats.

**Figure 2**

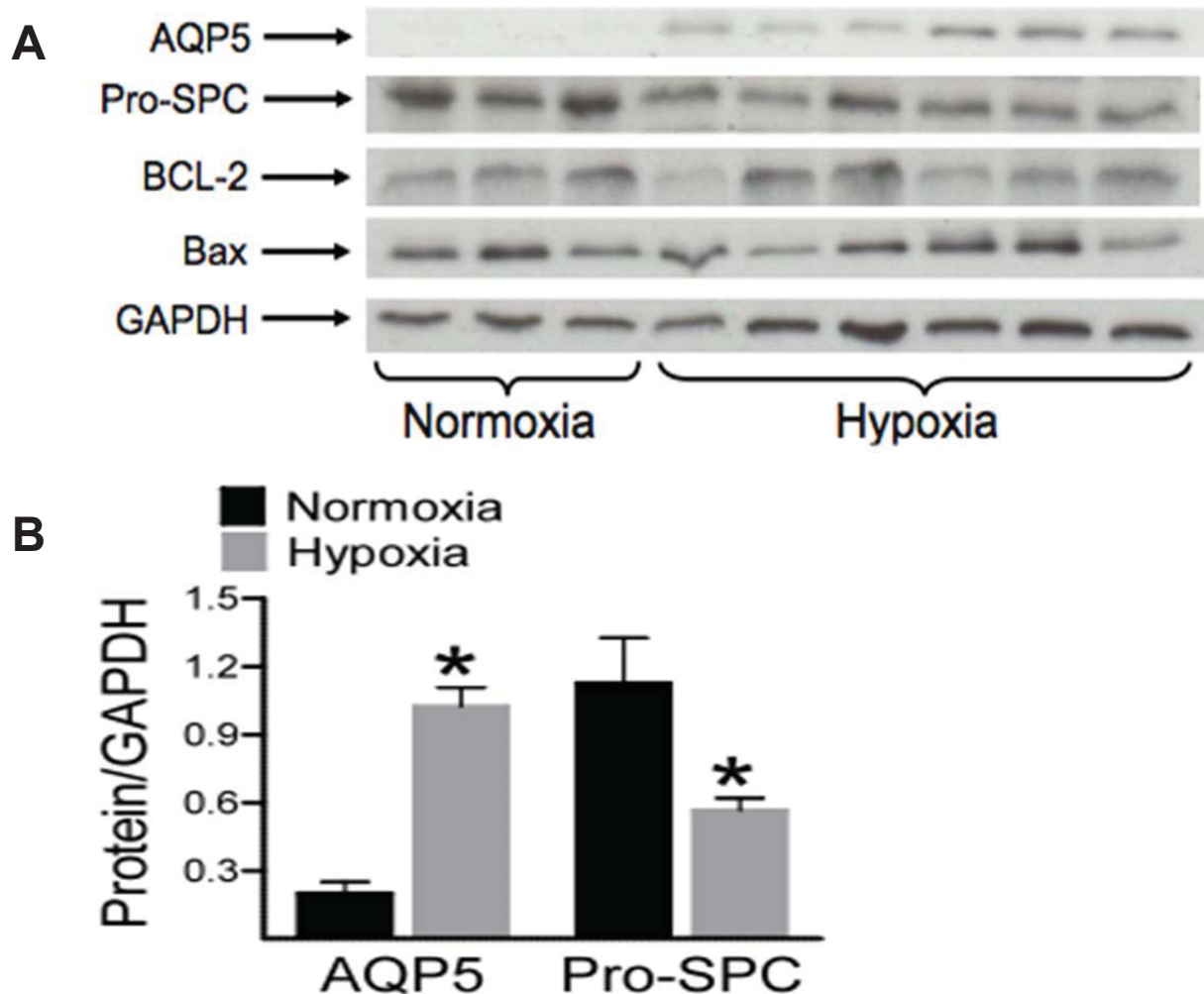
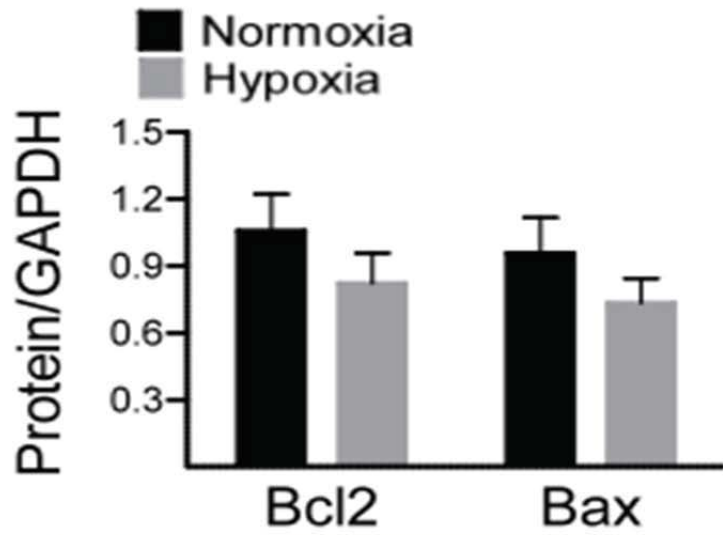
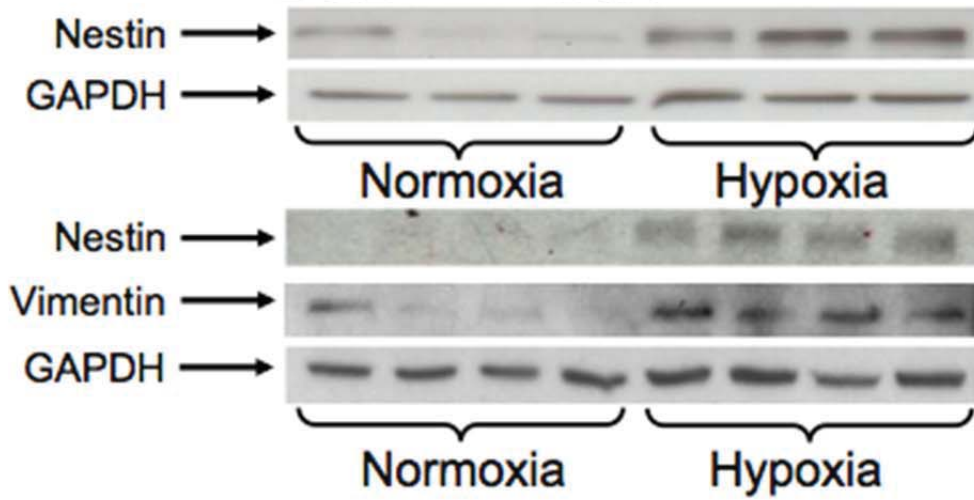


Figure 2 (Suite)

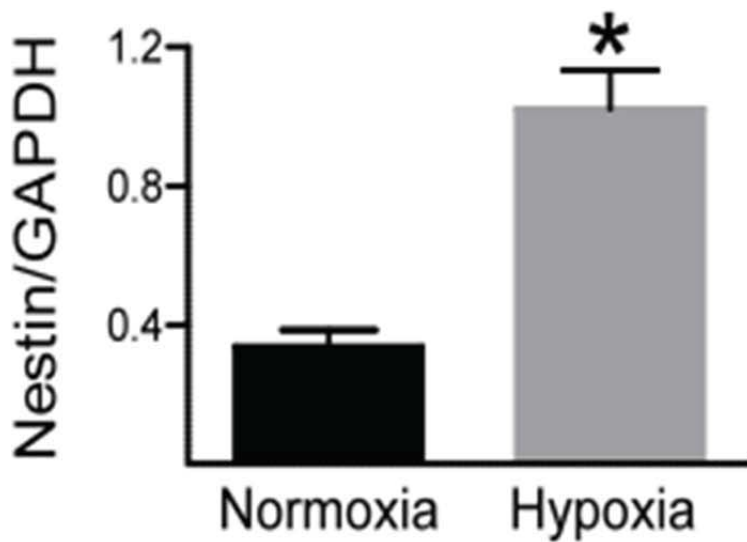
C



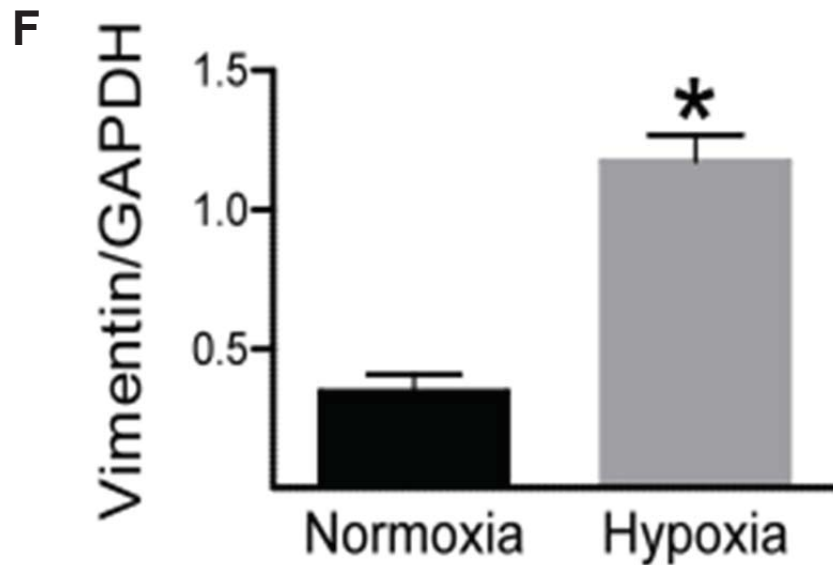
D



E







**Figure 2 : Protein expression in the lungs of hypobaric hypoxic rats.**

(Panels A, B & C) Aquaporin5 (AQP5) protein levels were significantly increased, pro-surfactant protein C (pro-SPC) levels reduced whereas B-cell lymphoma 2 (Bcl2) and Bcl-2-associated X protein (Bax) expression remained unchanged in the lungs of rats exposed to hypobaric hypoxia. (Panels D, E & F) Nestin and vimentin protein levels were significantly increased in the lungs of rats exposed to hypobaric hypoxia. Protein levels were normalized to GAPDH protein expression, n=3-7 normoxic rats, n=6-7 hypobaric hypoxic rats, and (\*) denotes  $p < 0.05$  versus normoxic rats.

Filamentous nestin was detected in a subpopulation of 1<sup>st</sup> passage normal adult rat pulmonary fibroblasts co-expressing smooth muscle  $\alpha$ -actin and collagen type I (Figure 3A). In the lungs of normoxic rats, collagen type I immunoreactive cells were identified in the alveolar region and a subpopulation co-expressed nestin (Figure 3B). Robust smooth muscle  $\alpha$ -actin staining was detected in vascular smooth muscle cells whereas a paucity of nestin<sup>(+)</sup> cells in the alveolar region co-expressed smooth muscle  $\alpha$ -actin (Supplemental Figure 3). In normoxic rats, nestin staining of endothelial cells was detected (Figure 3B) but was not ubiquitously observed in the pulmonary vasculature whereas nestin expression was absent in smooth muscle  $\alpha$ -actin<sup>(+)</sup> vascular smooth muscle cells (Supplemental Figure 3). In the lungs of hypobaric hypoxic rats, a preponderance of nestin/collagen type 1<sup>(+)</sup>-cells were detected in the alveolar region and in stark contrast to normoxic rats were also identified in the perivascular region of numerous blood vessels (Figures 3C & 3D). Furthermore, very few if

any nestin<sup>(+)</sup> cells identified in the alveolar and perivascular regions of hypobaric hypoxic rats were immunoreactive for smooth muscle  $\alpha$ -actin (Figure 3E).

**Figure 3**

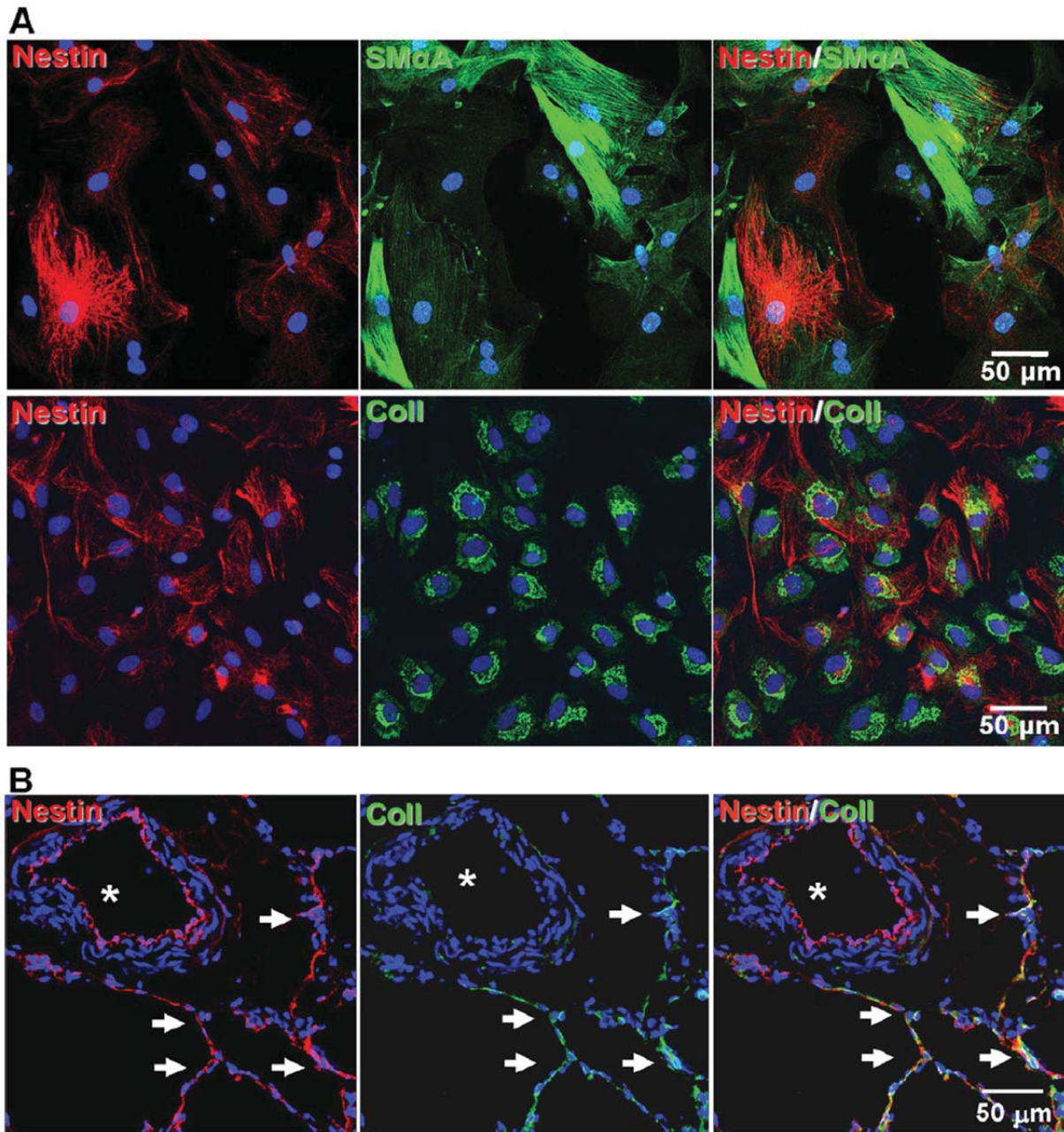


Figure 3 (Suite)

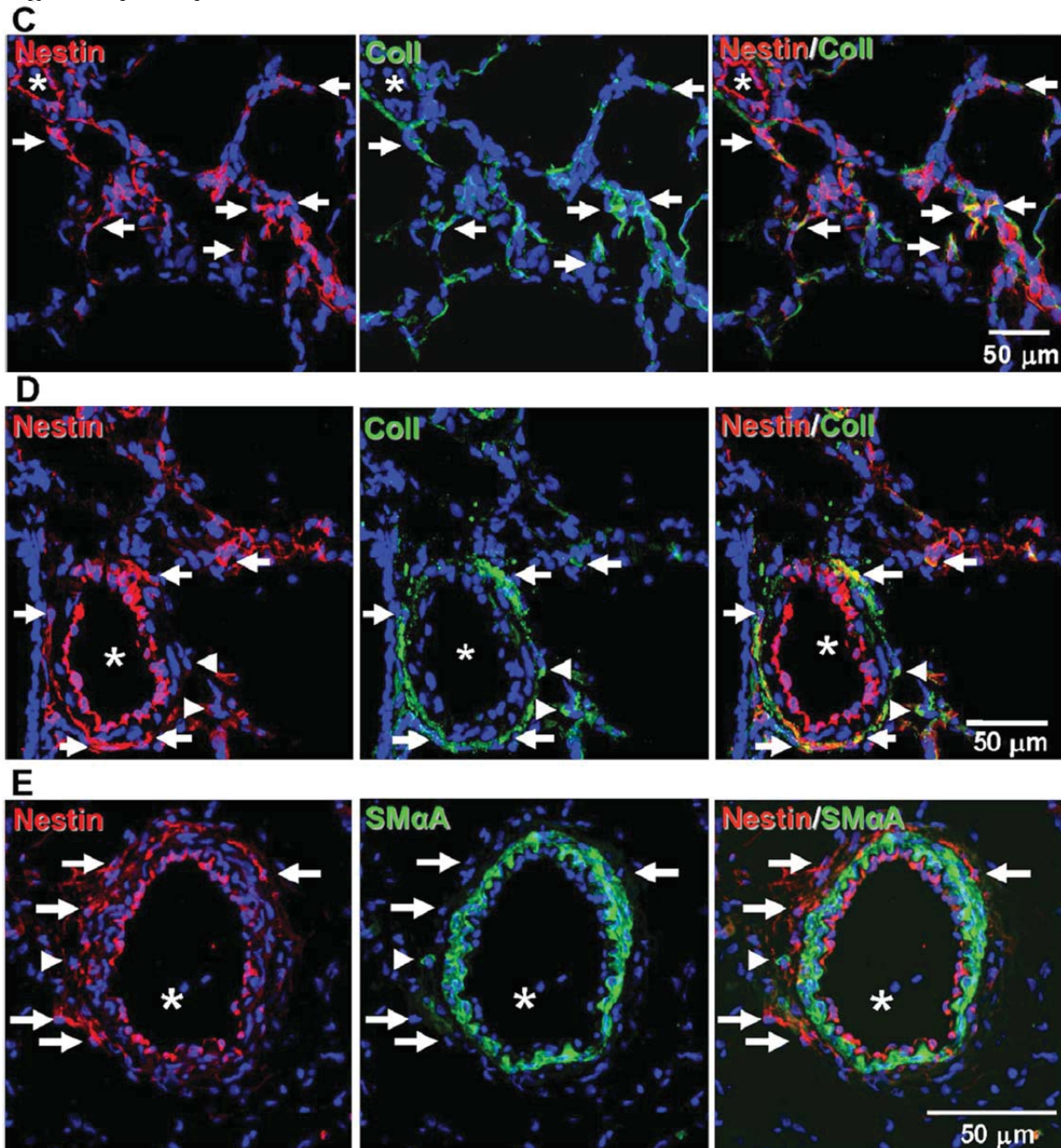
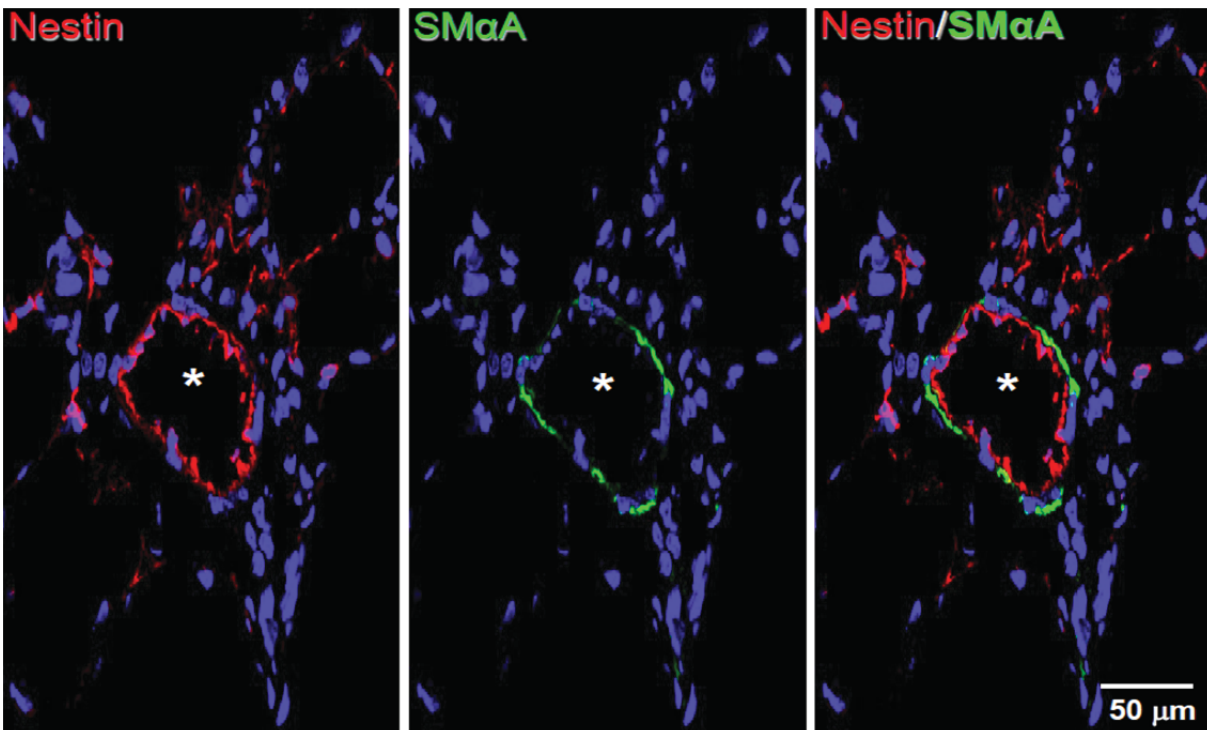


Figure 3 : Nestin and collagen type I staining of normal adult rat pulmonary fibroblasts and lungs of rats exposed to hypobaric hypoxia.

(Panel A) Cultured adult rat pulmonary fibroblasts expressed smooth muscle  $\alpha$ -actin and collagen type I and a subpopulation were associated with filamentous nestin. (Panel B) In the lungs of normal rats, nestin staining was detected in endothelial cells (asterisk indicates a blood vessel) and immunoreactivity identified in the alveolar region of mesenchymal cells characterized by collagen type I co-expression (indicated by arrow). (Panel C) In the lungs of rats exposed to hypobaric hypoxia, a greater number of collagen type I<sup>(+)</sup>-cells were observed in the alveolar region and a subpopulation were associated with nestin staining (indicated by



arrow). Nestin staining of endothelial cells was likewise observed (asterisk indicates a blood vessel) whereas collagen type I staining of vascular cells was absent (**Panel D**) In contrast to normoxic lungs, nestin<sup>(+)</sup>-cells were identified in the perivascular region of numerous vessels (asterisk indicates blood vessel) and a subpopulation exhibited a mesenchymal phenotype characterized by collagen type I co-expression (indicated by arrow). Furthermore, perivascular collagen type I<sup>(+)</sup>-mesenchymal cells lacking nestin immunoreactivity (indicated by arrowhead) were also detected. (**Panel E**) In the lungs of rats exposed to hypobaric hypoxia, the preponderance of nestin<sup>(+)</sup> cells (indicated by arrow) detected in the perivascular region of hypobaric hypoxic rats were not immunoreactive for smooth muscle  $\alpha$ -actin (indicated by arrowhead). Smooth muscle  $\alpha$ -actin staining was robustly expressed in vascular smooth muscle cells. Asterisk indicates a blood vessel and the nucleus identified by TO-PRO@3 staining (blue fluorescence).



**Supplemental Figure 3 : Nestin and smooth muscle  $\alpha$ -actin staining in the lungs of normoxic rats.**

Nestin staining (red fluorescence) was detected in endothelial cells and in the alveolar region whereas smooth muscle  $\alpha$ -actin immunoreactivity (green fluorescence) was identified predominantly in vascular smooth muscle cells. The preponderance of nestin<sup>(+)</sup>-cells in the alveolar region lacked smooth muscle  $\alpha$ -actin immunoreactivity. Asterisk indicates a blood vessel and the nucleus was identified by TO-PRO@3 staining (blue fluorescence).

## Putative Growth Factors Induced Nestin Expression In Pulmonary Fibroblasts

The appearance of nestin/collagen type I<sup>(+)</sup>-fibroblasts in the lungs of hypobaric hypoxic rats may have occurred in part via the increased expression of the intermediate filament protein in resident stromal cells in response to profibrotic peptide growth factors. The treatment of normal adult rat pulmonary fibroblasts with angiotensin II (AII; 1  $\mu$ M) for 24 hours increased nestin protein expression (Figures 4A & 4B) albeit the response was not associated with a change in mRNA levels (Figure 4C). The exposure of pulmonary fibroblasts to epidermal growth factor (EGF; 10 ng/ml) or FBS (10%) robustly induced nestin protein and mRNA levels (Figures 4A, 4B & 4C). Smooth muscle  $\alpha$ -actin protein expression remained unchanged in normal adult rat pulmonary fibroblasts following exposure to AII, EGF or FBS (Figures 4A & 4D).

**Figure 4**

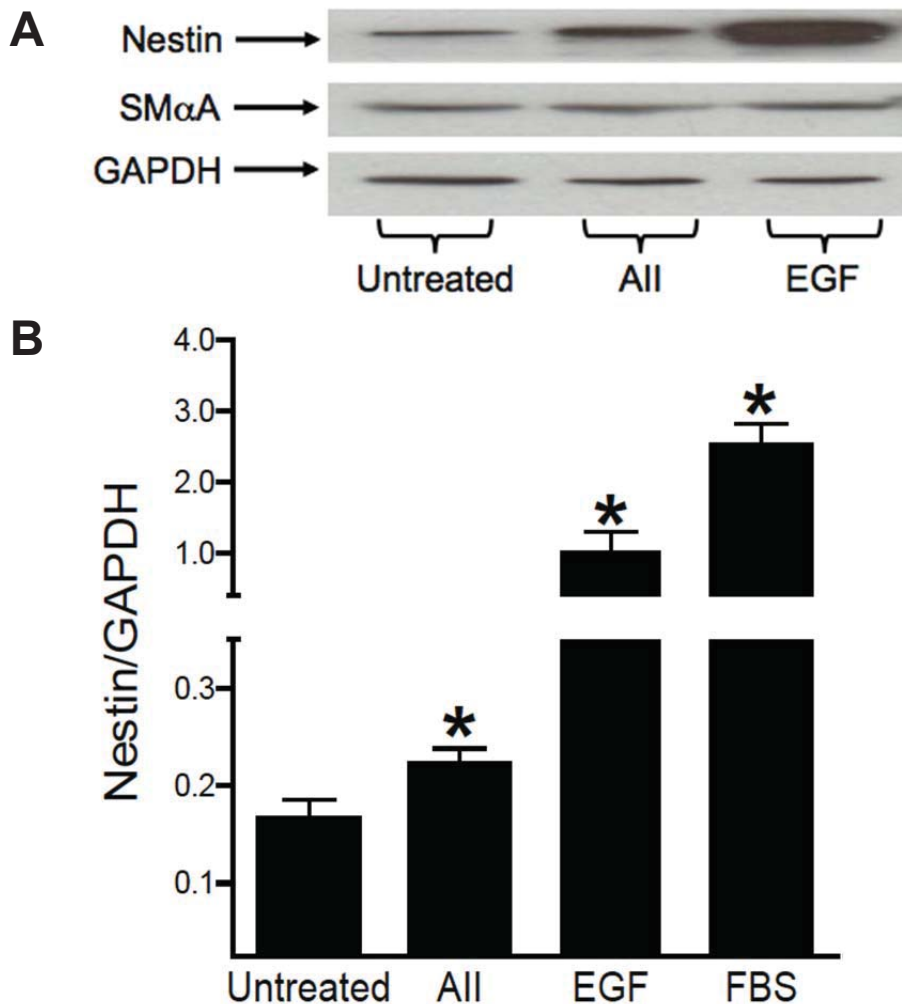
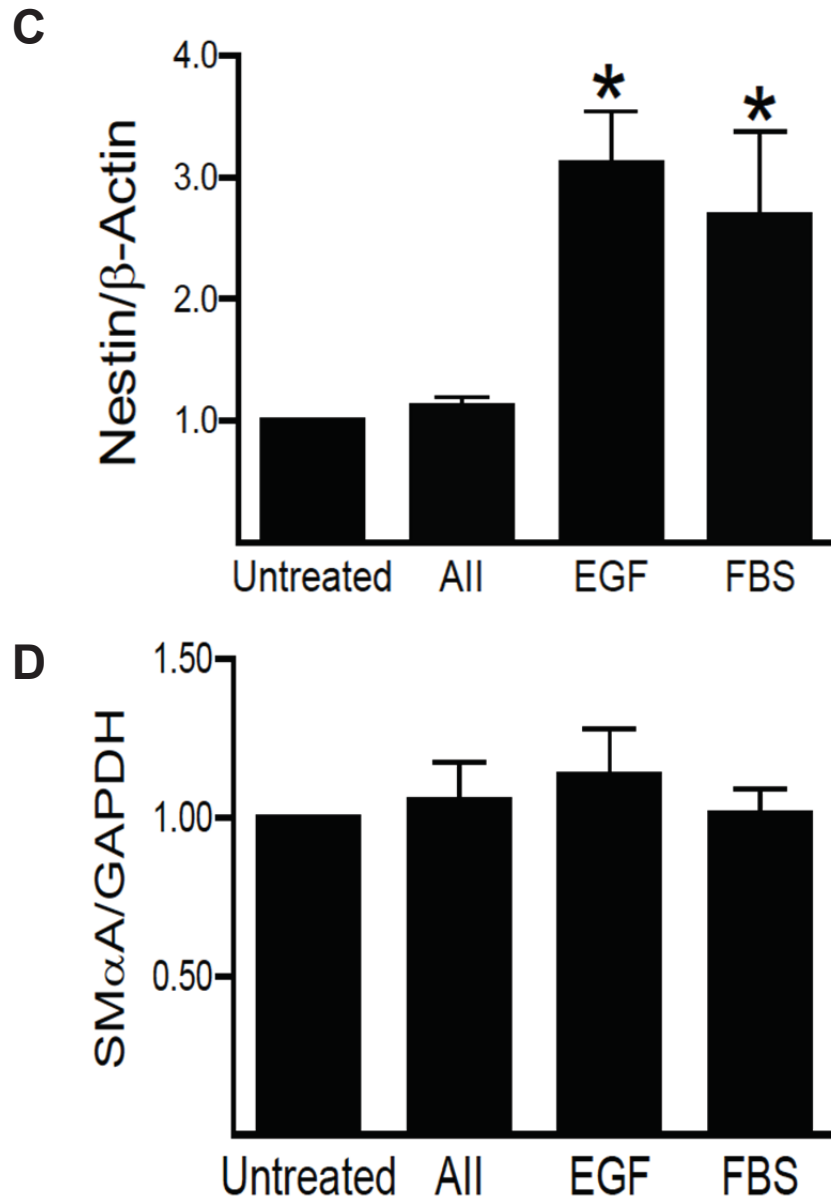


Figure 4 (suite)



**Figure 4 : Nestin protein and mRNA expression in pulmonary fibroblasts treated with a panel of peptide growth factors.**

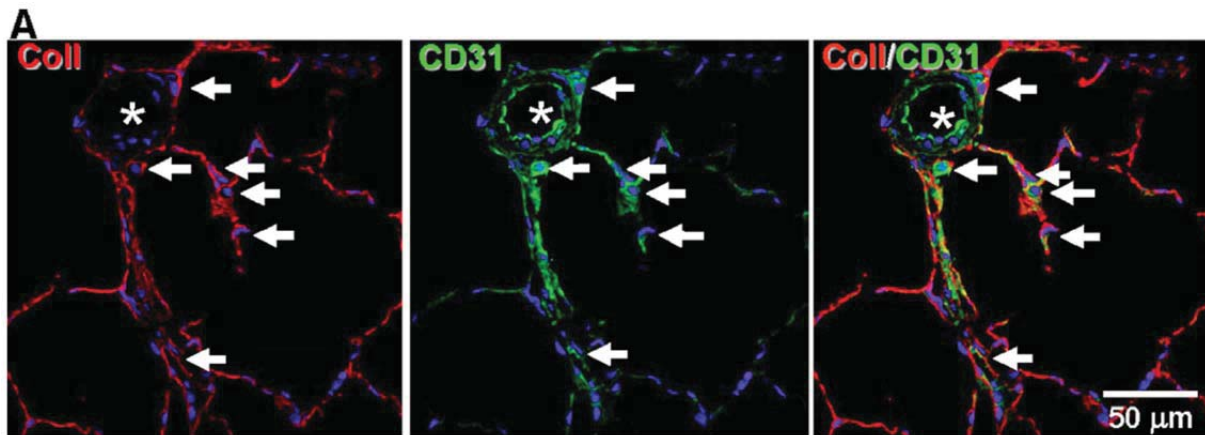
(Panels A & B) The 24 hour exposure of normal adult rat pulmonary fibroblasts to AII (1 $\mu$ M), EGF (10 ng/ml) or FBS (10%) significantly increased nestin protein levels. (Panel C) EGF and FBS mediated increase in nestin protein expression was associated with the concomitant upregulation of mRNA levels. (Panels A & D) Smooth muscle  $\alpha$ -actin (SM $\alpha$ A) protein levels were unchanged in response to AII, EGF or FBS (10%). Protein and mRNA levels were normalized to GAPDH and  $\beta$ -actin, respectively, n=4 independent experiments and (\*) denotes  $P < 0.05$  versus untreated.

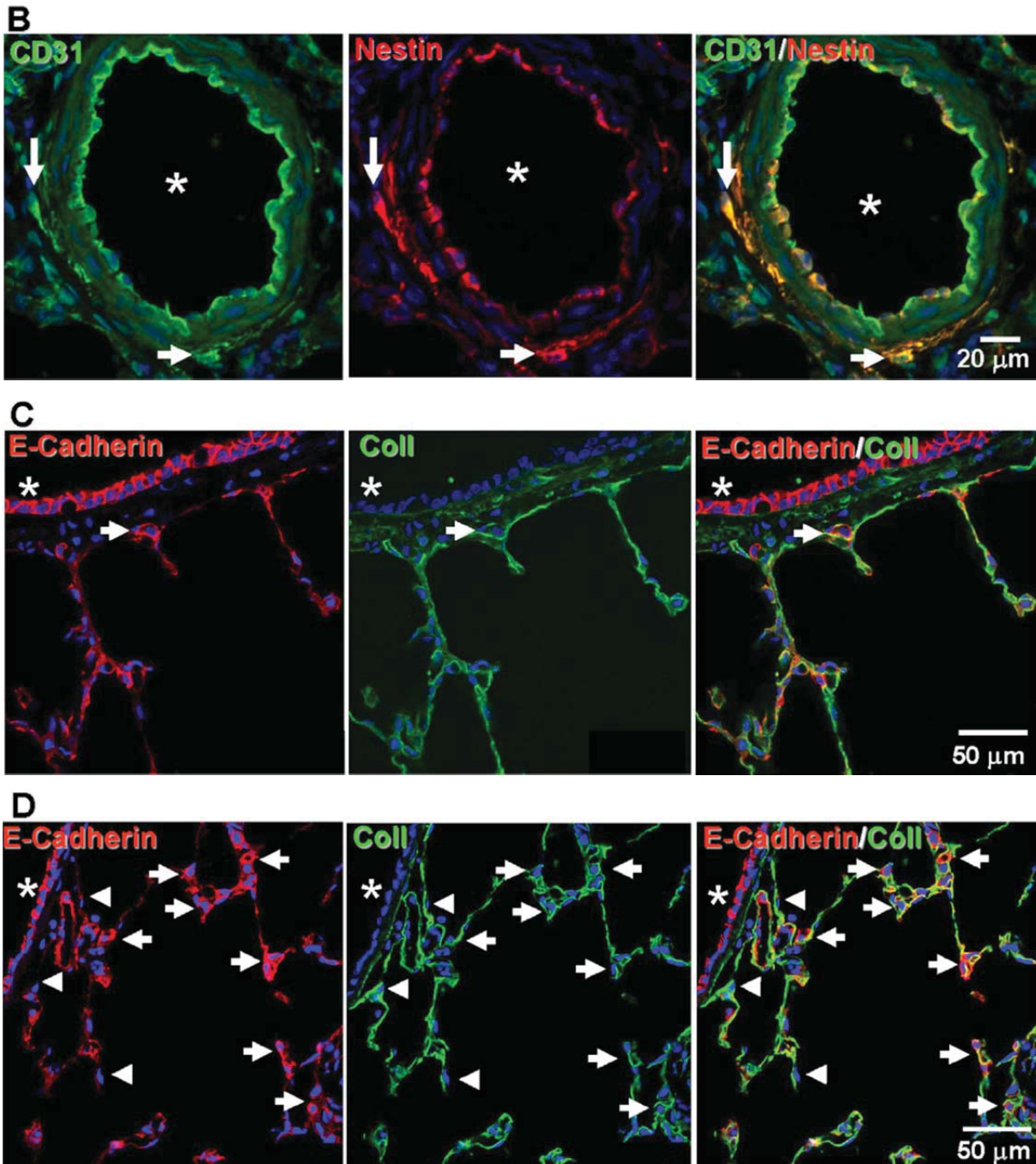


## Displaced Non-Vascular Endothelial Cells Co-Expressed Nestin and Collagen Type I in the Lungs of Hypobaric Hypoxic Rats

In normoxic rats, CD31 staining was observed exclusively in endothelial cells of lung residing blood vessels (data not shown). In the lungs of hypobaric hypoxic rats, displaced non-vascular CD31<sup>(+)</sup>-endothelial cells were detected in the perivascular region of numerous blood vessels and in the alveolar region juxtaposed to blood vessels (Figures 5A & 5B). Despite the presence of displaced non-vascular endothelial cells, CD31 protein expression in the lungs of hypobaric hypoxic rats was similar to normoxic rats (Supplemental Figure 4). An immunofluorescence approach revealed that the preponderance of displaced CD31<sup>(+)</sup>-endothelial cells exhibited a mesenchymal phenotype characterized by collagen type I and nestin co-expression (Figures 5A & 5B). Collagen type I immunoreactivity was absent in CD31<sup>(+)</sup>-endothelial cells lining the vasculature in the lungs of normal and hypobaric hypoxic rats (Figure 5A).

Figure 5

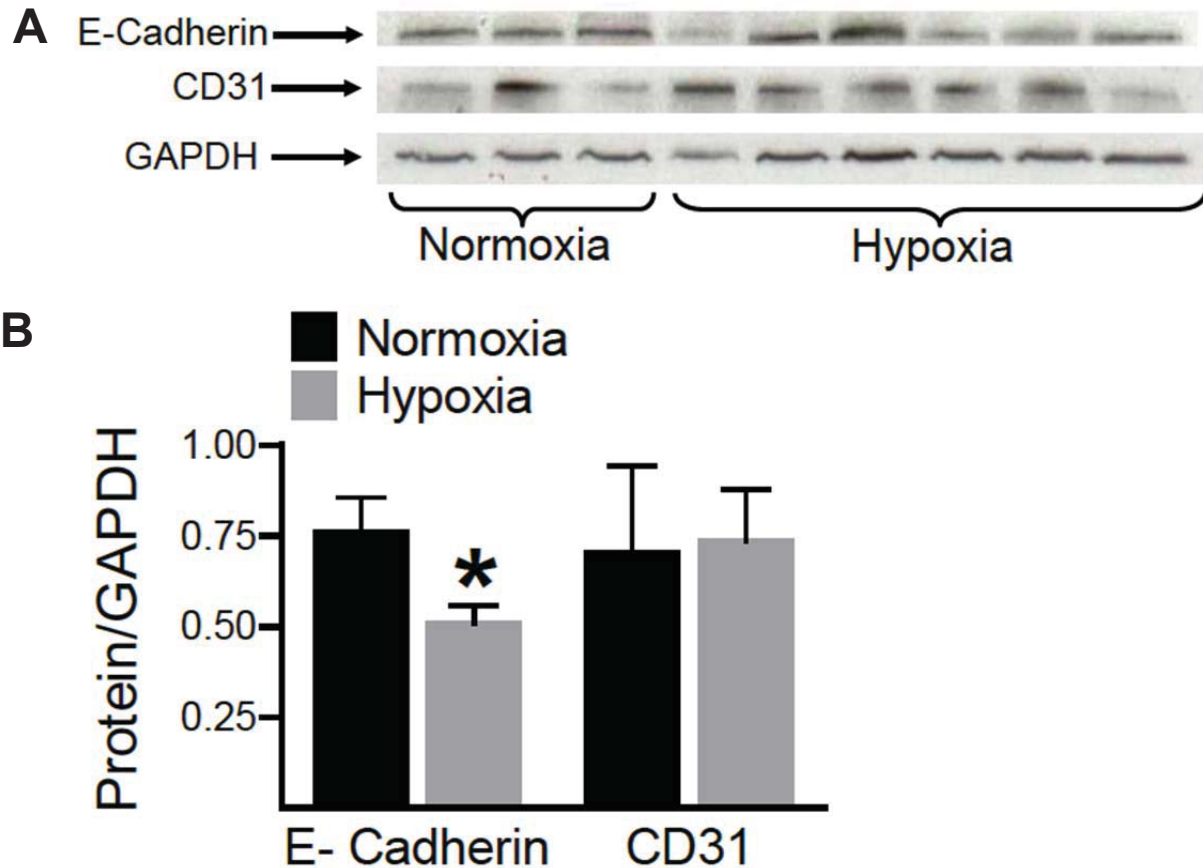




**Figure 5 : Displaced CD31<sup>(+)</sup>-endothelial cells and epithelial cells exhibit a mesenchymal phenotype in the lungs of hypobaric hypoxic rats.**

(Panel A) CD31 staining of vascular endothelial cells was evident whereas collagen type I immunoreactivity was absent (Asterisk indicates blood vessel). In contrast to normoxic rats, displaced CD31<sup>(+)</sup>-endothelial cells were detected in the perivascular and alveolar regions in the lungs of hypobaric hypoxic rats and co-expressed collagen type I (indicated by arrow). (Panel B) CD31<sup>(+)</sup>-endothelial cells detected in the perivascular region co-expressed the intermediate filament protein nestin (indicated by arrow). (Panel C) E-cadherin staining was detected in

bronchiolar and alveolar epithelial cells in the lungs of normal rats and a paucity co-expressed collagen type I (indicated by arrow). The asterisk indicates a bronchiole. **(Panel D)** In the lungs of hypobaric hypoxic rats, numerous alveolar epithelial cells acquired a mesenchymal phenotype characterized by co-expression of E-cadherin and collagen type I (indicated by arrow). Furthermore, collagen type I-immunoreactive cells lacking E-cadherin staining were also detected (indicated by arrowhead). The asterisk indicates a bronchiole. The nucleus was identified by TO-PRO<sup>3</sup> staining (blue fluorescence).



**Supplemental Figure 4 : E-cadherin and CD31 protein expression in the lungs of hypobaric hypoxic rats.**

**(Panel A & B)** E-cadherin protein levels were significantly decreased whereas CD31 protein expression remained unchanged in the lungs of rats exposed to hypobaric hypoxia. Protein expression was normalized to GAPDH protein expression n=3 normoxia rats, n=6 hypobaric hypoxic rats and (\*) denotes  $p < 0,05$  versus normoxic rats.

## **Nestin was Expressed during the Transition of Pulmonary Epithelial Cells to a Mesenchymal Phenotype**

In normoxic rats, E-cadherin staining was identified in bronchiolar and alveolar epithelial cells (Figure 5C). In the bronchioles of hypobaric hypoxic rats (Figure 5D), epithelial organization was disrupted and may in part explain the decreased protein expression of E-cadherin as compared to normoxic rats (Supplemental Figure 4). In the lungs of normoxic rats, a paucity of E-cadherin<sup>(+)</sup>-cells displaying a mesenchymal phenotype were identified via collagen type I co-expression (Figure 5C). By contrast, numerous E-cadherin<sup>(+)</sup>-cells co-expressing collagen type 1 were detected in the lungs of hypobaric hypoxic rats (Figure 5D). Based on these observations, *in vitro* experiments were performed to recapitulate the latter *in vivo* paradigm and further assess whether nestin was expressed during the transition of lung epithelial cells to a mesenchymal phenotype. The majority of primary passage E-cadherin<sup>(+)</sup>-alveolar epithelial cells cultured in FBS lacked collagen type I immunoreactivity (Figures 6A & 6E). Twenty-four hours following FBS removal, a reduction in the percentage of E-cadherin<sup>(+)</sup>-alveolar epithelial cells was associated with a concomitant increase in the percentage of spindle-like cells expressing collagen type I (Figures 6B & 6E). Further analysis revealed that residual internalized E-cadherin staining persisted in collagen type I<sup>(+)</sup>-cells reaffirming the premise that pre-existing alveolar epithelial cells acquired a mesenchymal phenotype (Figure 6C). Moreover, the transition of a subpopulation of alveolar epithelial cells to a mesenchymal phenotype following the removal of FBS was associated with the induction of the intermediate filament protein nestin (Figure 6D). During the transition of epithelial cells to a mesenchymal phenotype, 61±13% (n=4) of nestin<sup>(+)</sup>-cells co-expressed collagen type I (Figure 6D).

The acquisition of a mesenchymal phenotype by primary passage alveolar epithelial cells 24 hours following the removal of FBS was associated with the secretion of the peptide growth factor TGF- $\beta_1$  (213±42 pg/ml; n=8). Based on published data (Pain et al. 2014; Pira-Velazquez et al. 2011; Meng et al. 2013), TGF- $\beta_1$  may have acted in an autocrine fashion and initiated the transition of alveolar epithelial cells to a mesenchymal phenotype. To reaffirm the latter premise, bone morphogenic protein-7 (BMP-7; 25 ng/ml) was added to alveolar



epithelial cells immediately after the removal of FBS as the peptide growth factor was reported to inhibit TGF- $\beta_1$ -mediated epithelial mesenchymal-transition (Meng et al. 2013). The exposure of alveolar epithelial cells to BMP-7 for 24 hrs prevented E-cadherin downregulation and the concomitant induction of collagen type I (Figures 6E & 6F). By contrast, BMP-7 treatment of alveolar epithelial cells partially inhibited the expression of the intermediate filament protein nestin (Figure 6F).

**Figure 6**

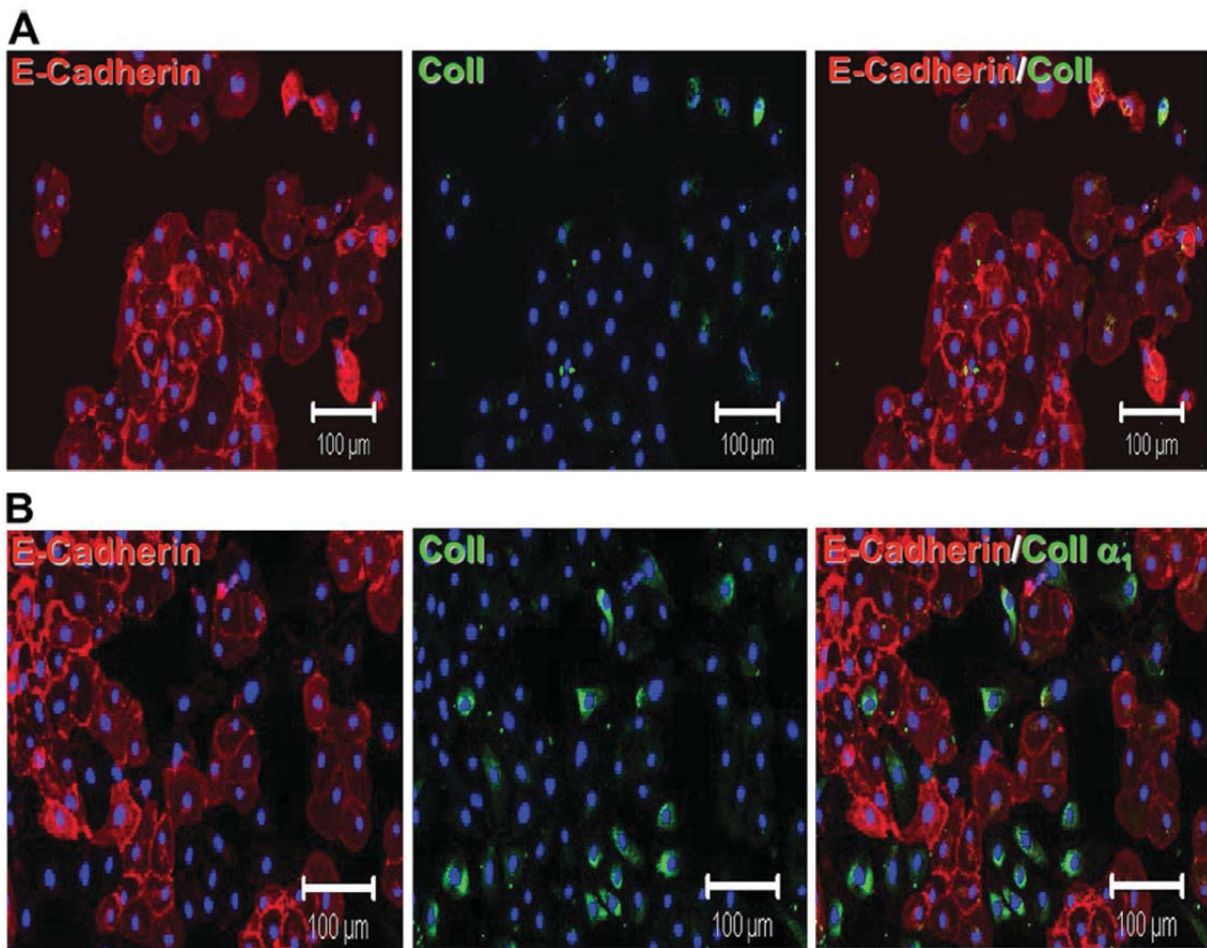
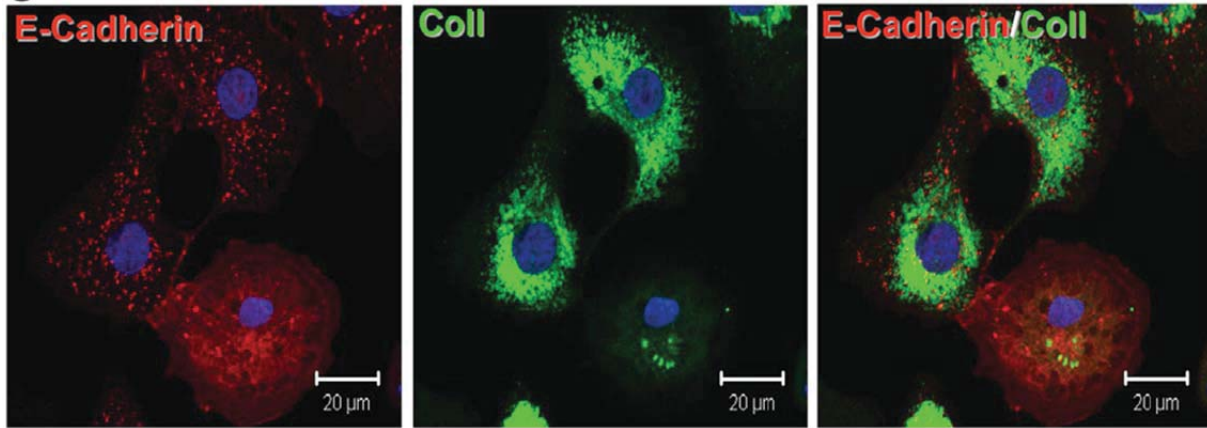
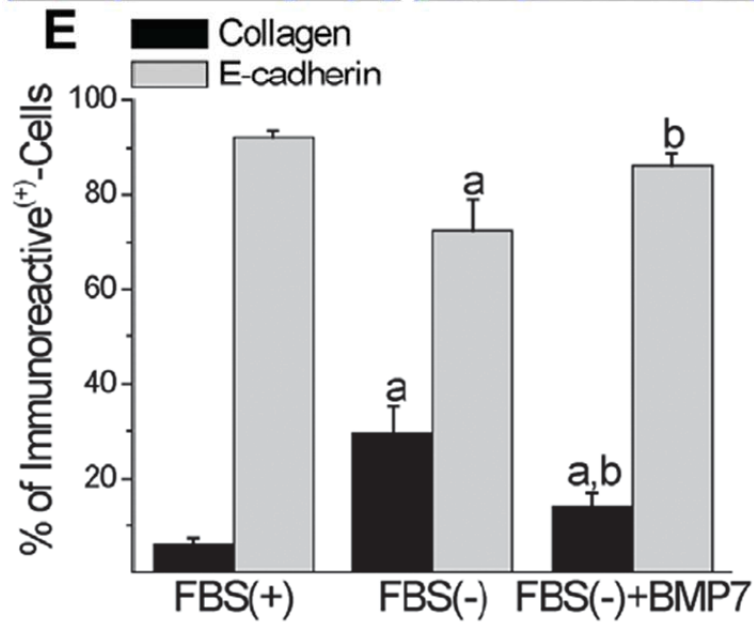
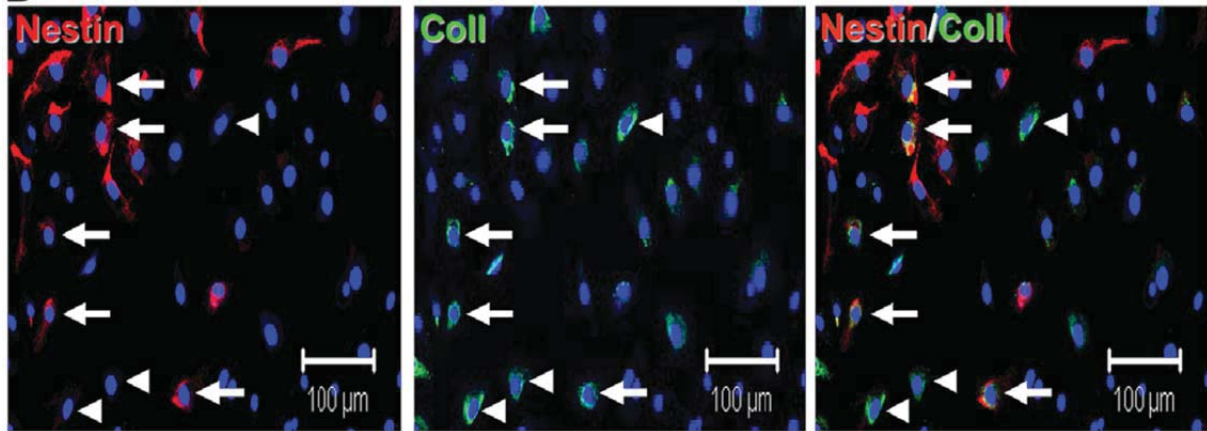


Figure 6 (Suite)

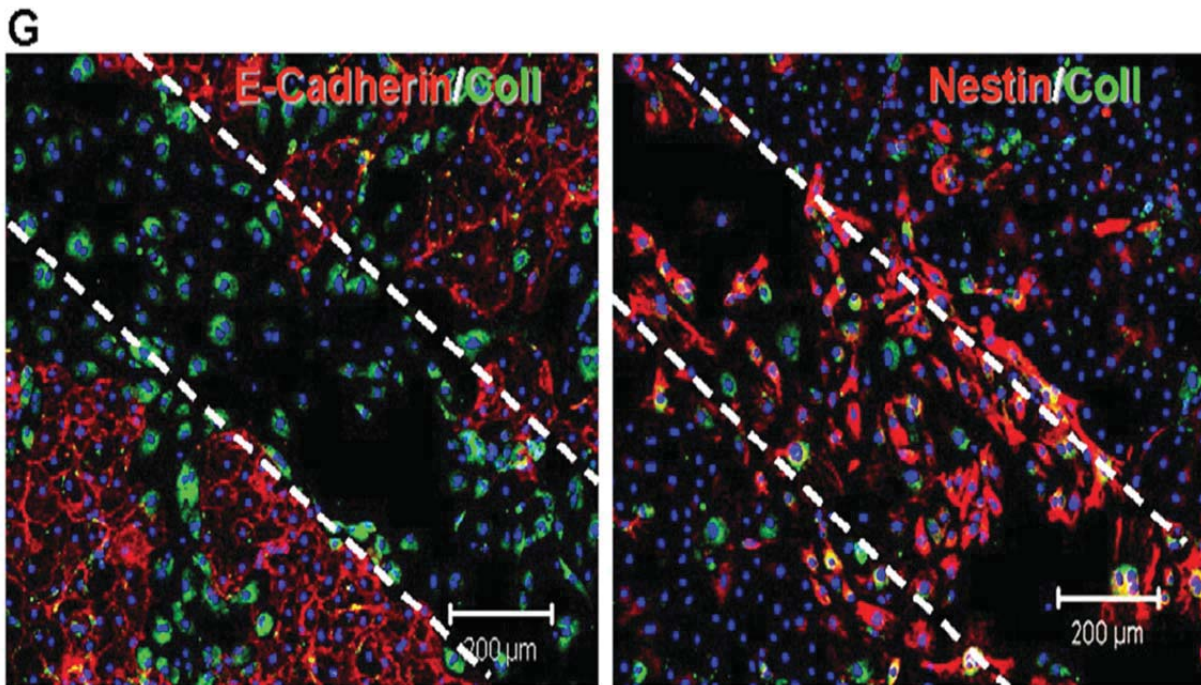
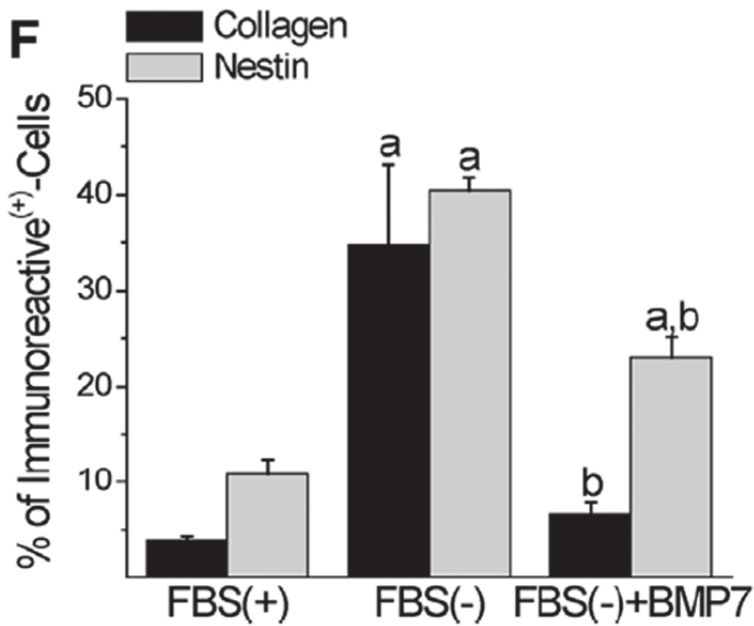
**C**



**D**







**Figure 6 : The *in vitro* transition of rat alveolar epithelial cells to a mesenchymal phenotype was associated with nestin expression.**

(Panel A) A cobblestone-like morphology and predominantly membrane E-cadherin staining was observed in primary passage normal adult rat alveolar epithelial cells grown in FBS whereas a paucity of collagen type I<sup>(+)</sup>-mesenchymal cells were detected. (Panel B) The removal of FBS for 24 hours led to a modest but significant downregulation of E-cadherin<sup>(+)</sup>-alveolar epithelial cells and increased appearance of collagen type I<sup>(+)</sup>-mesenchymal cells. (Panel C) Twenty four hours after the removal of FBS, residual and internalized E-cadherin staining was detected in

collagen type I<sup>(+)</sup>-mesenchymal cells reaffirming that pre-existing alveolar epithelial cells differentiated to a mesenchymal phenotype. **(Panel D)** Nestin staining was detected in collagen type I<sup>(+)</sup>-mesenchymal cells 24 hours following the removal of FBS from rat alveolar epithelial cells. **(Panels E & F)** Twenty-four hours following the removal of FBS (FBS(-)) from rat alveolar epithelial cells, a significant decrease in the percentage of E-cadherin<sup>(+)</sup>-alveolar epithelial cells was observed and associated with a concomitant increase in the percentage of collagen type I<sup>(+)</sup>- and nestin<sup>(+)</sup>-cells, as compared to cells plated in FBS (FBS(+)). The addition of bone morphogenic protein-7 (BMP-7; 25 ng/ml) immediately following the removal of FBS prevented the loss of E-cadherin<sup>(+)</sup>-alveolar epithelial cells, suppressed the appearance of collagen type I<sup>(+)</sup>-mesenchymal cells. By contrast, BMP-7 administration partially attenuated the appearance of nestin<sup>(+)</sup>-mesenchymal cells. N=4 independent experiments, (a) denotes  $p < 0.05$  versus in the presence of serum (FBS (+)) and (b) denotes  $P < 0.05$  versus the absence of serum (FBS (-)). **(Panel G)** The wounding of confluent alveolar epithelial cells (n=3) led to the predominant appearance of collagen type I<sup>(+)</sup>-, nestin<sup>(+)</sup>- and collagen type I/nestin<sup>(+)</sup>-mesenchymal cells within the damaged region (identified by dashed lines). The nucleus was detected by TO-PRO@3 staining (blue fluorescence).

To further establish the *in vitro* paradigm of epithelial mesenchymal-transition, alveolar epithelial cells were grown to confluency, maintained in FBS and exposed to a scratch wound. Twenty-four hours after wounding, collagen type I staining was detected in the preponderance of cells identified within the lesion area whereas E-cadherin immunoreactivity was weak or absent. (Figure 6G). Collagen type I<sup>(+)</sup>-mesenchymal cells were also observed lining the wound edge interspersed among E-cadherin<sup>(+)</sup>-alveolar epithelial cells (Figure 6G). Nestin<sup>(+)</sup>-mesenchymal cells were identified within the lesion area and lining the edge and a subpopulation co-expressed collagen type I (Figure 6G).

## 4.5 DISCUSSION

The development of pulmonary hypertension in adult male rats exposed to hypobaric hypoxia was associated with significant lung remodeling characterized by alveolar thickening, reactive fibrosis (e.g. alveolar and perivascular), vascular structural abnormalities and increased expression of nestin protein and mRNA levels. Aquaporin 5 protein expression was also robustly increased in the lungs of hypobaric hypoxic rats and may represent a compensatory response of alveolar type I epithelial cells to prevent or delay the development of pulmonary edema (She et al. 2013). By contrast, nestin protein and mRNA levels in the

hypertrophied right ventricle of hypobaric hypoxic rats were similar to normoxic rats. In this regard, the secondary development of pulmonary hypertension rather than the initial insult of hypobaric hypoxia apparently represented the primary stimulus driving the increased expression of the intermediate filament protein in the lungs. Furthermore, at least in the hypobaric hypoxic rat model, a hypertrophic response alone was also insufficient to upregulate nestin expression in the right ventricle.

Previous studies have reported that a subpopulation of myofibroblasts implicated in reactive and reparative fibrosis was characterized by nestin expression (Sakairi et al. 2007; Tomioka et al. 2010; Beguin et al. 2012; Chabot et al. 2015). In the lungs of hypobaric hypoxic rats, the increased expression of nestin may be attributed in part to the greater preponderance of collagen type I<sup>(+)</sup>-mesenchymal cells co-expressing the intermediate filament protein. To discern whether resident lung stromal cells contributed to the population of nestin/collagen type I<sup>(+)</sup>-mesenchymal cells, normal adult rat pulmonary fibroblasts were treated with putative profibrotic factors (Hardie et al. 2009). Following the isolation of pulmonary fibroblasts from normal rat lungs, a subpopulation of collagen type I<sup>(+)</sup>-cells expressed nestin. The exposure of pulmonary fibroblasts to AII modestly upregulated nestin protein levels whereas EGF treatment robustly increased protein and mRNA expression of the intermediate filament protein. Thus, the increased expression of nestin in resident stromal cells by profibrotic factors may have contributed in part to the apparent greater number of nestin/collagen type I<sup>(+)</sup>-mesenchymal cells observed in the lungs of hypobaric hypoxic rats. By contrast, smooth muscle  $\alpha$ -actin protein levels remained unchanged following a 24 hour exposure of pulmonary fibroblasts to AII and EGF. In this regard, nestin rather than smooth muscle  $\alpha$ -actin expression may represent a more appropriate marker of activated pulmonary fibroblasts during reactive fibrosis (Chabot et al. 2015). Indeed, in the lungs of hypobaric hypoxic rats, the preponderance of collagen type I<sup>(+)</sup>-cells co-expressed nestin rather than smooth muscle  $\alpha$ -actin suggesting that smooth muscle  $\alpha$ -actin expression was not required to initiate and/or sustain the reactive fibrotic response. Consistent with the latter finding, smooth muscle  $\alpha$ -actin deficiency failed to inhibit wound healing, was dispensable during reactive

fibrosis and not required in the transition of fibroblasts to a myofibroblast phenotype (Chabot et al. 2015; Takeji et al. 2006; Tomasek et al. 2013).

EndMT was reported during physiological and pathological remodeling and identified in part by the appearance of displaced endothelial cells co-expressing a mesenchymal marker (Hashimoto et al. 2010; Piera-Velazquez et al. 2011; Zeisberg et al. 2007). In the lungs of normal rats, CD31<sup>(+)</sup>-endothelial cells were detected exclusively in the vasculature and associated with variable nestin staining. In the lungs of hypobaric hypoxic rats, displaced non-vascular CD31<sup>(+)</sup>-endothelial cells that co-expressed collagen type I were detected predominantly at the perivascular fibrotic region of numerous blood vessels and the alveolar region juxtaposed to the vasculature. Moreover, a subpopulation of displaced non-vascular CD31<sup>(+)</sup>-endothelial cells co-expressed the intermediate filament protein nestin. However, it remains unknown whether nestin was expressed prior to endothelial cell displacement or induced after the acquisition of a mesenchymal phenotype. It is tempting to speculate that this particular subpopulation of displaced CD31<sup>(+)</sup>/collagen-expressing cells may have played a seminal role in the perivascular reactive fibrotic response in the lungs of hypobaric hypoxic rats.

In the lungs of hypobaric hypoxic rats, numerous epithelial cells apparently underwent type II EMT depicted by the co-expression of E-cadherin and collagen type I (Kage & Borok 2012; Yang et al. 2013; Pain et al. 2014). In type III EMT, nestin expression was identified as a novel phenotype required for proliferation and metastasis and a similar paradigm may be prevalent during Type II EMT (Ishiwata et al. 2011; Hagio et al. 2013; Matsuda et al. 2014). The removal of FBS led to the acquisition a mesenchymal phenotype by a subpopulation of primary passage adult rat alveolar epithelial cells depicted by the downregulation of E-cadherin and concomitant induction of collagen type I. Moreover, akin to that reported in type III EMT, the transition of alveolar epithelial cells to collagen type 1<sup>(+)</sup>-mesenchymal cells was associated with nestin co-expression. An analogous phenotype was observed following scratch wounding as collagen type I/nestin<sup>(+)</sup>-mesenchymal cells were detected within and along the border region of a lesion superimposed on confluent rat alveolar epithelial cells. Collectively, these data have provided the novel observation that type II EMT was associated

with nestin expression and may have further contributed in part to the appearance of a subpopulation of collagen type I/nestin<sup>(+)</sup>-fibroblasts in the lungs of hypobaric hypoxic rats. TGF- $\beta_1$  and TGF- $\beta_3$  mRNAs were increased in the fibrotic lungs of rats exposed to hypobaric hypoxia and identified as seminal mediators of EndMT and EMT (Pain et al. 2014; Piera-Velazquez et al. 2011; Meng et al. 2013). Consistent with the latter premise, the *in vitro* transition of rat alveolar epithelial cells to a mesenchymal phenotype was associated with TGF- $\beta_1$  secretion. Previous studies have reported that BMP-7 antagonized TGF- $\beta$ -mediated EMT in part via modulation of the SMAD3-dependent pathway (Meng et al. 2013; Zeisberg et al. 2005). In the present study, BMP-7 inhibited the transition of epithelial cells to collagen type I<sup>(+)</sup>-mesenchymal cells reaffirming the role of TGF- $\beta_1$  during *in vitro* EMT. By contrast, BMP-7 partially attenuated the percentage of epithelial cells that expressed the intermediate filament protein nestin. The disparate effect of BMP-7 on nestin and collagen type I expression during type II EMT may be attributed in part to the recruitment of distinct signaling events. A seminal role of SMAD3 was identified in TGF- $\beta$  mediated collagen expression and the established inhibitory action of BMP-7 on SMAD3 signaling was consistent with the suppressed induction of collagen type I in rat alveolar epithelial cells (Meng et al. 2013; Sato et al. 2003). By contrast, the proliferative response of SMAD3-null myofibroblasts in the scar of the infarcted mouse heart was intact despite the absence of collagen expression (Dobaczewski et al. 2010). Work from our lab and others have reported that the intermediate filament protein nestin was directly involved in cell proliferation (Beguin et al. 2012; Ishiwata et al. 2011; Zhao et al. 2014; Daniel et al. 2008; Xue & Yuan 2010; Tardif et al. 2015). Collectively, these observations suggest that SMAD3-dependent and -independent pathways may have been required to induce collagen type I and nestin expression respectively, during the transition of epithelial cells to a mesenchymal phenotype. Indeed, TGF- $\beta$  was reported to recruit the non-canonical signaling molecules ERK and PI3-K and recent studies have identified a seminal role of both kinases in the induction of nestin (Willis & Borok 2007; Huang et al. 2008; Oikawa et al. 2010).



## 4.6 CONCLUSION

Resident stromal cells and the transition of epithelial and endothelial cells to a mesenchymal phenotype represent distinct biological paradigms implicated in the appearance of fibroblasts during pathological lung remodeling. However, the relative role and contribution of each paradigm may be in part dependent on the nature and severity of the underlying disease. The present study has provided the novel observation that nestin represents a phenotype of resident stromal cells and epithelial cells and displaced endothelial cells that have acquired a mesenchymal phenotype. Biologically, nestin played a seminal role in cell proliferation and migration and therefore targeting the intermediate filament protein may represent a pragmatic approach to attenuate the progression of interstitial lung fibrosis regardless of the cellular origin of collagen-expressing mesenchymal cells. Lastly, these data may enhance the potential for translational research as work from our lab reported the presence of nestin<sup>(+)</sup>-cells in the alveolar and perivascular<sup>(+)</sup> regions in the lungs of patients that suffered a myocardial infarction (Chabot et al. 2015).

## 4.7 LITERATURE CITED

- Beguin PC, Gosselin H, Mamarbachi M & Calderone A. 2012. Nestin expression is lost in ventricular fibroblasts during postnatal development of the rat heart and re-expressed in scar myofibroblasts. *J Cell Physiol* 227:813-820.
- Chabot A, Jiang BH, Shi Y, Tardif JC & Dupuis, J. 2011. Role of aldosterone on lung structural remodeling and right ventricular function in congestive heart failure. *BMC Cardiovasc Disord* 11:72.
- Chabot A, Meus MA, Naud P, Hertig V, Dupuis J, Villeneuve L, El Khoury N, Fiset C, Nattel S, Jasmin JF & Calderone A. 2015. Nestin is a marker of lung remodeling secondary to myocardial infarction and type I diabetes in the rat. *J Cell Physiol* 230:170-179.
- Chartrand S & Fischer A. 2015. Management of connective tissue disease-associated interstitial lung disease. *Rheum Dis Clin North Am* 41:279-294.
- Daniel C, Albrecht H, Ludke A & Hugo C. 2008. Nestin expression in repopulating mesangial cells promotes their proliferation. *Lab Invest* 88:387-397.
- Dobaczewski M, Bujak M, Li N, Gonzalez-Quesada C, Mendoza LH, Wang XF & Frangogiannis NG. 2010. Smad3 signalling critically regulates fibroblast phenotype and function in healing myocardial infarction. *Circ Res* 107:418-428.
- Elmedal B, de Dam MY, Mulvany MJ & Simonsen U. 2004. The superoxide dismutase mimetic, tempol, blunts right ventricular hypertrophy in chronic hypoxic rats. *Br J*



*Pharmacol* 141:105-113.

- Hagio M, Matsuda Y, Suzuki T & Ishiwata T. 2013. Nestin regulates epithelial-mesenchymal transition marker expression in pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines. *Mol Clin Oncol* 1:83-87.
- Hardie WD, Glasser SW & Hagood JS. 2009. Emerging concepts in the pathogenesis of lung fibrosis. *Am J Pathol* 175:3-16.
- Hashimoto N, Phan SH, Imaizumi K, Matsuo M, Nakashima H, Kawabe T, Shimokata K & Hasegawa Y. 2010. Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43:161-172.
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmouliere A, Varga J, De Wever O, Mareel M & Gabbiani G. 2012. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol* 180:1340-1355.
- Huang YL, Shi GY, Jiang MJ, Lee H, Chou YW, Wu HL & Yang HY. 2008. Epidermal growth factor up-regulates the expression of nestin through the Ras-Raf-ERK signaling axis in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 377:361-366.
- Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, Valerius MT, McMahon AP & Duffield JS. 2010. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol* 176:85-97.
- Ishiwata T, Matsuda Y & Naito Z. 2011. Nestin in gastrointestinal and other cancers: effects on cells and tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol* 17:409-418.
- Jasmin, JF, Calderone A, Leung TK, Villeneuve L & Dupuis J. 2003. Lung structural remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: complete reversal with irbesartan. *Cardiovasc Res* 58:621-631.
- Kage H & Borok Z. 2012. EMT and interstitial lung disease: a mysterious Relationship. *Curr Opin Pulm Med* 18:517-523.
- Leroy C, Dagenais A, Berthiaume Y & Brochiero E. 2004. Molecular identity and function in transepithelial transport of K(ATP) channels in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286:L1027-L1037.
- Leroy C, Prive A, Bourret JC, Berthiaume Y, Ferraro P & Brochiero E. 2006. Regulation of ENaC and CFTR expression with K<sup>+</sup> channel modulators and effect on fluid absorption across alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291:L1207-L1219.
- Matsuda Y, Yoshimura H, Ueda J, Naito Z, Korc M & Ishiwata T. 2014. Nestin delineates pancreatic cancer stem cells in metastatic foci of NOD/Shi-scid IL2R $\gamma$ (null) (NOG) mice. *Am J Pathol* 184:674-685.
- Meng XM, Chung ACK & Lan HY. 2013. Role of the TGF- $\beta$ /BMP-7/Smad pathways in renal diseases. *Clinical Science* 124:243-254.
- Oikawa H, Hayashi K, Maesawa C, Masuda T & Sobue K. 2010. Expression profiles of nestin in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Exp Cell Res* 316:940-950.
- Pain M, Bermudez O, Lacoste P, Royer PJ, Botturi K, Tissot A, Brouard S, Eickelberg O & Magnan A. 2014. Tissue remodeling in chronic bronchial diseases: from the epithelial to mesenchymal phenotype. *Eur Respir Rev* 23:118-130.

- Pauvert O, Bonnet S, Rousseau E, Marthan R & Savineau, JP. 2004. Sildenafil alters calcium signaling and vascular tone in pulmonary arteries from chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:L577-583.
- Piera-Velazquez S, Li Z & Jimenez SA. 2011. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *Am J Pathol* 179:1074-1080.
- Raghu G & Brown KK. 2004. Interstitial lung disease: clinical evaluation and keys to an accurate diagnosis. *Clin Chest Med* 25:409-419.
- Rock JR, Barkauskas CE, Cronic MJ, Xue Y, Harris JR, Liang J, Noble PW & Hogan BL. 2011. Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:E1475-E1483.
- Sakairi T, Hiromura K, Yamashita S, Takeuchi S, Tomioka M, Ideura H, Maeshima A, Kaneko Y, Kuroiwa T, Nangaku M, Takeuchi S & Nojima Y. 2007. Nestin expression in the kidney with an obstructed ureter. *Kidney Int* 72:307-318.
- Sato M, Muragaki Y, Saika S, Roberts AB & Ooshima A. 2003. Targeted disruption of TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J Clin Invest* 112:1486-1494.
- She J, Bi J, Tong L, Song Y & Bai C. 2013. New insights of aquaporin 5 in the pathogenesis of high altitude pulmonary edema. *Diagn Pathol* 8:193.
- Su HT, Weng CC, Hsiao PJ, Chen LH, Kuo TL, Chen YW, Kuo KK & Cheng KH. 2013. Stem cell marker nestin is critical for TGF-beta1-mediated tumor progression in pancreatic cancer. *Mol Cancer Res* 11:768-779.
- Takeji M, Moriyama T, Oseto S, Kawada N, Horii M, Imai E & Miwa T. 2006. Smooth muscle  $\alpha$ -actin deficiency in myofibroblasts leads to enhanced renal tissue fibrosis. *J Biol Chem* 281:40193-40200.
- Tardif K, Hertig V, Duquette N, Villeneuve L, El-Hamamsy I, Tangauy JF & Calderone A. 2015. Nestin upregulation characterizes vascular remodeling secondary to hypertension in the rat. *Am J Physiol Heart & Circ Physiol*, 308:H1265-H1274.
- Tomasek JJ, Haaksma CJ, Schwartz RJ & Howard EW. 2013. Whole animal knockout of smooth muscle alpha-actin does not alter excisional wound healing or the fibroblast-to-myofibroblast transition. *Wound Rep Reg* 21:166-176.
- Tomioka M, Hiromura K, Sakairi T, Takeuchi S, Maeshima A, Kaneko Y, Kuroiwa T, Takeuchi T & Nojima Y. 2010. Nestin is a novel marker for renal tubulointerstitial injury in immunoglobulin A nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 15:568-574.
- Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR & Wobus AM. 2004. Nestin expression-a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* 61:2510-2522.
- Willis BC & Borok Z. 2007. TGF- $\beta$ -induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293:L525-L534.
- Xue XJ & Yuan XJ. 2010. Nestin is essential for mitogen-stimulated proliferation of neural progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 45:26-36.

- Yang J, Wheeler SE, Velikoff M, Kleaveland KR, LaFemina MJ, Frank JA, Chapman HA, Christensen PJ & Kim KK. 2013. Activated alveolar epithelial cells initiate fibrosis through secretion of mesenchymal proteins. *Am J Pathol* 183:1559-1570.
- Zhao Z, Lu P, Zhang H, Xu H, Gao N, Li M & Liu C. 2014. Nestin positively regulates the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and the proliferation, survival, and invasiveness of breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res* 16:408.
- Zeisberg M, Shah AA & Kalluri R. 2005. Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *J Biol Chem* 280:8094-8100.
- Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S & Kalluri R. 2007. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 13:952-961.

## **CHAPITRE 5 : DISCUSSION**

Globalement, l'objectif de cette thèse est d'établir l'implication de la Nestine dans le développement des processus de fibrose réparative cardiaque et de fibrose réactive pulmonaire. Un objectif secondaire de cette thèse consistait quant à lui à déterminer si les conséquences de la condition diabétique sur le remodelage cardiaque et pulmonaire sont attribuables à une altération de l'expression de la Nestine au niveau des cellules qui participent à la réponse fibrotique. Enfin, un dernier objectif secondaire de cette thèse visait à déterminer si la Nestine est un marqueur spécifique des myofibroblastes qui participent à la fibrose réactive pulmonaire, et ce, quelle que soit leur origine.

## **5.1 SOMMAIRE DES NOUVELLES DÉCOUVERTES**

### **5.1.1 NOUVELLES DÉCOUVERTES VIA L'ARTICLE 1 (CHAPITRE 2)**

Il est reconnu que les cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> (CSNPRCN<sup>(+)</sup>) participent à la fibrose réparative cardiaque en acquérant un phénotype vasculaire ou un phénotype neuronal (6, 58, 60-63). Cependant, le processus permettant la différenciation des cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal n'a pas encore été identifié jusqu'à ce jour. Avec cet article, nous avons été les premiers à établir une relation temporelle entre l'expression transitoire de la GAP43, une protéine médiatrice précoce et essentielle de la neurogenèse, et l'acquisition subséquente du phénotype neuronal par CSNPRCN<sup>(+)</sup> qui sont recrutées à la suite d'un infarctus du myocarde chez le rat. Nous avons ainsi découvert que l'induction positive de l'expression de la GAP43 s'avère un événement intermédiaire associé avec la synthèse *de novo* Neurofilament-M par une sous-population de CSNPRCN<sup>(+)</sup> lors de la fibrose réparative cardiaque.

La littérature révèle que les patients diabétiques présentent de nombreuses complications, dont une augmentation significative de la mortalité à la suite d'un infarctus du myocarde, comparativement à des patients non-diabétiques (48, 59, 65, 389, 390, 423-426). Cette disparité des taux de survie post-infarctus est attribuable à une réponse altérée de l'angiogenèse et de la neurogenèse, processus essentiels à la fibrose réparative cardiaque (59,

65, 409-411, 445-448). Toutefois, les mécanismes responsables de la réponse neurogénique inadéquate au niveau du tissu cardiaque diabétique à la suite d'un événement ischémique ne sont pas élucidés. Ce faisant, le Chapitre 2 de cette thèse a permis d'identifier pour la première fois que la réponse neurogénique cardiaque affaiblie en condition diabétique est associée avec la perte de capacité de différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal Neurofilament-M<sup>(+)</sup>. Pour ce faire, nous avons d'abord établi que la cicatrice cardiaque et le ventricule gauche non-infarci de rats ayant subi un infarctus du myocarde puis injectés à la STZ pour induire le DT1 (rats MI+STZ), présentent une réduction marquée de l'expression protéique de la Nestine, comparativement aux rats n'ayant subi qu'un infarctus du myocarde (rats MI). Notre étude a également été la première à constater qu'au niveau de la région infarciée et entourant la cicatrice cardiaque de rats MI+STZ, il y a une perte significative de la densité de fibres Neurofilament-M<sup>(+)</sup> et Neurofilament-M<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup>, comparativement aux rats simplement MI. Cependant, nous avons observé que l'expression protéique de GAP43 était similaire au niveau des tissus cardiaques cicatriciels et sains des rats MI et MI+STZ, tout comme la densité de fibres GAP43<sup>(+)</sup> et GAP43<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup>. Notre étude pionnière suggère qu'une réduction significative de l'expression protéique de la Nestine est impliquée dans la perte de capacité de différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal, associé avec une réponse neurogénique affaiblie en condition diabétique à la suite d'un événement ischémique cardiaque. Enfin, ces résultats ont été confirmés via le modèle de rats injectés au 6-hydroxydopamine (6-HD), puisque l'environnement DT1 à la STZ a sélectivement supprimé la transition des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal Neurofilament-M<sup>(+)</sup>, normalement provoqué par la dégénération des fibres sympathiques cardiaques à la suite de l'injection de 6-HD.

### **5.1.2 NOUVELLES DÉCOUVERTES VIA L'ARTICLE 2 (CHAPITRE 3)**

La littérature témoigne du rôle établi de la Nestine dans la fibrose réparative cardiaque, ainsi qu'au niveau de la fibrose réactive hépatique et rénale (6, 25, 58-64, 522-525). Il est également reconnu qu'une expression à la hausse de la Nestine au niveau des fibroblastes activés, présents au sein de ces tissus fibrotiques, est associée avec l'acquisition d'un phénotype prolifératif par ces cellules (25, 490, 518, 523-525, 533, 535, 536, 538). Toutefois,



les niveaux d'expression de la Nestine au sein des fibroblastes pulmonaires en condition physiologique et en condition de fibrose réactive pulmonaire n'ont pas été étudiés à ce jour. Ainsi, le Chapitre 3 a d'abord démontré que le tissu pulmonaire sain de rat présente des fibroblastes Nestine<sup>(+)</sup> et qu'une sous-population de ces cellules Nestine<sup>(+)</sup> arborent un phénotype de myofibroblastes pulmonaires, révélé par la co-expression d' $\alpha$ -actine du muscle lisse ( $\alpha$ -SMA). L'utilisation d'un modèle aigu de fibrose réactive pulmonaire, secondaire à un infarctus du myocarde chez le rat et caractérisé par une déposition précoce et augmentée de collagène interstitiel avant même l'instauration de l'hypertension pulmonaire, a permis d'illustrer pour la première fois que cette condition pathologique est associée avec une expression accrue d'ARNm et protéique de la Nestine au sein du tissu pulmonaire fibrotique. Via cette publication, nous avons alors établi que la Nestine est un marqueur précoce du remodelage pulmonaire, et ce, contrairement à l' $\alpha$ -SMA, dont les niveaux d'expression protéiques ne sont pas augmentés chez le modèle aigu de fibrose réactive pulmonaire. La stimulation *in vitro* de fibroblastes pulmonaires avec des facteurs pro-fibrotiques, dont l'Angiotensine II et le TGF- $\beta$ , a quant à elle augmenté significativement l'expression de la Nestine par ces cellules, mais n'a pas eu d'impact sur l'expression de miR-125b, un microRNA reconnu pour réguler la prolifération des cellules souches neurales en ciblant la région 3'UTR du gène *Nestine* (559). Ces résultats suggèrent que l'induction accrue de l'expression de la Nestine au niveau des fibroblastes pulmonaires via des stimuli pro-fibrotiques contribue à la prolifération de ces cellules et à faciliter le développement de la réponse fibrotique pulmonaire, alors que le miR-125b ne cible pas directement le gène *Nestine* des fibroblastes pulmonaires, et ne peut donc pas conséquemment moduler la prolifération de ces cellules en condition fibrotique.

Puisqu'il est avéré que les patients diabétiques développent des dysfonctions pulmonaires et de la fibrose pulmonaire lors de la progression de la pathologie (160, 457-461, 466, 467), nous avons ensuite observé l'expression de la Nestine chez un modèle de DT1 d'une semaine induit via l'injection de STZ chez le rat. Nos données démontrent cependant que chez ce modèle aigu de condition DT1, il y a absence de fibrose réactive pulmonaire associée avec une forte réduction de l'expression de la Nestine au niveau du tissu pulmonaire

diabétique. Ces données soulignent donc l'importance de l'expression de la Nestine dans le déploiement des pathologies fibrotiques. Enfin, cet article est le premier à identifier, via l'utilisation d'un modèle de souris transgéniques Nestine-GFP, une sous-population cellulaire Nestine<sup>(+)</sup>/GFP<sup>(+)</sup>/ $\alpha$ -SMA<sup>(-)</sup> au niveau des alvéoles et des bronchioles. La caractérisation de cette sous-population cellulaire Nestine<sup>(+)</sup> résidente pulmonaire, dont l'expression protéique dépend du second intron du gène *Nestine*, a permis d'observer qu'il s'agit d'une population distincte des myofibroblastes pulmonaires et qui est recrutée à la suite de l'induction d'un infarctus du myocarde chez la souris transgénique. Ces résultats suggèrent donc que l'augmentation de l'expression de la Nestine au niveau du tissu fibrotique pulmonaire serait attribuable à la fois à une augmentation de son expression au sein des myofibroblastes pulmonaires, ainsi que via le recrutement de la sous-population de cellules Nestine<sup>(+)</sup> résidentes pulmonaires.

### **5.1.3 NOUVELLES DÉCOUVERTES VIA L'ARTICLE 3 (CHAPITRE 4)**

La littérature révèle que de nombreux précurseurs des fibroblastes activés ont été identifiés lors du développement de pathologies fibrotiques, tels les cellules stromales résidentes, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les fibrocytes circulants dérivés de la moelle osseuse (23, 114). Toutefois, une controverse subsiste quant à l'origine des fibroblastes activés qui participent aux processus fibrotiques pulmonaires, puisqu'aucun marqueur spécifique des sous-populations de fibroblastes activés n'a été identifié jusqu'à présent (328, 563). Ce faisant, l'intérêt du Chapitre 4 consiste à approfondir les résultats obtenus via le Chapitre 3, où il a été déterminé qu'en condition de fibrose réactive pulmonaire aiguë à la suite d'un infarctus du myocarde chez le rat, la Nestine, plutôt que l' $\alpha$ -SMA, est un marqueur précoce des fibroblastes pulmonaires activés. Nous avons donc exploré davantage la relation entre la Nestine et le processus de fibrose réactive chronique via un modèle *in vivo* d'hypertension pulmonaire d'hypoxie hypobarique de 3 semaines chez le rat, caractérisé par une fibrose alvéolaire et périvasculaire pulmonaire, mais également par une expression accrue des niveaux d'ARNm et protéiques pulmonaires de la Nestine. L'utilisation de ce modèle nous a aussi permis d'être les premiers à détecter des cellules endothéliales CD31<sup>(+)</sup> déplacées de

l'endothélium vasculaire vers la région périvasculaire du tissu pulmonaire de rats hypoxiques, qui sont caractérisées par l'expression de marqueurs mésenchymateux, soit la Nestine et le collagène  $\alpha_1$ . Ces résultats témoignent que des cellules endothéliales peuvent donner naissance à des fibroblastes activés via le processus de transition endothélio-mésenchymateuse. L'étude du modèle *in vivo* d'hypertension pulmonaire a également permis d'observer que le développement de la fibrose pulmonaire est associé avec une perte d'expression protéique du marqueur épithélial E-Cadhérine, ainsi qu'avec une organisation perturbée des cellules épithéliales E-Cadhérine<sup>(+)</sup> au niveau des bronchioles. De plus, nous avons découvert qu'une sous-population des cellules E-Cadhérine<sup>(+)</sup> semblent acquérir un phénotype mésenchymateux, caractérisé par la co-expression du collagène  $\alpha_1$ . Afin de vérifier si les cellules épithéliales peuvent acquérir un phénotype mésenchymateux, une approche *in vitro* a été employée via l'isolation de CAE. Ainsi, 24 heures à la suite du retrait du sérum du milieu de culture, ces cellules ont démontré leur aptitude à acquérir un phénotype mésenchymateux, puisqu'une sous-population cellulaire co-exprime à la fois E-Cadhérine et le collagène  $\alpha_1$ , mais surtout ces cellules sont caractérisées par l'induction de l'expression de la Nestine. De plus, la présence de TGF- $\beta_1$  dans le milieu de culture des CAE à jeun renforce l'idée que le recrutement de fibroblastes activés soit réalisé via le processus d'EMT. Le BMP-7, un inhibiteur reconnu du processus d'EMT, a supprimé l'expression de collagène par les CAE, tout en bloquant partiellement l'expression de la Nestine, suggérant pour la première fois qu'au moins 2 voies signalétiques sont nécessaires pour permettre la transition en un phénotype fibroblastique. Enfin, l'étude *in vitro* de fibroblastes pulmonaires de rats témoins a permis de constater que la stimulation de cellules stromales résidentes via des facteurs de croissance induit l'expression de la Nestine par ces cellules. Ainsi, une découverte novatrice et fascinante de cet article est que, contrairement au dogme précédemment établi, la Nestine, plutôt que l' $\alpha$ -SMA, caractérise le phénotype des fibroblastes pulmonaires activés qui participent à la réponse de fibrose réactive pulmonaire chronique. Cette étude suggère donc qu'il serait possible d'atténuer la progression des pathologies fibrotiques pulmonaires en ciblant la Nestine, puisque cette dernière est un marqueur commun des fibroblastes pulmonaires activés qui participent aux réponses fibrotiques, et ce, qu'ils soient d'origine stromale, endothéliale ou épithéliale.

## **5.2 IMPLICATION DE LA NESTINE DANS LE REMODELAGE CARDIAQUE**

Cette thèse, ainsi que les publications des 10 dernières années d'Angelo Calderone et de ses collaborateurs, ont mis en lumière l'implication de la protéine filamenteuse intermédiaire Nestine dans le remodelage cardiaque. Plus particulièrement le rôle de la Nestine a été largement établi lors de la fibrose réparative cardiaque à la suite d'un infarctus du myocarde. L'impact du diabète sur l'expression de la Nestine a également été étudié dans l'optique de mieux comprendre la réponse affaiblie de cicatrisation cardiaque chez les patients diabétiques.

L'implication de la Nestine a également été identifiée en condition physiologique lors du développement cardiaque post-natal (25). En effet, le tissu cardiaque de rats nouveau-nés exprime fortement la Nestine et cette expression est régulée à la baisse à l'âge adulte (25). Cette perte d'expression de la Nestine est associée avec des niveaux d'ARNm et protéiques significativement réduits chez les fibroblastes ventriculaires adultes, comparativement à ceux de rats nouveau-nés (25). L'expression accrue de la Nestine chez les fibroblastes cardiaques néonataux confère à ces cellules une activité accrue de synthèse d'ADN, témoignant d'un phénotype prolifératif de ces cellules (25).

### **5.2.1 L'EXPRESSION PLÉIOTROPIQUE DE LA NESTINE AU NIVEAU DE DIVERS TYPES CELLULAIRES CARDIAQUES À LA SUITE D'UN INFARCTUS DU MYOCARDE**

Le travail des membres de notre laboratoire a permis de démontrer qu'à la suite d'un infarctus du myocarde chez le rat, il y a de nombreux types cellulaires myocardiques qui réexpriment la Nestine et qui participent au remodelage et à la fibrose réparative cardiaque, soit les fibroblastes cardiaques activés, les cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> et les cellules ressemblant à des cardiomyocytes Nestine<sup>(+)</sup> (6, 8, 25, 58-63).

### ***5.2.1.1 La Nestine et les fibroblastes cardiaques activés***

Une étude réalisée par les membres de notre laboratoire révèle qu'une sous-population de fibroblastes isolés de la cicatrice cardiaques réexpriment *de novo* la protéine filamenteuse intermédiaire Nestine (25). Il est d'ailleurs reconnu que la Nestine a un rôle biologique au niveau de la prolifération et de la migration cellulaire (25, 151, 518, 526, 532-538). Ainsi, les expérimentations de Pauline Béguin ont permis d'établir que la capacité de différents types de fibroblastes cardiaques à synthétiser de l'ADN est proportionnelle à leurs niveaux d'expression de la Nestine (25). De plus, cette étude a démontré que le blocage de l'expression de la Nestine au niveau des fibroblastes cardiaques de rats nouveau-nés, via un shRNA ciblant la Nestine, provoque une diminution de l'expression de la Nestine par ces cellules et une réduction concomitante de l'incorporation de la <sup>3</sup>H-thymidine, ce qui atteste de leur perte de capacité de synthèse d'ADN (25). Ces résultats suggèrent donc qu'une expression accrue de la Nestine par les fibroblastes cardiaques activés permet à ces cellules d'acquérir un phénotype prolifératif, afin qu'elles sécrètent massivement du collagène et qu'elles accélèrent la réponse cicatricielle cardiaque (25). L'aptitude migratoire des fibroblastes cardiaques activés a également été étudiée via l'isolation de myofibroblastes de cicatrices cardiaques de rats ayant subi un infarctus du myocarde (MI) 1 semaine plus tôt (64). Une fois la confluence de ces cellules atteinte, les myofibroblastes cicatriciels cardiaques ont été marqués au fluorescent CM-Dil, puis injectés au niveau du ventricule gauche non infarci de rat ayant subi un infarctus du myocarde 3 jours auparavant (64). Sept jours suivant la transplantation, les myofibroblastes cicatriciels marqués sont recrutés lors du processus de cicatrisation cardiaque en migrant à la région infarctée et sont retrouvés à proximité immédiate de vaisseaux sanguins (64). Toutefois, il n'a pas encore été démontré que la capacité migratoire des myofibroblastes cicatriciels cardiaques dépend d'une expression accrue de la Nestine. En effet, le phénotype migratoire cellulaire, associé avec une expression accrue de la Nestine, n'a été démontré jusqu'à présent qu'au niveau de cellules impliquées dans le développement de cancers, tels les adénocarcinomes pancréatiques et pulmonaires, les cellules souches cancéreuses mammaires, les glioblastomes, ainsi qu'au niveau du cancer de la prostate (526, 532-534, 537, 538). Il serait donc pertinent d'établir la contribution exacte de la Nestine à la migration des fibroblastes cardiaques activés.

### 5.2.1.2 La Nestine et les CSNPRCN<sup>(+)</sup>

Des cellules Nestine<sup>(+)</sup>, dont l'expression de la protéine Nestine dépend du second intron du gène *Nestine* et qui ont un phénotype de cellule souche neurale progénitrice, ont été identifiées au niveau du tissu cardiaque de manière intercalée entre les cardiomyocytes (6, 58-63, 152, 157). Ces CSNPRCN<sup>(+)</sup> contribuent de plusieurs manières à la fibrose réparative cardiaque à la suite d'un infarctus du myocarde chez le rat.

#### 5.2.1.2.1 La Nestine et la différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup>

Il a été observé que les CSNPRCN<sup>(+)</sup> participent à la cicatrisation cardiaque en se différenciant en un phénotype neuronal ou vasculaire (6, 58-62, 152). En effet, le travail de Tomita et ses collaborateurs a d'abord illustré que l'isolation de cellules Nestine<sup>(+)</sup>, au niveau de cœurs de souris néo-natales, et la mise en culture de celles-ci dans un milieu approprié, permet aux cellules Nestine<sup>(+)</sup> de se différencier *in vitro* en CMLV  $\alpha$ SMA<sup>(+)</sup>/calponine<sup>(+)</sup> (6, 152). Ce groupe a également révélé l'aptitude des cellules Nestine<sup>(+)</sup> à se différencier en un phénotype de CMLV *in vivo* (6, 152). Des expérimentations *in vivo* ont démontré que les CSNPRCN<sup>(+)</sup> peuvent aussi se différencier en un phénotype musculaire lisse et endothélial vasculaire pour ainsi agir à titre de substrat angiogénique et contribuer à la fibrose réparative cardiaque (62). En effet, des neurosphères Nestine<sup>(+)</sup>/CM-Dil<sup>(+)</sup> transplantées dans le myocarde viable de rats ayant subi un MI participent à la formation *de novo* vaisseaux sanguins au niveau de la cicatrice cardiaque en se différenciant en cellules endothéliales eNOS<sup>(+)</sup>/CM-Dil<sup>(+)</sup> et en CMLV Desmine<sup>(+)</sup>/CM-Dil<sup>(+)</sup> (62).

Les membres de notre laboratoire ont également démontré que les cellules Nestine<sup>(+)</sup>, isolées de la cicatrice cardiaque de cœurs infarcis de rats et mises en culture dans un milieu d'induction défini, se différencient *in vitro* en un phénotype neuronal, caractérisé par une expression accrue de Neurofilament-M et de  $\beta$ -tubuline de classe III et une réduction concomitante de l'expression protéique de la Nestine (58, 59, 61). De plus, ils ont observé *in vivo*, via un modèle d'infarctus du myocarde chez le rat, la présence d'élongations immunoréactives au Neurofilament-M et physiquement associées à la Nestine, qui sont



synthétisées *de novo* afin d'innover la région cicatricielle (6, 58). L'utilisation subséquente d'un modèle de transplantation cardiaque hétérotopique isogénique chez le rat a quant à lui permis d'établir qu'une sous-population de cellules résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> se différencient *in vivo* en un phénotype neuronal, mais de manière indépendante de l'hyperinnervation sympathique (6, 58). De cette façon, les CSNPRCN<sup>(+)</sup> contribuent à la neurogenèse, et ce, en collaboration avec l'hyperinnervation sympathique induite via la relâche rapide et locale de NGF par les cellules endommagées du tissu cardiaque (6, 58). Toutefois, un modèle de pompe osmotique de NGF chez le rat a révélé que la différenciation des cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal n'est pas initiée par une sécrétion de NGF, puisqu'aucune élancements Nestine<sup>(+)</sup>/Neurofilament-M<sup>(+)</sup> n'ont été détectées chez ce modèle expérimental (6, 58). Nous avons alors investigué, via la première publication de cette thèse, l'implication de la protéine GAP43 dans le processus de différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal (59).

#### **5.2.1.2.1.1 La GAP43 et la différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup>**

Plusieurs éléments ont suscité de l'intérêt quant à l'étude de la protéine GAP43 dans la neurogenèse et la fibrose réparative cardiaque. En effet, lors des processus de développement et d'apprentissage, il est reconnu que l'induction de l'expression de la protéine GAP43 est un évènement précoce et essentiel de la neurogenèse (59, 197, 199, 200). De plus, les processus de régénération de nerfs périphériques lésés sont associés avec une expression accrue de cette protéine (59, 203). Enfin, il a également été démontré que les cellules de la peau originaires de la crête neurale ont la capacité, à titre de précurseur prolifératif, de se différencier en un phénotype neuronal et que cette différenciation est associée avec une régulation à la baisse de l'expression de la Nestine et à une expression concomitante de la protéine GAP43 (59, 154). Jusqu'à présent, la régulation de l'expression temporelle de la protéine GAP43 n'a pas été étudiée dans le processus de différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal (59). Nous avons alors émis l'hypothèse que lors de l'initiation du processus de neurogenèse, essentiel à la fibrose réparative cardiaque, une régulation à la hausse et transitoire de GAP43 précède la génération *de novo* des fibres Neurofilament-M à partir d'une sous-population de cellules Nestine<sup>(+)</sup> résidentes cardiaques (59). Afin de valider notre hypothèse, nous avons

d'abord observé que très peu de fibres Nestine<sup>(+)</sup>/GAP43<sup>(+)</sup> innervent le myocarde de rat témoin et qu'à 24h suivant l'induction chirurgicale d'un infarctus du myocarde chez le rat via la ligature complète de l'artère coronaire gauche descendante antérieure, la densité des fibres Nestine<sup>(+)</sup>/GAP43<sup>(+)</sup> est augmentée significativement dans le myocarde cicatriciel et entourant la cicatrice (59). Cette densité élevée de fibres qui co-expriment à la fois la Nestine et la GAP43 est maintenue durant les 3 jours suivants, mais n'est toutefois que transitoire, puisqu'à une semaine à la suite de l'infarctus la densité de fibres Nestine<sup>(+)</sup>/GAP43<sup>(+)</sup> observée dans le myocarde cicatriciel est similaire à la densité de ces fibres observée chez les rats témoins (59). À l'inverse, les fibres Nestine<sup>(+)</sup>/Neurofilament-M<sup>(+)</sup> sont quant à elles absentes du tissu myocardique de rat témoin et de la région cicatricielle et entourant la cicatrice chez des rats ayant subi la procédure chirurgicale d'infarctus du myocarde 24 heures plus tôt (59). De plus, nous avons observé qu'à 4 jours suivant l'infarctus du myocarde, soit au moment où la phase de cicatrisation cardiaque est enclenchée à la suite des phases nécrotique et inflammatoire, la région cicatricielle et entourant la cicatrice est innervée par des fibres qui co-expriment la Nestine et le Neurofilament-M (59). Enfin, à une semaine suivant l'infarctus, la réduction de la densité de fibres Nestine<sup>(+)</sup>/GAP43<sup>(+)</sup> est associée avec une augmentation accrue de la densité des fibres Nestine<sup>(+)</sup>/Neurofilament-M<sup>(+)</sup> qui innervent la région cicatricielle (59). Nos résultats suggèrent donc que l'induction positive de l'expression de la GAP43 s'avère un événement intermédiaire, mais nécessaire qui précède la synthèse *de novo* Neurofilament-M par une sous-population de CSNPRCN<sup>(+)</sup> lors de la fibrose réparative cardiaque (59).

Certes, il existe une relation temporelle entre la présence de fibres Nestine<sup>(+)</sup>/GAP43<sup>(+)</sup> et l'apparition subséquente de fibres Nestine<sup>(+)</sup>/Neurofilament-M<sup>(+)</sup> qui innervent la région cicatricielle de cœurs infarcis de rat. Cependant, nous n'avons pas identifié pour l'instant le rôle de l'expression de la GAP43 dans la différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> à la suite d'un événement ischémique. Afin de vérifier l'imputabilité de la GAP43 à contribuer de manière essentielle à la différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal, il serait d'abord pertinent d'induire un infarctus du myocarde de manière chirurgicale chez un modèle de souris transgénique dont le gène a été invalidé pour la GAP43, et de vérifier les conséquences de l'absence de l'expression de la protéine sur la densité des fibres Nestine<sup>(+)</sup>/Neurofilament-M<sup>(+)</sup>, ainsi que sur la fonction cardiaque. Malheureusement, ce modèle de souris transgénique est

létal quelques jours à la suite de la naissance des souris, dû au rôle essentiel de la GAP43 dans le développement du système nerveux central chez les mammifères (617). Vu l'impossibilité de démontrer l'importance de la GAP43 dans la différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal *in vivo*, il faudrait réaliser une approche *in vitro*. Toutefois, la caractérisation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> isolées de cicatrices cardiaques de rats, puis différenciées en neurosphères Nestine<sup>(+)</sup>, n'a pas mesuré l'expression de la GAP43 (61). Conséquemment, il serait plus que spéculatif que de proposer de vérifier l'effet de l'inhibition *in vitro* de la GAP43 chez les neurosphères Nestine<sup>(+)</sup>, ainsi que leur capacité subséquente à se différencier en un phénotype neuronal, puisque nous ne savons pas si cette protéine y est bel et bien exprimée.

Néanmoins, si nous avons la possibilité de vérifier *in vivo* via une méthode de *silencing* l'effet de l'inhibition de la GAP43 sur la différenciation CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal, je pense que la réduction de l'expression de la GAP43 ne bloquerait qu'en partie le processus de différenciation cellulaire. Ma revue de la littérature m'a permis d'identifier que la régulation à la hausse de l'expression de la protéine GAP43 est l'un des éléments, mais n'est probablement pas le seul, qui favorise la différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal. En effet, tel que discuté un peu plus haut, une étude réalisée par Pauline Béguin et ses collaborateurs a permis d'observer qu'une infusion de NGF, via pompe osmotique, provoque l'hyperinnervation sympathique via la synthèse *de novo* de fibres Neurofilament-M<sup>(+)</sup>, visualisée par une augmentation significative de la densité de fibres Neurofilament-M<sup>(+)</sup> dans le myocarde de ces rats, comparativement à celle détectée chez les rats témoins (58). À l'inverse, l'infusion de NGF *in vivo* n'a pas induit la différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal, dû à l'absence de détection de fibres Nestine<sup>(+)</sup>/Neurofilament-M<sup>(+)</sup> dans le myocarde de ce modèle expérimental (58). Malheureusement, l'expression protéique de la GAP43 n'a pas été mesurée chez ce modèle. Néanmoins, Cao et ses collaborateurs ont quant à eux réalisé un modèle expérimental de pompe osmotique de GAP43 au niveau du ganglion stellaire gauche chez le chien (177). L'utilisation de ce modèle leur a permis d'observer que l'infusion de NGF durant 1 mois provoque la neurogenèse cardiaque, visualisée par une densité accrue de fibres GAP43<sup>(+)</sup> et de fibres tyrosine hydroxylase<sup>(+)</sup> dans le myocarde des chiens infusés, comparativement aux

chiens témoins (177). Ces résultats me permettent donc de stipuler que le modèle d'infusion de NGF chez le rat employé par les membres de notre laboratoire aurait lui aussi induit une augmentation de la densité des fibres GAP43<sup>(+)</sup>, mais que cette réponse n'était pas suffisante à elle seule pour provoquer la synthèse *de novo* de fibres Nestine<sup>(+)</sup>/Neurofilament-M<sup>(+)</sup>.

#### **5.2.1.2.1.2 Implication de l'inflammation dans la différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup>**

Selon moi, une différence fondamentale entre le modèle d'infusion de NGF et le modèle d'infarctus du myocarde chez le rat, est l'absence de l'initiation d'une réponse inflammatoire chez le modèle de pompe osmotique. Ainsi, des facteurs pro-inflammatoires pourraient eux aussi participer à l'initiation de la différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal. D'ailleurs, l'histoire a révélée à quel point la réponse inflammatoire est essentielle à une cicatrisation cardiaque efficace et adéquate (77). En effet, de nombreuses études cliniques ont révélé que l'utilisation aiguë, à la suite d'un infarctus du myocarde, de molécules anti-inflammatoires, tels les corticostéroïdes, les bloqueurs des intégrines CD18 et des inhibiteurs de la cascade du complément, provoque une réponse délétère qui est souvent associée avec une augmentation de la mortalité post-infarctus du myocarde chez les patients, et ce, malgré des résultats *in vitro* prometteurs (77, 94-98). L'administration de la Dexaméthasone (Dex), soit un glucocorticoïde ayant des actions anti-inflammatoires, chez des rats ayant subi un infarctus du myocarde provoque quant à elle une réponse cicatricielle insuffisante, visualisée par un amincissement délétère de la cicatrice cardiaque (66). Or, il est reconnu que les cellules inflammatoires, dont les macrophages, sécrètent le NGF, soit un facteur neurotrophique qui contribue à la neurogenèse et à l'angiogenèse cardiaque (72, 142). Toutefois, il est important de spécifier que le NGF peut provenir de diverses sources à la suite d'un infarctus du myocarde, puisqu'il peut être sécrété par les myofibroblastes de la cicatrice, par les fibres sympathiques, ainsi que par les cardiomyocytes endommagés (58, 60, 72, 75, 129, 144, 173). Néanmoins, une réponse inflammatoire accrue est associée avec une hyperinnervation sympathique cardiaque (191). Ainsi, la réponse altérée de fibrose réparative chez les rats MI+Dex a été associée avec une diminution significative de la densité des fibres Neurofilament-M<sup>(+)</sup> qui innervent la région cicatricielle et avec une réduction de l'expression protéique de la GAP43 au niveau du tissu cicatriciel cardiaque, comparativement aux rats MI

(66). Conséquemment, ces résultats suggèrent que la réponse inflammatoire pourrait contribuer à l'expression accrue de la GAP43 lors de la réponse de fibrose réparative cardiaque. L'administration de l'anti-inflammatoire Dexaméthasone chez des rats témoins est également associée à un mécanisme de résistance à l'insuline (65, 475, 476). Cette administration provoque également, au niveau du ventricule gauche de ces rats, une réduction significative de l'expression protéique de la Nestine, ainsi qu'une perte de la densité d'élongations Nestine<sup>(+)</sup> émanant de cellules souches neurales cardiaques, et ce, en l'absence de réponse apoptotique (65). Néanmoins, il n'a pas été déterminé si c'est l'action de la Dexaméthasone sur la réponse inflammatoire, ou plutôt son effet sur le développement de la condition pré-diabétique, qui induit la perte d'expression de la Nestine par les cellules souches neurales résidentes cardiaques (65). Malgré tout, ces études témoignent que la réponse inflammatoire pourrait potentiellement être un facteur important dans le recrutement des CSNPRCN<sup>(+)</sup> et de leur différenciation en un phénotype neuronal.

Wang et ses collègues se sont quant à eux intéressés aux interrelations entre la réponse inflammatoire et l'hyperinnervation sympathique chez un modèle d'infarctus du myocarde chez le lapin (191). Ainsi, ils ont observé qu'à 1 semaine à la suite de l'infarctus du myocarde, il y a une augmentation de la densité des fibres GAP43<sup>(+)</sup> et Tyrosine Hydroxylase<sup>(+)</sup> dans la région entourant la cicatrice, ainsi qu'une augmentation des niveaux d'ARNm du NGF et des molécules pro-inflammatoires TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , et ce comparativement à des lapins témoins (191). Ils ont ensuite administré de manière intraveineuse un inhibiteur du NF- $\kappa$ B (la pyrrolidine dithiocarbamate) à une dose de 100mg/kg/jour durant les 7 jours suivant l'induction chirurgicale d'infarctus du myocarde chez le lapin (191). Un groupe contrôle a évidemment été réalisé via l'administration d'une solution saline à des lapins MI lors des 7 jours suivant l'obstruction chirurgicale de l'artère coronaire gauche descendante antérieure (191). Le NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription ubiquitaire qui induit la réponse inflammatoire en initiant la transcription des médiateurs pro-inflammatoires, tels le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  (191). Ainsi, l'inhibiteur du NF- $\kappa$ B a provoqué une réduction de l'ARNm du NGF, ainsi qu'une réduction de la densité des fibres GAP43<sup>(+)</sup> et Tyrosine Hydroxylase<sup>(+)</sup> (191). Ils ont ensuite conclu, de manière très précipité selon moi, que l'inhibition du NF- $\kappa$ B permet de

réduire l'hyperinnervation sympathique, ce qui améliore conséquemment la fonction cardiaque en réduisant la probabilité d'arythmies cardiaques (191). Toutefois, cette équipe de recherche affirme que le traitement améliore la fonction cardiaque, et ce, sans n'avoir fait aucune mesure de la fonction cardiaque, ce que je considère comme étant une très grande faiblesse de l'article. Ces derniers doivent probablement croire que l'hyperinnervation sympathique, via le ganglion stellaire gauche, est le seul élément impliqué dans la neurogenèse cardiaque à la suite d'un événement ischémique. Toutefois, nous savons que les cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> se différencient en un phénotype neuronal à la suite de l'événement ischémique. Ainsi, je crois qu'il serait pertinent de recréer le même modèle expérimental, soit un groupe de rats témoins avec injection de saline, un groupe de rats MI avec injection de saline et un groupe de rats MI avec injection de l'inhibiteur de NF-κB, durant 7 jours consécutifs à la suite de la procédure chirurgicale. Nous pourrions alors établir si l'inflammation est impliquée dans la différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal, ainsi qu'en un phénotype vasculaire, en quantifiant la densité de fibres Nestine<sup>(+)</sup>/Neurofilament-M<sup>(+)</sup>, Nestine<sup>(+)</sup>/eNOS<sup>(+)</sup> et Nestine<sup>(+)</sup>/Desmine<sup>(+)</sup>, en mesurant les niveaux d'expression d'ARNm des facteurs pro-inflammatoires TNFα et IL-1β, mais surtout en identifiant les conséquences de cette inhibition sur la fonction cardiaque, ainsi que sur la taille et l'épaisseur de la cicatrice cardiaque. Si la réponse inflammatoire, initiée via le facteur de transcription NF-κB et les médiateurs pro-inflammatoires TNFα et IL-1β, est bel et bien impliquée dans la différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup>, alors la thérapie d'inhibiteur du NF-κB réduirait la densité de fibres Nestine<sup>(+)</sup> ayant acquis un phénotype neuronal et/ou vasculaire. La réponse de fibrose réparative altérée serait alors associée avec une fonction cardiaque significativement réduite et une cicatrice cardiaque amincie.



## **5.2.2 L'IMPACT DU DIABÈTE SUR L'EXPRESSION DE LA NESTINE PAR LES CSNPRCN<sup>(+)</sup> DANS LA RÉPONSE DE FIBROSE RÉPARATIVE CARDIAQUE**

La littérature révèle que les patients diabétiques présentent de nombreuses complications, dont une augmentation significative de la mortalité à la suite d'un infarctus du myocarde, comparativement à des patients non-diabétiques (48, 59, 65, 389, 390, 423-426). Cette disparité des taux de survie post-infarctus est attribuable à une réponse altérée de l'angiogenèse et de la neurogenèse, processus essentiels à la fibrose réparative cardiaque (59, 65, 409-411, 445-448). Chez des modèles expérimentaux de DT1 et DT2, les cœurs de ces rats présentent des niveaux significativement réduits de la protéine Nestine, mais cette réduction n'est pas attribuable à de l'apoptose cellulaire (65). Ces résultats suggèrent que l'environnement diabétique induit une réduction de l'expression protéique de la Nestine, ce qui pourrait altérer de manière importante la réponse neurogénique induite via les CSNPRCN<sup>(+)</sup> lors de la fibrose réparative cardiaque. Nous avons alors étudié l'expression de la Nestine lors du processus de neurogenèse cardiaque chez un modèle de rat qui présente le DT1 combiné à un événement ischémique cardiaque.

### ***5.2.2.1 Le modèle chimique de DT1 chez le rat via la STZ***

Dans un premier temps, nous avons recréé un modèle animal de DT1 via une injection de Streptozotocine de manière intraveineuse au niveau de la jugulaire, à raison d'une dose unique de 60 mg/kg chez des rats mâles adultes Sprague Dawley (59). La STZ est une substance analogue au glucose qui est particulièrement cytotoxique pour les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans pancréatiques, soit les cellules qui produisent l'insuline chez les mammifères (1, 618). La STZ a plusieurs fonctions. En plus de contribuer à recréer un modèle animal diabétique, cette molécule peut être utilisée à titre d'agent antimicrobien, mais également à titre d'agent alkylant dans des traitements de chimiothérapie (618). Chimiquement, la STZ est un composé de type nitroso-urée qui a une action alkylante, ce qui cause des dommages à l'ADN via la méthylation de celui-ci (618). Ces dommages à l'ADN vont surstimuler la poly(ADP-ribose) polymérase, qui tente de réparer l'ADN endommagé, ce qui vide les réserves énergétiques et mène à la nécrose des cellules  $\beta$  pancréatiques (618). La

STZ provoque de manière spécifique l'apoptose des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans, puisque cette molécule n'est reconnue que par les transporteurs GLUT2 du glucose, qui sont fortement exprimés au niveau de la membrane plasmique des cellules  $\beta$  pancréatiques (618). Ainsi, la STZ entre de manière importante au niveau de ces cellules, puis cette toxine y est accumulée et induit alors son action alkylante cytotoxique, ce qui inhibe la synthèse d'insuline et provoque chimiquement le DT1 insulino-dépendant (59, 618). Toutefois, le foie et les reins expriment des transporteurs GLUT2 et conséquemment ces organes peuvent eux aussi subir des dommages via l'injection de STZ (59, 618).

Une semaine, 10 jours et 3 semaines à la suite de l'injection de STZ chez le rat, le modèle chimique de DT1 est associé avec une hyperglycémie plasmatique majeure et une perte de poids corporelle, comparativement aux rats témoins (59, 65, 160). La fonction cardiaque des rats DT1 est également altérée, visualisée par des rythmes de contraction ( $LV + dP/dt$ ) et de relaxation ( $LV - dP/dt$ ) du ventricule gauche significativement réduits, ainsi que par des pressions artérielle moyenne et systolique du ventricule gauche grandement diminuées (59, 65, 160).

À notre avis, le modèle chimique de DT1 chez le rat, généré via l'injection de la STZ, est un modèle fiable. D'ailleurs, ce modèle a été largement employé par le passé et on dénombre 1969 articles différents sur Pubmed qui correspondent à la recherche « *Streptozotocin Type 1 diabetes* ». De plus, seuls les transporteurs GLUT2 du glucose permettent l'entrée de la molécule de STZ à l'intérieur des cellules (618). Or, l'expression de ce transporteur varie considérablement d'un organe à l'autre, ou d'un type cellulaire à l'autre. La première publication de cette thèse s'intéresse à l'expression de la Nestine au niveau des CSNPRCN<sup>(+)</sup> lors du processus de neurogenèse cardiaque affaibli par la condition diabétique. Le second article traite quant à lui de l'expression de la Nestine lors du remodelage pulmonaire diabétique. En 1974, une étude a établi la distribution de la molécule STZ 1 heure suivant son injection sous forme de [<sup>14</sup>C]Streptozotocine chez le rat (619). Ainsi, cette étude a révélé qu'il y a accumulation de la molécule radioactive au niveau de 3 organes, soit le pancréas, les reins et le foie, et que cette accumulation est supérieure à celle observée dans la

circulation sanguine (619). À l'inverse, la distribution de la [<sup>14</sup>C]STZ dans les tissus cardiaques et pulmonaires est très inférieure aux niveaux observés dans le sang (619). Jurysta et ses collaborateurs ont quant à eux établi que le transcrite du transporteur GLUT2 est exprimé de manière négligeable au niveau du cœur (0,000002) et des poumons (0,00028) de rats Wistar, comparativement aux niveaux d'expression d'ARNm du GLUT2 qui sont nettement supérieurs au sein des tissus hépatiques (0,5483), pancréatiques (0,2538) et rénaux (0,1000) (620). De plus, le transcrite de GLUT2 est indétectable au niveau du tissu ventriculaire de souris, alors que les transporteurs GLUT1, GLUT4 et GLUT8 y sont fortement exprimés (621). À l'échelle cellulaire, la littérature témoigne que les sous-types GLUT1 et GLUT3 sont fortement exprimés par les cellules souches neurales de rats adultes, alors que le transcrite d'ARNm du transporteur GLUT2 est indétectable chez ce type cellulaire (622). Le transporteur GLUT2 est également absent des fibroblastes humains, alors que les transcrits des sous-types GLUT1, GLUT3 et GLUT4 sont exprimés par ces cellules (623). Le transporteur GLUT2 du glucose semble donc absent du tissu cardiaque et pulmonaire, ainsi que des cellules souches neurales progénitrices et des fibroblastes. Enfin, l'action biologique de la STZ est limitée, puisque son temps de demi-vie suite à une injection intraveineuse n'est que d'environ 5 minutes chez la souris et de 40 minutes chez l'humain (59, 624, 625). Collectivement, ces observations suggèrent que les résultats obtenus dans cette thèse via le modèle chimique de DT1 sont attribuables à l'induction de la condition diabétique par la STZ, plutôt qu'à un effet direct de cette molécule hautement instable au niveau des organes et des cellules ciblés par ces publications.

### ***5.2.2.2 L'induction de l'infarctus du myocarde chez des rats DT1***

Afin d'étudier l'impact du DT1 sur la réponse neurogénique cardiaque, nous avons induit un infarctus du myocarde, via l'occlusion permanente de l'artère coronaire gauche descendante antérieure, chez des rats ayant reçu l'injection de STZ 3 jours auparavant (59). Malheureusement, ce protocole expérimental a été associé avec un très haut taux de mortalité chez les animaux diabétiques, soit de 70%, dans les 24h à 48h suivant la procédure chirurgicale (59). Luo et ses collègues ont quant à eux observé des résultats similaires, soit que

l'induction d'un infarctus du myocarde chez des souris DT1 provoque 2 fois plus de mortalité chez ces souris dans les 3 à 4 jours suivant la procédure chirurgicale, comparativement aux souris non-diabétiques ayant subi un infarctus du myocarde (59, 441). Dans notre étude, aucune mortalité n'a été observée chez le modèle chimique de DT1 (59). Conséquemment, la mortalité accrue chez les rats diabétiques ayant subi un infarctus du myocarde a été attribuée directement à la surimposition de l'événement ischémique (59). Puisque la viabilité de notre modèle était trop grandement affectée, alors des considérations éthiques nous ont poussés à modifier notre modèle expérimental initial (59).

### ***5.2.2.3 La surimposition du DT1 chez des rats ayant subi un infarctus du myocarde atténue la réponse neurogénique des CSNPRC<sup>(+)</sup>***

À titre de preuve de concept, nous avons adapté notre protocole expérimental initial en injectant la STZ chez des rats mâles adultes Sprague Dawley ayant subi la procédure chirurgicale d'infarctus du myocarde 3 jours au préalable (Groupe MI+STZ) (59). Conséquemment, la condition diabétique est présente lors de la phase aigüe de fibrose réparative, qui permet la formation de la cicatrice cardiaque. En effet, ce délai de 3 jours correspond au laps de temps nécessaire pour observer la genèse des fibres Neurofilament-M<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup> qui innervent la région cicatricielle et entourant la cicatrice (59). Un autre avantage de ce modèle expérimental est que la surimposition de la condition DT1 chez des rats ayant subi un MI n'induit pas de mortalité additionnelle, comparativement à la chirurgie ischémique cardiaque qui provoque une mortalité accrue chez les animaux préalablement diabétiques (59).

Tel qu'attendu, 1 semaine suivant l'injection de STZ, les rats du groupe MI+STZ présentent une hyperglycémie plasmatique importante de  $29 \pm 1$  mM comparativement aux rats non-diabétiques ayant subi la chirurgie d'infarctus du myocarde (MI), dont la glycémie est normale ( $8 \pm 1$  mM) (59). De plus, les rats MI+STZ ont une perte de poids corporelle significative, ainsi qu'une perte de poids accrue au niveau du tissu cardiaque, comparativement aux rats MI (59). La surimposition de la condition DT1 chez les rats MI a eu

pour impact d'aggraver la condition cardiaque de ces rats, visualisée par une réduction significative des facteurs  $LV + dP/dt$  et  $LV - dP/dt$ , ainsi que par une importante diminution des pressions artérielles moyenne et systolique du ventricule gauche (59). Néanmoins, la condition diabétique n'a pas eu d'effet significatif sur la cicatrice cardiaque dans son ensemble, puisque la taille et le poids de la cicatrice cardiaque étaient similaires chez les rats du groupe MI et MI+STZ (59). Cependant, les niveaux d'expression protéiques de la Nestine au sein de la cicatrice cardiaque et du ventricule gauche non infarci étaient considérablement réduits avec l'induction de la condition diabétique (59). L'expression protéique résiduelle de la Nestine avec la condition diabétique était quant à elle attribuable à la présence de cellules ressemblant à des cardiomyocytes Nestine<sup>(+)</sup> dans la région bordant la cicatrice cardiaque, ainsi qu'à une faible quantité d'élongation Nestine<sup>(+)</sup> dans la région cicatricielle et entourant la cicatrice (59).

À la suite d'un infarctus du myocarde, une densité accrue de fibres Neurofilament-M<sup>(+)</sup> contribuent à la neurogenèse cardiaque en innervant la région infarctée et bordant la cicatrice cardiaque (6, 58, 59, 61). Il est également reconnu que la majorité de ces fibres qui participent à la fibrose réparative sont associées physiquement avec des fibres Nestine<sup>(+)</sup> (6, 58, 59). La surimposition de la condition DT1 chez des rats MI a quant à elle eu pour impact de réduire significativement la densité de fibres Neurofilament-M<sup>(+)</sup> et la densité de fibres Neurofilament-M<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup> dans la zone infarctée et péri-infarctée (59). Conséquemment, une synthèse *de novo* inadéquate de fibres Neurofilament-M<sup>(+)</sup> à partir d'une sous-population de cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> peut expliquer pourquoi la neurogenèse est affaiblie lors du processus de cicatrisation cardiaque chez les rats MI+STZ (59). Puisque les niveaux d'expression protéiques de la protéine GAP43 étaient similaires chez les rats MI et MI+STZ, tant au sein de la cicatrice que du myocarde gauche non infarci, alors nous avons conclu que la réponse neurogénique affaiblie par la condition DT1 n'était pas secondaire à une modification d'expression de la GAP43, mais bien plutôt par une réduction significative de l'expression protéique de la Nestine (59). En effet, la Nestine étant fortement impliquée dans les processus de différenciation cellulaire (526, 535, 550), la régulation à la baisse de l'expression de la Nestine associée avec la condition diabétique peut constituer un mécanisme plausible quant à la suppression de la différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un

phénotype neuronal et à la réduction concomitante de la densité de fibres Neurofilament-M<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup> (59). Toutefois, ces résultats sont basés sur un modèle de preuve de concept où la condition diabétique est induite après l'événement ischémique, puisque des considérations éthiques ont empêché l'utilisation du modèle initial. Or, si nous désirons appliquer ces résultats cliniquement, il serait essentiel de vérifier les impacts d'une condition diabétique instaurée bien avant le développement de la réponse neurogénique cardiaque, puisqu'il s'agit de l'enchaînement d'événement qui est normalement vécu par les patients diabétiques. De plus, malgré un argumentaire solide faisant état de la quasi absence de transporteurs GLUT2 au niveau du cœur et des cellules souches neurales progénitrices (59, 620-622), certains pourraient être tentés de croire que les résultats observés sont secondaires à l'action de la STZ, plutôt qu'à l'induction de l'environnement diabétique. Ce faisant, si nous provoquons une réponse neurogénique cardiaque après que le DT1 soit bien implanté, alors les résultats observés seront instantanément imputables à la condition diabétique, plutôt qu'à une action directe de la STZ sur les CSNPRCN<sup>(+)</sup>. En effet, le temps de demi-vie de la STZ n'est que d'environ 5 minutes chez la souris et de 40 minutes chez l'humain (59, 624, 625). Conséquemment, il m'apparaît impossible qu'une injection unique de la drogue subsiste 1 semaine plus tard en quantités suffisantes pour provoquer un effet direct sur les organes et les cellules des rats.

#### ***5.2.2.4 Le DT1 instauré chez des rats atténue la réponse neurogénique des CSNPRCN<sup>(+)</sup> provoquée par l'administration de 6-HD***

Une étude précédemment publiée par des membres de notre laboratoire a démontré que l'administration, durant 3 jours consécutifs, de 100mg/kg/jour de 6-HD chez des rats adultes provoque la dégénérescence des fibres sympathiques cardiaques (58, 61). En effet, le 6-HD est une neurotoxine qui détruit les terminaisons nerveuses catécholaminergiques. Conséquemment, cette dégénérescence neuronale chimique a pour effet de stimuler la neurogenèse (58, 61). Ainsi, 2 jours suivant la dernière injection intraveineuse de 6-HD, le myocarde des rats présente des fibres neuronales Neurofilament-M<sup>(+)</sup> qui sont synthétisées *de novo* à partir de CSNPRCN<sup>(+)</sup> (58, 61). Nous avons alors émis l'hypothèse que la réponse



neurogénique des CSNPRCN<sup>(+)</sup>, normalement induite par une administration de 6-HD, est compromise chez des rats préalablement diabétiques (59).

L'administration de 6-HD est caractérisée par la génération *de novo* de fibres GAP43<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup> et de fibres Neurofilament-M<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup> qui innervent le myocarde gauche (59). Ainsi, la densité de ces fibres est significativement accrue chez les rats 6-HD comparativement à la densité de ces fibres présentes au sein du myocarde de rats témoins (59). L'administration de 6-HD chez des rats préalablement DT1, induit via une injection de STZ 1 semaine auparavant (STZ+6-HD), est quant à elle associée avec une réduction significative de la densité de fibres Neurofilament-M<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup> (59). Toutefois, la densité de fibres GAP43<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup> demeure similaire chez les rats du groupe 6-HD et STZ+6-HD (59). Ces résultats suggèrent que l'environnement diabétique bloque de manière sélective la différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal et la synthèse concomitante *de novo* de fibres Neurofilament-M<sup>(+)</sup>, événements qui sont normalement induits en réponse à l'administration de 6-HD (59). Cette étude vient renforcer les observations réalisées avec le modèle de rat MI 3jours auquel on impose ensuite la condition DT1 et témoigne en plus que la réponse neurogénique cardiaque des CSNPRCN<sup>(+)</sup> est entravée par la condition diabétique créée, plutôt que par l'action directe de la STZ sur ces cellules (59).

#### ***5.2.2.5 L'hyperglycémie plasmatique est-elle responsable de la réponse neurogénique altérée des CSNPRCN<sup>(+)</sup> ?***

L'utilisation des modèles MI+STZ et STZ+6-HD nous permet de conclure que l'environnement diabétique, plutôt que la molécule STZ, empêche la différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal Neurofilament-M<sup>(+)</sup>, associé avec une réponse neurogénique atténuée et une fonction cardiaque aggravée (59). Toutefois, l'emploi de ces modèles animaux n'a pas permis de déterminer si l'hyperglycémie plasmatique associée avec la condition diabétique provoque directement les effets néfastes sur la neurogenèse cardiaque (59). De manière intéressante, une étude publiée en 2014 par Kim Tardif, également membre de notre laboratoire, a illustré l'impact direct de l'hyperglycémie sur l'expression de la Nestine

par différents types cellulaires vasculaires (626). Ainsi, ses résultats démontrent que le traitement de 24h avec le D-Glucose, et non pas avec le L-Glucose ou le Mannitol, provoque une réduction significative de l'expression protéique de la Nestine au niveau de CMLV isolées d'aortes et d'artères carotidiennes de rats (626). Toutefois, la stimulation au D-Glucose n'a eu aucun impact sur les marqueurs spécifiques de la lignée cellulaire des CMLV, soit l' $\alpha$ -SMA, la caldesmone et SM-22 $\alpha$  (626). De plus, la perte d'expression protéique de la Nestine via la condition hyperglycémique a été associée avec une réduction de la capacité des CMLV à réentrer le cycle cellulaire, témoignant de manière indirecte d'une perte de capacité proliférative de ces cellules (626). Ces résultats suggèrent donc que l'hyperglycémie plasmatique provoque une régulation à la baisse de l'expression protéique de la Nestine et une réduction concomitante du caractère prolifératif des CMLV et qu'il s'agit d'un des mécanismes précoces par lesquels les maladies vasculaires s'installent chez un modèle de diabète pur (626). Une étude a également démontré que l'injection d'insuline immédiatement après l'injection de STZ (DT1) permet de diminuer les niveaux plasmatiques de glucose chez ces rats, tout en réduisant la perte de l'expression protéique cardiaque de la Nestine (65). Chez ce modèle, il existe une relation inverse entre le niveau plasmatique de glucose et l'expression protéique cardiaque de la Nestine (65).

Il serait donc fascinant d'observer si l'hyperglycémie plasmatique inhibe aussi la différenciation des CSNPRC<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal. Pour ce faire, des neurosphères Nestine<sup>(+)</sup> seraient d'abord isolées de cicatrice cardiaques de rats (62). Une fois formées, les neurosphères Nestine<sup>(+)</sup> seraient dissociées mécaniquement et mises en présence d'un média de différenciation sans sérum (61). Ces cellules témoins se différencieraient normalement en un phénotype neuronal Neurofilament-M<sup>(+)</sup>/ $\beta$ -tubuline de classe III<sup>(+)</sup> (61). À l'inverse, si la condition hyperglycémique bloque bel et bien le processus de différenciation des CSNPRC<sup>(+)</sup>, alors un traitement de 30mM de D-Glucose durant 24h et 48h réduirait significativement l'expression protéique de la Nestine et inhiberait l'apparition de l'expression des marqueurs de phénotype neuronal, soit le Neurofilament-M et la  $\beta$ -tubuline de classe III.

### ***5.2.2.6 Quels sont les impacts de la surimposition du DT1 chez des rats ayant subi un infarctus du myocarde sur la réponse angiogénique des CSNPRCN<sup>(+)</sup>?***

Puisqu'il a été démontré que la réponse neurogénique cardiaque affaiblie en condition diabétique est associée avec une perte de capacité de différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal neurofilament-M<sup>(+)</sup>, il serait également approprié d'évaluer l'effet du diabète sur la différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype de cellules vasculaires. Pour ce faire, il faudrait d'abord isoler des neurosphères (61, 62). Une fois formées, les neurosphères seraient ensuite marquées au CM-Dil, puis transplantées *in vivo* au niveau du myocarde non infarci de rats ayant subi un infarctus du myocarde 3 jours auparavant (groupe MI3J). Afin d'évaluer l'effet du diabète sur le recrutement des CSNPRCN<sup>(+)</sup> à la région cicatricielle et leur capacité à acquérir un phénotype vasculaire en condition diabétique, un autre groupe de rats MI3J recevrait la transplantation de neurosphères Nestine<sup>(+)</sup>/CMdil<sup>(+)</sup> au niveau du myocarde viable, ainsi qu'une injection *i.v.* au niveau de la veine jugulaire de 60mg/kg de STZ, afin de recréer la condition DT1 (Groupe MI3J+STZ). De plus, puisque la chirurgie d'infarctus du myocarde chirurgical peut présenter des résultats variables quant à la taille de la zone ischémique à risque produite, et ce malgré un protocole très bien établi dans notre laboratoire, il serait préférable de randomiser les rats dans les groupes MI3J ou MI3J+STZ de manière à apparier les tailles d'infarctus. Pour ce faire, il est possible de mesurer les Troponines-T plasmatiques 24h post-chirurgie, tel que décrit précédemment (295, 627). Ainsi, il serait possible de présenter les résultats comme étant uniquement imputables à la pathologie du diabète, et non pas aux différences des tailles d'ischémies produites. Donc, 3 jours à la suite de la chirurgie d'infarctus du myocarde, les rats (MI3J ou MI3J+STZ) auraient soit la transplantation de neurosphères Nestine<sup>(+)</sup> (NSP), soit l'injection de solution saline (SAL), au niveau de 4 sites d'injection du myocarde viable. Finalement, 11 jours à la suite de la transplantation cellulaire, la fonction cardiaque des rats des 4 groupes (MI3J+NSP, MI3J+STZ+NSP, MI3J+SAL, MI3J+STZ+SAL) serait mesurée avant de sacrifier ces derniers. De plus, des coupes histologiques cardiaques seraient réalisées afin d'attester la présence d'angiogenèse cardiaque et de déterminer la taille et l'épaisseur de la cicatrice, via une approche de planimétrie.

Selon mes connaissances actuelles, la transplantation des cellules souches neurales Nestine<sup>(+)</sup> dans le cœur de rat MI non-diabétique (MI3J+NSP) induirait l'apparition de la coloration CM-Dil dans des cellules endothéliales eNOS<sup>(+)</sup> et des CMLV Desmine<sup>(+)</sup>. De plus, il y aurait formation *de novo* vaisseaux sanguins marqués au CM-Dil dans la cicatrice. Cette réponse angiogénique accrue pourrait se traduire par l'épaississement de la cicatrice et une amélioration concomitante de la contractilité ventriculaire gauche comparativement aux rats du groupe MI3J+SAL. En revanche, l'environnement DT1 supprimerait la différenciation des CSN Nestine<sup>(+)</sup> en un phénotype vasculaire et la formation subséquente *de novo* vaisseaux sanguins au niveau de la cicatrice des rats MI3J+STZ+NSP. Ainsi, la contractilité du ventricule gauche ne serait pas améliorée et l'amincissement de la cicatrice demeurerait présent chez ces rats, et ce, malgré la transplantation de neurosphères Nestine<sup>(+)</sup>.

#### ***5.2.2.7 Application des résultats de l'article 1 aux patients diabétiques***

Une des complications qui affligent quotidiennement les patients diabétiques se révèle être une réponse altérée de la cicatrisation, puisque la condition diabétique entrave fortement les processus d'angiogenèse et de neurogenèse (59, 409, 447, 448). Cette première publication a permis de conclure que l'environnement diabétique est néfaste pour la cicatrisation cardiaque post événement ischémique, car elle empêche la différenciation des cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal (59). Conséquemment, la synthèse *de novo* de fibres Neurofilament-M<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup> est réduite et est associée avec une fonction cardiaque aggravée chez les rats MI+STZ comparativement aux rats MI (59). Toutefois, les conséquences biologiques de la perte de ces fibres neuronales lors de la réponse de fibrose réparative cardiaque est pour l'instant méconnue (59). Des études précédemment réalisées par des membres de notre laboratoire ont quant à elles révélé la présence d'élongations Nestine<sup>(+)</sup> résidentes du tissu cardiaque, tant cicatriciel que non infarcté, chez des patients ayant succombé soit à un infarctus du myocarde, soit à une insuffisance cardiaque (58, 61). De plus, une immunoréactivité de la Nestine a été identifiée au niveau de cellules endothéliales vasculaires de la région cicatricielle et entourant la cicatrice cardiaque d'un patient décédé 3 mois à la suite d'un infarctus du myocarde, suggérant que la différenciation de CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype vasculaire est aussi présente chez les patients

MI (61). Ces observations témoignent que des sous-populations de cellules résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup> participent à la neurogenèse et à l'angiogenèse post-ischémie myocardique chez l'humain (58, 61). Aucune étude n'a mesuré l'expression de la Nestine au niveau du tissu cicatriciel de patients diabétiques ayant succombé à l'infarctus du myocarde. Néanmoins, la présence de sous-populations de cellules Nestine<sup>(+)</sup> chez les patients MI nous permet de spéculer que les observations sur la réponse neurogénique affaiblie *in vivo* avec le modèle MI+STZ pourraient aussi s'appliquer cliniquement. Enfin, les résultats de cette étude pourraient également s'étendre à d'autres processus de cicatrisation chez l'humain, puisque des sous-populations de cellules Nestine<sup>(+)</sup> ont également été identifiées au niveau du follicule de la peau et du cerveau humain (59, 628, 629). Ainsi, ces sous-populations cellulaires Nestine<sup>(+)</sup>, isolées au niveau du tissu cérébral et dermique humain, sont analogues aux CSNPRCN<sup>(+)</sup>, car elles exhibent aussi les caractéristiques des cellules souches neurales progénitrices (59, 628, 629). En effet, ces cellules Nestine<sup>(+)</sup> peuvent former des neurosphères ou encore se différencier en un phénotype neuronal, lorsque mises en présence du milieu d'induction approprié (59, 628, 629). Conséquemment, il est possible de spéculer qu'une mauvaise cicatrisation au niveau de différents tissus chez les patients diabétiques serait attribuable à une réponse neurogénique atrophiée, révélée par une perte de capacité de différenciation des cellules Nestine<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal (59).

#### ***5.2.2.8 L'environnement affecte significativement la plasticité des CSNPN<sup>(+)</sup>***

Cette thèse et de nombreuses publications des membres du laboratoire Calderone attestent que l'environnement ischémique myocardique, induit par un infarctus du myocarde chez le rat, permet aux CSNPRCN<sup>(+)</sup> de se différencier en un phénotype vasculaire ou neuronal *in vivo* (6, 58, 59, 61, 62). Cependant, l'environnement DT1 bloque la réponse de différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal, normalement initiée à la suite d'une ischémie cardiaque *in vivo* chez le rat, alors que l'impact de la condition diabétique sur l'acquisition d'un phénotype vasculaire par les CSNPRCN<sup>(+)</sup> n'a pas encore été étudié (59).

Vu le rôle établi des CSNPRCN<sup>(+)</sup> dans l'angiogenèse et la neurogenèse cardiaque, nous avons étudié l'impact d'une augmentation de la population de cellules souches neurales

progénitrices Nestine<sup>(+)</sup> (CSNPN<sup>(+)</sup>) au sein du myocarde ischémié sur la cicatrisation cardiaque (62). D'ailleurs, la littérature révèle que la peau des rongeurs et la peau humaine présente une population de CSNPN<sup>(+)</sup> qui semble analogue *in vitro* aux CSNPRCN<sup>(+)</sup> et qui améliore la cicatrisation des plaies dermiques et neuronales lorsque transplantée *in vivo* (62, 154, 161, 164, 628, 630, 631). Ainsi, une population de CSNPN<sup>(+)</sup> embryonnaire dérivée de la peau a été isolée sous forme de sphères, puis marquées au CM-Dil et enfin transplantée dans le myocarde viable de la région entourant la cicatrice cardiaque de rats ayant subi un infarctus du myocarde 3 jours auparavant (62). Trois semaines à la suite de la transplantation cellulaire, les cellules dérivées de la peau Nestine<sup>(+)</sup>/CM-Dil<sup>(+)</sup> ont été capables de migrer à la région cicatricielle (62). Toutefois, la différenciation des cellules CSNPN<sup>(+)</sup> a été largement entravée par l'environnement ischémique myocardique, puisqu'une pénurie de cellules CM-Dil<sup>(+)</sup> présentait le phénotype neuronal, alors qu'aucune cellule CM-Dil<sup>(+)</sup> ne co-exprimait de marqueur vasculaire (62). Conséquemment, la contribution bénéfique de la transplantation cellulaire à favoriser l'angiogenèse, à limiter l'expansion de la cicatrice cardiaque et à améliorer la fonction ventriculaire cardiaque a été attribuée à la sécrétion de facteurs angiogéniques par les CSNPN<sup>(+)</sup> dérivées de la peau, plutôt qu'à la différenciation de ces cellules en un phénotype neuronal ou vasculaire (62).

Des populations de CSNPN<sup>(+)</sup> résidentes du système nerveux central (SNC) sont également reconnues pour proliférer en réponse à un accident vasculaire cérébral ischémique (632). Ces cellules, identifiées à titre d'astrocyte réactif *in vivo*, ont des caractéristiques analogues aux CSNPRCN<sup>(+)</sup> lorsqu'isolées en culture. En effet, les CSNPN<sup>(+)</sup> résidentes du SNC croissent en formant des neurosphères lorsque mises en présence avec du EGF et du bFGF et ont aussi la capacité de se différencier *in vitro* en cellules neuronales, en astrocytes et en oligodendrocytes (6, 61, 157, 527, 632). Cependant, la transplantation de CSNPN<sup>(+)</sup> dérivées d'astrocytes réactifs, isolées de souris transgéniques dont les astrocytes réactifs sont marqués de manière permanente (*GFAP-CreER*<sup>TM</sup>;*tdRFP*), a été associée avec la différenciation de ces cellules en un phénotype d'astrocyte et d'oligodendrocyte, alors que les CSNPN<sup>(+)</sup> dérivées d'astrocytes réactifs ne sont pas parvenues à acquérir un phénotype neuronal *in vivo* (632). Par contre, la transplantation de CSNPN<sup>(+)</sup> dérivées d'astrocytes réactifs devrait également être recréée au sein d'un modèle d'ischémie cérébrale afin d'observer



la capacité de ces cellules à se différencier en cellules neuronales, puisque l'environnement ischémique et l'initiation concomitante de la réponse inflammatoire semblent contribuer à la différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronal lors de la cicatrisation cardiaque (59, 65, 66). Ces différentes observations témoignent donc collectivement que l'environnement dans lequel les diverses populations de CSNPN<sup>(+)</sup> se retrouvent affecte significativement leur plasticité.

## 5.3 IMPLICATION DE LA NESTINE DANS LE REMODELAGE PULMONAIRE

### 5.3.1 L'EXPRESSION DE LA NESTINE LORS DU DÉVELOPPEMENT POST-NATAL ET À L'ÂGE ADULTE AU NIVEAU DU TISSU PULMONAIRE

Les processus de développement des tissus et la maturation des organes sont associés avec une régulation à la baisse de la protéine Nestine. En effet, les fibroblastes cardiaques adultes, les cellules musculaires développées, les neurones matures, ainsi que les cellules gliales et les astrocytes adultes perdent l'expression de la Nestine avec le développement (6, 25, 60, 484, 494, 497, 514-516). De manière similaire, lors de la maturation post-natale chez le rat et la souris, le remodelage pulmonaire est quant à lui associé avec une régulation à la baisse de l'expression protéique et d'ARNm de la Nestine, alors que l'expression protéique de l' $\alpha$ -SMA est similaire au niveau du tissu pulmonaire des rongeurs nouveau-nés et adultes (160). Des expérimentations *in vivo* ont révélé que l'expression résiduelle de la Nestine au niveau du tissu pulmonaire adulte est présente chez les fibroblastes pulmonaires qui co-expriment la Nestine, mais également chez une sous-population de myofibroblastes pulmonaires qui co-expriment en plus l' $\alpha$ -SMA, ainsi que chez une fraction des cellules endothéliales vasculaires pulmonaires (160). À l'inverse, l'expression de la Nestine est absente des CAEI aquaporine 5<sup>(+)</sup>, des CAEII qui co-expriment la protéine C du pro-surfactant et des CMLV des poumons matures (160).

L'isolation *in vitro* de fibroblastes pulmonaires adultes et néo-natals est associée avec le développement d'un phénotype myofibroblastique  $\alpha$ -SMA<sup>(+)</sup>/collagène de type 1<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup> chez les 2 populations cellulaires (160). À l'instar des poumons de rats matures, le tissu pulmonaire des rats nouveau-nés présente lui aussi une population de fibroblastes pulmonaires Nestine<sup>(+)</sup> et une sous-population de myofibroblastes pulmonaires Nestine<sup>(+)</sup>/ $\alpha$ -SMA<sup>(+)</sup>, qui sont situées parmi les alvéoles et à proximité des bronchioles (160). Cependant, comparativement au tissu pulmonaire de rats adultes, la sous-population de myofibroblastes pulmonaires Nestine<sup>(+)</sup> semble plus abondante chez les rats nouveau-nés (160). Or, la littérature témoigne que les pathologies fibrotiques pulmonaires sont caractérisées par une

présence accrue de myofibroblastes pulmonaires  $\alpha$ -SMA<sup>(+)</sup>, qui synthétisent et sécrètent des protéines de l'ECM et du collagène de manière incontrôlée (23, 109, 114, 160, 311, 327, 348). D'ailleurs, la réponse de fibrose réactive rénale est quant à elle associée avec la présence d'une importante sous-population de myofibroblastes rénaux Nestine<sup>(+)</sup>/ $\alpha$ SMA<sup>(+)</sup> (160, 524, 525). Néanmoins, la présence accrue de myofibroblastes pulmonaires Nestine<sup>(+)</sup>/ $\alpha$ SMA<sup>(+)</sup> chez les rats nouveau-nés n'est pas associée à une réponse fibrotique, puisqu'une coloration au trichrome de Masson a démontré la quasi absence de collagène au niveau des poumons de rats néonataux (160). Conséquemment, ces résultats suggèrent que la condition physiologique entrave l'acquisition d'un phénotype sécrétoire par les myofibroblastes pulmonaires nouveau-nés qui expriment la Nestine (160).

### **5.3.2 L'EXPRESSION DE LA NESTINE LORS D'UNE PATHOLOGIE FIBROTIQUE PULMONAIRE AIGÛE SECONDAIRE À L'INFARCTUS DU MYOCARDE CHEZ LE RAT**

Il est reconnu que l'induction d'un infarctus du myocarde (MI) chez le rat, via la ligature de l'artère coronaire gauche descendante antérieure, peut mener au développement de l'hypertension pulmonaire (160, 295, 311, 633). Pour ce faire, l'infarctus créé doit être de taille suffisamment importante. Ainsi, une échocardiographie réalisée à 2 semaines post-chirurgie permet d'identifier des infarctus de taille modérée à élevée, lorsque la mesure de l'anormalité du mouvement des parois du ventricule gauche est supérieure ou égale à 30% (295, 627). Il est aussi possible de déterminer si l'infarctus induit est suffisamment grand en mesurant la concentration plasmatique des Troponines-T 24 heures post-chirurgie, puisqu'un taux supérieur ou égal à 5,1  $\mu$ g/L est également associé avec des infarctus de taille modérée à élevée (295, 627). Ainsi, chez un modèle d'hypertension pulmonaire de 5 semaines chez le rat, où les infarctus de taille modérée à élevée sont sélectionnés via la mesure des Troponines-T, la taille moyenne de la cicatrice cardiaque est de 1,15 cm<sup>2</sup> (295). En plus de la taille de l'infarctus, un laps de temps minimal d'environ 2 semaines doit s'écouler pour permettre le développement de l'hypertension pulmonaire chez les rats MI (311). En effet, dès deux semaines post-chirurgie, un remodelage pulmonaire est observé, caractérisé par une augmentation du poids des lobes pulmonaires, par une déposition de collagène dans les

cloisons alvéolaires et un épaississement de la membrane alvéolo-capillaire (295, 311, 633). Un autre indice qui témoigne de l'induction de l'hypertension pulmonaire chez les rats ayant un large infarctus du myocarde depuis 2 semaines, est l'appariation concomitante d'une hypertrophie ventriculaire droite associée à une dysfonction contractile ventriculaire droite (295, 311, 633).

Le modèle employé dans la seconde publication, où les rats sont sacrifiés 1 semaine à la suite de la chirurgie d'infarctus du myocarde (rats MI 1 semaine), est quant à lui un modèle aigu de fibrose réactive pulmonaire en l'absence d'hypertension pulmonaire (160). D'abord, les infarctus créés chez le modèle MI 1 semaine étaient en moyenne plus petits comparativement à un modèle d'hypertension pulmonaire chez le rat ( $0,803\text{cm}^2$  vs  $1,150\text{cm}^2$ ) (160, 295). De plus, comparativement aux rats témoins, les rats MI 1 semaine présentent une dysfonction contractile ventriculaire gauche, mais en l'absence d'hypertrophie ou de dysfonction contractile ventriculaire droite (160). Également, une réponse précoce de remodelage pulmonaire est observée chez les rats MI 1 semaine, puisqu'une déposition accrue de collagène est détectée dans les cloisons alvéolaires, mais cette déposition n'entraîne pas une augmentation significative du poids des lobes pulmonaires (160). La déposition accrue de collagène dans les cloisons alvéolaires peut être attribuable à la présence de fibroblastes pulmonaires Nestine<sup>(+)</sup> et d'une sous-population de myofibroblastes pulmonaires Nestine<sup>(+)</sup>/ $\alpha$ -SMA<sup>(+)</sup>, situés à travers les alvéoles et à proximité des bronchioles (160). La réponse aiguë de fibrose réactive pulmonaire est également caractérisée *in vivo* par une augmentation des niveaux d'expression d'ARNm et de la protéine Nestine dans le tissu pulmonaire de rats MI 1 semaine (160). À l'inverse, l'expression protéique pulmonaire de l' $\alpha$ -SMA, de l'aquaporine 5 et de la protéine C du pro-surfactant, ainsi que la fraction de fibroblastes pulmonaires Nestine<sup>(+)</sup> qui co-expriment l' $\alpha$ -SMA est similaire chez les rats témoins et les rats MI 1 semaine (160). À la lumière de ces résultats, il paraît donc évident que la régulation à la hausse de l'expression de la Nestine, plutôt que l' $\alpha$ -actine du muscle lisse, est un marqueur précoce du remodelage pulmonaire chez le rat (160).

En plus de la déposition accrue de collagène dans les cloisons alvéolaires, le modèle de fibrose réactive pulmonaire chez le rat est associé avec un remodelage vasculaire pulmonaire (160). En effet, 1 semaine suivant l'induction de l'infarctus du myocarde chez le rat, quelques CMLV qui co-expriment la Nestine et l' $\alpha$ -SMA sont détectées *in vivo* au niveau de certains vaisseaux sanguins du tissu pulmonaire, alors qu'aucune CMLV Nestine<sup>(+)</sup> n'a été détectée au niveau du tissu pulmonaire de rat témoin (160). Ces observations nous permettent de spéculer que lors de la réponse de fibrose réactive pulmonaire chez le modèle de rats MI 1 semaine, une réponse angiogénique est induite et contribue à la synthèse *de novo* vaisseaux sanguins  $\alpha$ -SMA<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup> au niveau du tissu pulmonaire (160). Il est également reconnu que la réponse angiogénique, recrutée lors du processus de cicatrisation, est caractérisée par l'induction de l'expression de la Nestine au niveau des cellules endothéliales et CML de vaisseaux sanguins nouvellement formés (150, 151, 160, 511). Cette réponse angiogénique est également présente lors de la formation de l'endothélium angiogénique de tumeurs pulmonaires et est associée avec l'apparition de cellules endothéliales vasculaires Nestine<sup>(+)</sup> (150). D'ailleurs, des membres du laboratoire Calderone ont démontré que des cellules résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup>, dont l'expression de la protéine dépend du second intron du gène *Nestine*, contribuent à la réponse de fibrose réparative cardiaque en se différenciant en un phénotype vasculaire (62). De plus, l'isolation *in vitro* de fibroblastes pulmonaires adultes a révélé la présence d'un nombre modeste de cellules Nestine<sup>(+)</sup> qui ne co-expriment pas le collagène de type 1 et dont la morphologie est distincte de celle des fibroblastes (160). Cette observation suggère que des cellules Nestine<sup>(+)</sup>, qui ne sont ni des fibroblastes, ni des myofibroblastes, sont présentes au sein du tissu pulmonaire (160). Conséquemment, nous avons émis l'hypothèse qu'il s'agit d'une population de cellules souches neurales progénitrices Nestine<sup>(+)</sup> résidentes du tissu pulmonaire (160). Dans l'optique d'identifier cette sous-population cellulaire, nous avons employé le modèle de souris transgénique Nestine-GFP, où le second intron du gène *Nestine* est lié au rapporteur de la GFP (62, 157, 160-163). Or, la littérature révèle que le second intron du gène *Nestine* est responsable de l'expression de la protéine Nestine par les cellules souches neurales progénitrices dans le tissu cardiaque, cérébral, dermique et musculaire (6, 62, 157-159, 162, 503). L'utilisation du modèle de souris transgénique Nestine-GFP a permis d'observer un nombre restreint de cellules

Nestine<sup>(+)</sup>/GFP<sup>(+)</sup> situées au niveau des alvéoles et près des bronchioles du tissu pulmonaire de souris transgéniques matures (160). De plus, l'immunoréactivité à la GFP était absente des cellules endothéliales vasculaires cardiaques et pulmonaires de souris transgéniques adultes (62, 160). Or, il est reconnu dans la littérature que c'est le premier intron du gène *Nestine* qui permet l'expression de la Nestine par les cellules endothéliales vasculaires (6, 150, 151). Cette observation nous permet donc de valider, du moins en partie, la sélectivité de notre modèle.

Une semaine suivant l'obstruction complète de l'artère coronaire chez la souris transgénique Nestine-GFP, la population de cellules GFP<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup> au niveau du tissu pulmonaire est accrue de manière évidente, comparativement à la pénurie de cellule observée chez les souris témoins (160). D'ailleurs, l'apparition des cellules Nestine<sup>(+)</sup>, dont l'expression dépend du second intron, a pu contribuer à accroître l'expression protéique de la Nestine au sein du tissu pulmonaire des rats MI 1 semaine (160). Cependant, l'immunoréactivité à la GFP est absente des myofibroblastes pulmonaires  $\alpha$ SMA<sup>(+)</sup>, suggérant que l'expression de la Nestine chez ce type cellulaire est régulé via un intron distinct de l'intron 2. En somme, la deuxième publication a permis d'identifier une population de cellules Nestine<sup>(+)</sup> résidentes du tissu pulmonaire de rongeurs, qui est distincte des myofibroblastes pulmonaires, dont l'expression dépend du second intron du gène *Nestine* et qui est recrutée au niveau du tissu pulmonaire à la suite d'un infarctus du myocarde (160).

Il serait donc pertinent de poursuivre la caractérisation de ce type cellulaire et d'identifier la fonction physiologique de ces cellules lors du remodelage fibrotique pulmonaire. Le tissu pulmonaire étant majoritairement constitué de cellules épithéliales bronchiques, CAEI ou CAEII, il serait pertinent de vérifier si les cellules GFP<sup>(+)</sup>, chez notre modèle de souris Nestine-GFP, sont de lignée cellulaire épithéliale pulmonaire. Vu la pénurie de cellules GFP<sup>(+)</sup> au niveau du tissu pulmonaire de souris transgénique adulte (160), il serait à mon avis fortement surprenant de constater que les cellules GFP<sup>(+)</sup> co-expriment soit la E-Cadhérine, l'aquaporine 5 ou la protéine C du pro-surfactant. De plus, chez les rats MI 1 semaine, les niveaux d'expression de l'aquaporine 5 et de la protéine C du pro-surfactant sont demeurés similaires à ceux des rats témoins, suggérant que la chirurgie ischémique cardiaque n'a pas provoqué l'expression de ces protéines au niveau du tissu pulmonaire. Esmi et ses



collaborateurs ont quant à eux identifié que le second intron du gène *Nestine* est également responsable de l'expression de la Nestine par les cellules épithéliales pancréatiques (634). Conséquemment, il serait possible de déterminer si leurs résultats s'étendent à plus d'une population de cellules épithéliales. Dans un deuxième temps, il serait possible de vérifier si les cellules GFP<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup> sont, tel que nous le supposons, des cellules souches neurales progénitrices. Pour ce faire, il faudrait isoler ces cellules des lobes pulmonaires de rats MI 1 semaine et vérifier si elles ont les caractéristiques des cellules souches neuronales, soit croître sous forme de neurosphères lorsque mises en présence d'un milieu d'induction approprié, exprimer des marqueurs de cellules souches neurales (Nestine, sox 2 et musashi-1) et des gènes associés à la transcription des cellules de la crête neurale (snail, slug et sox 9), puisque les cellules souches neurales progénitrices sont dérivées de la crête neurale (6, 61, 157, 527). Si nous sommes capables d'identifier ce type cellulaire, nous pourrions enfin démontrer leur implication physiologique lors du remodelage pulmonaire post-infarctus. Nous pensons qu'elles pourraient participer à de l'angiogenèse pulmonaire, puisque les CSNPRCN<sup>(+)</sup>, dont l'expression de la Nestine est dirigée par le second intron du gène *Nestine*, ont un rôle établi à titre de substrat angiogénique (62). Nous avons également observé des cellules Nestine<sup>(+)</sup>/α-SMA<sup>(+)</sup> vasculaires pulmonaires chez les rats MI 1 semaine, alors que nous n'avons pas remarqué de cellules GFP<sup>(+)</sup>/α-SMA<sup>(+)</sup> vasculaires au niveau du tissu pulmonaire de souris transgéniques ayant subi la chirurgie d'infarctus du myocarde (160). Il est possible que la taille de l'infarctus créé chez le modèle transgénique de souris n'ait pas été de taille suffisante pour provoquer l'angiogenèse pulmonaire, mais cette information est manquante, puisque les mesures hémodynamiques n'ont pas été prises lors du sacrifice de ces animaux. Néanmoins, chez des patients ayant succombé à l'insuffisance cardiaque, de nombreuses CMLV pulmonaires Nestine<sup>(+)</sup>/αSMA<sup>(+)</sup> ont été détectées au sein de vaisseaux de petits et de grands calibres. Conséquemment, les cellules Nestine<sup>(+)</sup> identifiées au sein du tissu pulmonaire et dont l'expression de la Nestine dépend du second intron du gène *Nestine*, pourraient représenter une population de cellules souches neurales progénitrices, qui à l'instar des cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques Nestine<sup>(+)</sup>, représenteraient un substrat cellulaire angiogénique. Enfin, il serait également intéressant de vérifier si une population cellulaire analogue est également présente au sein du tissu pulmonaire humain (160).

### ***5.3.2.1 Application des observations chez les rats MI 1 semaine aux patients ayant succombé à l'insuffisance cardiaque***

Chez des patients ayant un diagnostic d'insuffisance cardiaque, mais en l'absence de pathologies pulmonaires supplémentaires, un épaissement des alvéoles est remarqué (160). À l'instar de ce qui est observé chez le rat, la pathologie d'insuffisance cardiaque humaine est associée avec la présence de cellules Nestine<sup>(+)</sup>, dont la majorité ne co-expriment pas l' $\alpha$ -SMA, et qui sont situées de manière intercalée entre les alvéoles pulmonaires ainsi qu'à proximité des bronchioles (160). Ainsi, si l'on transpose les résultats obtenus à partir du tissu pulmonaire de rat, la population cellulaire non-vasculaire et immunofluorescente pour la Nestine pourrait se composer de fibroblastes pulmonaires Nestine<sup>(+)</sup> résidents du tissu pulmonaire de patients insuffisants cardiaques (160). De plus, les biopsies de tissu pulmonaire de patients ayant succombé à l'insuffisance cardiaque révèlent également la présence de cellules endothéliales Nestine<sup>(+)</sup> et de CMLV Nestine<sup>(+)</sup>/ $\alpha$ -SMA<sup>(+)</sup> détectées au niveau de vaisseaux sanguins de petits et de grands calibres (160). Malheureusement, il nous a été impossible d'accéder à des biopsies de tissu pulmonaire d'humain sain afin d'y vérifier l'expression de la Nestine (160). Néanmoins, nous n'avons pas détecté de cellules Nestine<sup>(+)</sup>/ $\alpha$ -SMA<sup>(+)</sup> vasculaires pulmonaires chez les rats témoins (160). Puisque la réponse de remodelage pulmonaire semble similaire chez les rats MI 1 semaine et les patients ayant succombé à l'insuffisance cardiaque, il est alors possible de spéculer qu'un remodelage vasculaire pulmonaire est survenu chez les patients décédés de l'insuffisance cardiaque et que cette réponse angiogénique est caractérisée par la présence de la protéine filamenteuse intermédiaire Nestine (150, 151, 160, 511).

### **5.3.3 L'EXPRESSION DE LA NESTINE LORS DU REMODELAGE PULMONAIRE SECONDAIRE AU DT1 CHEZ LE RAT**

De nombreuses évidences témoignent que la dysfonction pulmonaire, la fibrose réactive pulmonaire et l'épaississement des alvéoles peuvent constituer des complications secondaires chez les patients diabétiques (160, 457-461, 467). Nous avons alors employé un modèle de rat DT1, via l'injection de la STZ, pour étudier l'implication de la Nestine dans la réponse fibrotique pulmonaire associée avec la condition diabétique (160). Toutefois, la phase aiguë du développement de la condition diabétique n'a pas permis d'initier la réponse de fibrose réactive pulmonaire (160). En effet, les rats STZ 1 semaine et les rats témoins présentaient des niveaux similaires de collagène pulmonaire, et ce, malgré la présence d'une hyperglycémie sévère, d'une perte de poids corporel significative et d'une réduction de la fonction ventriculaire gauche chez les rats STZ 1 semaine, comparativement aux rats témoins (160). Néanmoins, le stage précoce du développement de la condition DT1 a été associé avec une diminution significative de l'expression de la Nestine, tant le transcrit que la protéine, au niveau du tissu pulmonaire (160). D'ailleurs, la réduction marquée des cellules Nestine<sup>(+)</sup> a été principalement observée au sein des alvéoles pulmonaires des rats diabétiques, alors que l'expression de la Nestine est demeurée au sein des cellules endothéliales des poumons diabétiques (160). Conséquemment, ces résultats suggèrent que l'environnement diabétique a entraîné la déplétion d'expression de la Nestine principalement au sein des fibroblastes résidents des alvéoles pulmonaires (160). En effet, une étude réalisée précédemment par des membres de notre laboratoire a démontré que la perte d'expression de la Nestine au sein du myocarde diabétique de rat n'est pas attribuable à une déplétion de la population de CSNPRCN<sup>(+)</sup> (65). De manière analogue, il paraît donc plausible que la réduction de la Nestine au sein du tissu pulmonaire diabétique soit secondaire à une perte d'expression de la protéine filamenteuse intermédiaire par les fibroblastes pulmonaires, plutôt qu'attribuable à l'apoptose de cette population cellulaire (160). Or, vu le rôle établi de la Nestine dans la prolifération cellulaire (25, 151, 518, 526, 532-538), cette perte d'expression de la protéine au sein des fibroblastes pulmonaires de rats DT1 a pu compromettre leur capacité proliférative (160). Conséquemment, l'absence de réponse fibrotique pulmonaire chez les rats STZ 1 semaine serait potentiellement imputable à une réduction de la synthèse et de la déposition de

protéines de l'ECM par les fibroblastes pulmonaires, dont la croissance serait compromise en raison de l'expression appauvrie de la Nestine (25, 150, 160, 524, 525, 535, 536).

Il est reconnu que le système Rénine-Angiotensine est impliqué dans le développement à long terme des complications diabétiques (635, 636). Il n'est cependant pas explicite au sein de la littérature si une suractivation systémique du système Rénine-Angiotensine précède le développement des complications diabétiques (636). Toutefois, l'Angiotensine II se combine à l'hyperglycémie pour induire une réponse fibrotique (636). En effet, l'Angiotensine II a des activités pro-fibrotiques et prolifératives, en plus de ses effets hémodynamiques (467, 637). D'ailleurs, nous avons observé que la stimulation des fibroblastes pulmonaires avec l'Angiotensine II induit l'expression de la Nestine par ces cellules, ainsi que l'incorporation de la <sup>3</sup>H-thymidine, témoignant de l'acquisition d'un phénotype prolifératif par les fibroblastes (160). Or, chez un modèle de souris DT1, qui présente la pathologie de manière chronique depuis 3 mois via l'injection de STZ, la fibrose réactive pulmonaire est installée (467). L'administration d'un antagoniste des AT1R chez ces souris a bloqué la réponse de fibrose réactive pulmonaire diabétique (467). Cette étude témoigne donc de l'implication du système Rénine-Angiotensine dans le développement chronique du diabète. Dans notre étude, la condition DT1 aigüe est associée avec une réduction de l'expression de la Nestine en l'absence de réponse fibrotique pulmonaire (160). Nous spéculons que l'hyperglycémie aigüe pourrait réduire l'expression de la Nestine par les myofibroblastes pulmonaires, à l'instar de ce qui est observé chez les CMLV traités durant 24h avec du D-glucose (626), ce qui limiterait leur capacité proliférative ainsi que la réponse de fibrose réactive pulmonaire (160). À l'inverse, lorsque la pathologie DT1 est bien instaurée, la suractivation du Système Rénine-Angiotensine contribuerait à l'expression accrue de la Nestine par les fibroblastes pulmonaires, menant à une réponse fibrotique pulmonaire néfaste associée avec la condition diabétique.

### **5.3.4 L'EXPRESSION DE LA NESTINE LORS D'UNE PATHOLOGIE FIBROTIQUE PULMONAIRE CHRONIQUE CHEZ LE MODÈLE DE RAT HYPOXIQUE**

#### ***5.3.4.1 Caractérisation du modèle de rat hypoxique hypobarique d'hypertension pulmonaire***

Dans l'optique d'identifier les populations cellulaires recrutées lors de la réponse de fibrose réactive pulmonaire chronique, nous avons recréé un modèle validé d'hypertension pulmonaire (638-642). Le modèle d'hypertension pulmonaire hypoxique a été établi chez des rats mâles adultes Sprague Dawley en maintenant ces rats dans une chambre hypobarique durant 3 semaines. La pression dans la chambre a été réduite à 50,5 kPa, procurant un apport en oxygène d'environ 10%, au lieu de 20,9%, au niveau de l'air alvéolaire en raison du jeu des pressions partielles des gaz. Conséquemment, un remodelage pulmonaire est survenu dans le groupe de rats hypoxiques, démontré par une augmentation significative des ratios P1/BW (Poids du lobe pulmonaire 1 / Poids corporel), P2/BW et P5/BW. De plus, la coloration au Trichrome de Masson des tissus pulmonaires de rats hypoxiques et témoins a illustré que la condition hypobarique a provoqué une fibrose réactive pulmonaire caractérisée par un épaissement évident des cloisons alvéolaires et une augmentation significative de la déposition de collagène au sein des alvéoles pulmonaires. La réponse de fibrose réactive pulmonaire a également été attribuée à une augmentation de l'expression de l'ARNm du collagène  $\alpha_1$  de type 1, ainsi qu'à une élévation des transcrits des facteurs de croissance peptidiques pro-fibrotiques, soit le TGF- $\beta_1$  et le TGF- $\beta_3$ .

Le modèle hypoxique a aussi induit un remodelage vasculaire caractérisé par une augmentation de la déposition de collagène périvasculaire, un épaissement de la paroi vasculaire, une augmentation significative de l'aire de la paroi vasculaire et une réduction concomitante du diamètre et de l'aire de la lumière vasculaire pulmonaire. Conséquemment, nos résultats démontrent clairement que le modèle hypoxique/hypobarique est un modèle d'hypertension artérielle pulmonaire, mais également un modèle de fibrose réactive périvasculaire et alvéolaire associée avec le développement de l'hypertension pulmonaire. D'ailleurs, l'efficacité de notre modèle a également été confirmée par le fait que des

concentrations réduites d'oxygène au niveau de l'air alvéolaire des rats soumis à la condition hypobarique a causé une importante augmentation de l'hématocrite, constituant un mécanisme compensatoire afin d'améliorer l'apport en oxygène aux organes (640, 643, 644).

Le remodelage pulmonaire chez les rats hypoxiques a conduit à une sévère hypertension pulmonaire, mise en relief par la présence de l'hypertrophie ventriculaire droite. Ainsi, les mesures hémodynamiques ont révélé que les rats hypoxiques présentent une augmentation significative de la pression systolique ventriculaire droite et des indices de contractilité ( $RV + dP/dt$ ) et de relaxation ( $RV - dP/dt$ ) du ventricule droit, ainsi qu'une élévation modeste de la pression artérielle moyenne et des indices de contractilité ventriculaire gauche, comparativement aux rats témoins. Également, l'hypertrophie ventriculaire droite a été démontrée chez les rats ayant développé l'hypertension pulmonaire, via une augmentation significative de l'Indice de Fulton (Poids du Ventricule Droit / Poids combinés du ventricule gauche et du septum) et du ratio RV/BW (Poids du ventricule droit / Poids corporel). Le remodelage ventriculaire droit hypertrophique est également caractérisé par un phénotype moléculaire bien précis des transcrits d'ARNm (9, 269). En effet, l'hypertrophie cardiaque pathologique secondaire à une surcharge de pression est associée avec une augmentation des transcrits d'ARNm d'ANP, de BNP et de  $\beta$ MHC et d'une réduction de l'expression d'ARNm d' $\alpha$ MHC et de SERCA2 (9, 269, 281, 645, 646). Ainsi, au sein du ventricule droit (VD) de rat hypoxique, les niveaux d'ARNm de l'ANP et de BNP, qui sont des marqueurs de la réactivation des gènes fœtaux, ont été significativement accrus comparativement aux rats témoins. Ces résultats concordent avec la littérature qui témoigne d'une augmentation du transcrit de l'ANP au niveau du VD de rats dès 7 jours suivant l'initiation de la condition hypoxique et qui persiste jusqu'à 12 semaines d'exposition chronique à l'hypoxie (643, 644). En parallèle, chez notre modèle hypoxique, le contenu ventriculaire droit d'ARNm de l' $\alpha$ MHC a été significativement réduit. Il s'agit de l'isoforme la plus commune de la chaîne lourde de la myosine au niveau du cœur de rat mature, qui procure une haute vélocité contractile via une activité ATPase importante (643). De plus, le transcrit de la SERCA2, soit une protéine essentielle à la régulation de la contractilité cardiaque via le contrôle de l'homéostasie cardiaque des cardiomyocytes lors du couplage excitation-contraction, a



également été significativement réduit au sein du VD de notre modèle hypobarique (643). Encore une fois, ces résultats sont cohérents avec une étude qui révèle que les niveaux d'ARNm de SERCA2 et  $\alpha$ MHC dans le VD sont réduits chez des rats exposés de 4 à 12 semaines d'hypoxie chronique (643).

Malgré la présence d'hypertrophie et de remodelage ventriculaire droit chez les rats soumis à la condition hypobarique, l'absence de fibrose réactive myocardique a été constatée au sein du VD des rats hypoxiques. En effet, la faible déposition de collagène entre les cardiomyocytes, ainsi que les niveaux d'expression des transcrits des collagènes  $\alpha_1$  types 1 et 3 ont été similaires au sein des VD de rats témoins et hypoxiques. Néanmoins, nous ne pouvons pas conclure, comme d'autres (643, 644), que l'hypertrophie ventriculaire droite secondaire de l'hypertension pulmonaire constitue un processus physiologique uniquement sur la base de l'absence de déposition de collagène au niveau du ventricule droit. En effet, la réexpression de gènes fœtaux, tel l'ANP, est par définition un marqueur essentiel qui caractérise l'hypertrophie myocardique pathologique (9, 269, 281). Nous avons également observé une augmentation des transcrits de TGF- $\beta_1$  et TGF- $\beta_3$  au niveau du ventricule droit des rats soumis à la condition hypobarique. Or, ces facteurs de croissances peptidiques initient et/ou maintiennent une croissance hypertrophique des cardiomyocytes individuels en répondant à un stimulus pathologique, et non physiologique (269). Ainsi, ces résultats suggèrent que l'hypertrophie VD secondaire à l'hypertension pulmonaire est caractérisée par la réexpression des gènes fœtaux, et qu'il s'agit d'un mécanisme compensatoire pathologique qui est induit afin d'accroître la contractilité cardiaque et de maintenir une perfusion suffisante des poumons. Enfin, puisque le modèle hypobarique a su recréer les caractéristiques constitutives du remodelage pulmonaire et ventriculaire droit présents lors d'une hypertension pulmonaire secondaire à un infarctus du myocarde de grande taille (295, 296, 311, 470, 471, 633), nous croyons que les conclusions du troisième article de cette thèse peuvent également se transposer au type d'hypertension pulmonaire le plus fréquent et associé à une grande morbidité, soit les hypertensions pulmonaire attribuables aux maladies du cœur gauche (48, 336, 340, 343).

### ***5.3.4.2 La Nestine en tant que marqueur spécifique des fibroblastes pulmonaires activés***

Les fibroblastes pulmonaires activés représentent le type cellulaire principalement impliqué dans les processus de fibrose réactive initiés lors de dommages pulmonaires (23, 311, 327). Les fibroblastes activés ont pour caractéristique de produire et de sécréter davantage de protéines de l'ECM et de collagène, ainsi que de résister mieux à l'apoptose cellulaire (23, 109, 114, 311, 327). Selon un dogme actuel dans la littérature, l'élément qui distingue de manière spécifique les fibroblastes activés est l'expression de fibres de tensions  $\alpha$ -SMA<sup>(+)</sup>, ce qui confère à ces cellules un phénotype contractile ainsi que l'appartenance aux myofibroblastes (23, 109, 114). Toutefois, nous avons découvert que l'induction aiguë de la fibrose réactive pulmonaire ne modifie pas l'expression protéique de l' $\alpha$ -SMA au niveau du tissu pulmonaire (160). À l'inverse, l'expression de la protéine Nestine est significativement accrue avec le développement précoce de la condition pathologique pulmonaire (160). Ces résultats nous laissent donc présager que la Nestine, plutôt que l' $\alpha$ -SMA, est un véritable marqueur des différentes populations de fibroblastes activés qui participent aux processus de fibrose réactive pulmonaire. Par ailleurs, la littérature témoigne que l'expression de l' $\alpha$ -SMA par les fibroblastes activés n'est pas requise dans une réponse adéquate de cicatrisation des plaies (647). En effet, la réalisation d'une excision de pleine épaisseur au niveau du derme dorsal chez un modèle de souris transgénique dont le gène a été invalidé pour l' $\alpha$ -SMA, a donné lieu à un rythme de cicatrisation similaire à celui observé chez des souris sauvages (647). De plus, malgré l'absence d'expression d' $\alpha$ -SMA, des fibroblastes activés avec un phénotype contractile étaient présents au sein des plaies dermiques de ce modèle de souris dont le gène a été invalidé (647). Également, une étude réalisée par Takeji et ses collaborateurs a démontré dans un modèle de souris transgénique dont le gène a été invalidé pour l' $\alpha$ -SMA, que la réponse de fibrose réactive rénale est accrue et que les propriétés profibrotiques de ces fibroblastes rénaux activés  $\alpha$ -SMA<sup>(-)</sup> sont améliorées (648). Collectivement, ces résultats témoignent que l'expression de l' $\alpha$ -SMA n'est pas nécessaire à la transition des fibroblastes à un phénotype de myofibroblaste, ainsi qu'au développement des réponses fibrotiques (160, 647, 648).

Nous avons aussi observé *in vitro* que les fibroblastes pulmonaires Nestine<sup>(+)</sup> de rats adultes témoins sont associés avec une expression ubiquitaire de l' $\alpha$ -SMA, alors qu'*in vivo* ce n'est qu'une faible proportion des fibroblastes Nestine<sup>(+)</sup> qui co-expriment la fibre de tension  $\alpha$ -SMA (160). D'ailleurs, l'isolation d'autres types de fibroblastes pulmonaires, soit les fibroblastes pulmonaires néonataux et les fibroblastes pulmonaires activés de rats ayant subi un infarctus du myocarde, ont tous les deux mené à l'expression *in vitro* de la Nestine, ainsi qu'à l'expression ubiquitaire de l' $\alpha$ -SMA (160). Conséquemment, nous avons déduit que l'isolation et la mise en culture des fibroblastes pulmonaires provoque l'expression de l' $\alpha$ -SMA par ceux-ci, ce qui peut avoir mené à des interprétations contradictoires dans la littérature (160). Dans l'optique de confirmer que la Nestine, plutôt que l' $\alpha$ -SMA, est bel et bien un marqueur des fibroblastes activés, nous avons alors étudié son expression à travers les différentes sources cellulaires qui sont recrutées pour contribuer au développement d'une pathologie fibrotique pulmonaire chronique.

#### ***5.3.4.3 La transition des cellules épithéliales pulmonaires à un phénotype mésenchymateux est associée avec l'expression de la Nestine***

L'implication du processus d'EMT de type 2 dans le recrutement de fibroblastes activés lors du développement de fibroses réactives pulmonaires soulève une controverse dans la littérature, principalement en raison du manque de marqueur spécifique de l'activation des fibroblastes (299, 324, 325, 328, 562, 563, 565, 579-586). Afin d'établir la contribution de l'EMT au remodelage pulmonaire, nous avons alors vérifié si un remodelage de l'épithélium alvéolaire est présent chez le modèle de fibrose réactive pulmonaire et si ce remodelage est associé avec l'apparition de fibroblastes activés Nestine<sup>(+)</sup>. Nous avons d'abord constaté que le modèle de fibrose réactive pulmonaire chronique chez le rat hypoxie est défini par une augmentation significative de l'expression pulmonaire du transcrite et de la protéine Nestine, et ce, à l'instar du modèle de fibrose réactive pulmonaire aigüe chez le rat MI 1 semaine. Cette expression accrue de la Nestine au niveau des poumons de rats hypoxiques a été associée avec une augmentation de l'expression protéique de la Vimentine, afin que la Nestine puisse s'hétérodimériser (6, 490, 491). De plus, nous avons remarqué que le remodelage pulmonaire

chez le modèle d'hypertension pulmonaire est caractérisé par une présence importante de cellules Nestine<sup>(+)</sup> au sein des cloisons alvéolaires, comparativement aux rats en condition normoxique. Également, l'observation des tissus pulmonaires des rats hypoxiques a révélé que la majorité des cellules Nestine<sup>(+)</sup> ayant un phénotype mésenchymateux co-exprimaient le collagène  $\alpha_1$  de type 1, plutôt que l' $\alpha$ -SMA.

Puisque l'EMT est un processus biologique qui permet à une cellule épithéliale de se polariser et de se différencier en un phénotype mésenchymateux (299, 562-565), nous avons alors étudié l'expression de différents marqueurs épithéliaux au sein du tissu pulmonaire de rats témoins et hypoxiques. Dans un premier temps, l'immunofluorescence de tissus pulmonaires de rats sains a révélé, tel qu'attendu, que les cellules alvéolaires et bronchiques épithéliales expriment le marqueur épithélial E-Cadhérine, que cette protéine est absente du lit vasculaire et qu'une pénurie de cellules E-Cadhérine<sup>(+)</sup> co-expriment le marqueur mésenchymateux collagène  $\alpha_1$  de type 1. Le modèle de fibrose pulmonaire chronique a été associé avec une organisation interrompue, réduite et perturbée de la E-Cadhérine au niveau des cellules épithéliales pulmonaires. Cette observation qualitative a d'ailleurs été confirmée par une perte d'expression protéique significative de la E-Cadhérine au niveau du tissu pulmonaire de rats hypoxiques, comparativement aux rats en condition normoxique. De plus, chez les rats ayant subi la condition hypobarique, une population modeste de cellules E-Cadhérine<sup>(+)</sup>/Collagène  $\alpha_1$  de type 1<sup>(+)</sup> a été identifiée au sein du tissu pulmonaire, ce qui suggère que le processus d'EMT ait pu donner naissance à une sous-population de fibroblastes pulmonaires lors de la réponse fibrotique. La littérature rapporte également que ce sont principalement les CAEII qui participent aux processus d'EMT au sein du tissu pulmonaire (328, 565, 587). Ainsi, une réduction significative de l'expression de la protéine C du pro-surfactant, un marqueur reconnu des CAEII (299), a été observée au niveau du tissu pulmonaire de rats hypoxiques. Collectivement, ces résultats suggèrent donc la transition d'une sous-population de CAEII en un phénotype mésenchymateux chez le modèle chronique de fibrose réactive. À l'inverse, le tissu pulmonaire hypoxique présentait une augmentation massive de l'expression protéique de l'aquaporine 5, soit un canal exprimé à la membrane apicale des CAEI qui permet le passage exclusif des molécules d'eau (300). Ce résultat

témoigne d'une augmentation du nombre de canaux aqueux à la membrane apicale des CAEI, afin d'assurer une réabsorption adéquate des fluides alvéolaires et ainsi prévenir ou retarder la survenue d'œdème pulmonaire. D'ailleurs, un modèle de souris transgénique dont le gène a été invalidé pour l'aquaporine 5 est associé avec une présence accrue d'œdème pulmonaire en condition hypoxique (649). Ainsi, ce mécanisme compensatoire protecteur des CAEI travaille de concert avec la fibrose réactive pulmonaire. En effet, la déposition d'ECM contribue à l'épaississement de la membrane basale des cellules endothéliales capillaires et des CAE de la membrane alvéolocapillaire, afin de réduire la capacité de diffusion des fluides capillaires vers la lumière alvéolaire (23, 160, 295, 311, 331-333). De manière analogue, nombreuses sont les publications qui attestent l'absence d'œdème pulmonaire chez le modèle chronique de fibrose réactive d'hypertension pulmonaire secondaire à l'induction chirurgicale d'un infarctus du myocarde de grande taille (295, 296, 311).

Malgré la très modeste population de CAE pulmonaires qui co-expriment le phénotype mésenchymateux au niveau du tissu pulmonaire de rats hypoxiques, le processus d'EMT de type 2 peut néanmoins avoir donné naissance à des sous-populations de fibroblastes activés lors de la réponse fibrotique pulmonaire. En effet, des études de lignées cellulaires ont identifié que 36% des fibroblastes sont dérivés de l'EMT de type 2 chez un modèle chirurgical de fibrose rénale (562, 563, 566). De plus, la littérature révèle l'implication de la Nestine dans les processus d'EMT de type 3, ainsi qu'au niveau de la modulation de l'EMT de type 2 lors de la cicatrisation de la glande lacrymale lésée (487, 490, 526, 532-534, 537, 538, 600-603). Malheureusement, il nous a été impossible d'observer des cellules E-Cadhérine<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup> au niveau des poumons de notre modèle de fibrose réactive pulmonaire, puisque ces protéines sont toutes deux révélées par des anticorps monoclonaux de souris via l'approche d'immunofluorescence. Nous avons conséquemment employé une méthode *in vitro* afin d'identifier si la transition de CAE en un phénotype mésenchymateux requiert l'expression de la Nestine. Ainsi, les CAE isolées du tissu pulmonaire de rat, puis mises en culture dans un milieu contenant du sérum, présentaient une morphologie pavimenteuse, ainsi qu'une expression membranaire de la E-Cadhérine<sup>(+)</sup>, alors que la majorité n'exprimait pas le marqueur mésenchymateux. Cependant, le retrait du sérum du milieu cellulaire a provoqué 24 heures plus tard l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux par une sous-population des

CAE de 1<sup>er</sup> passage, visualisé par une augmentation du pourcentage de cellules en forme de tige collagène  $\alpha_1$  de type 1<sup>(+)</sup>, qui coïncide également avec une réduction du nombre de cellules E-Cadhérine<sup>(+)</sup>. Une expression résiduelle du marqueur épithélial était toutefois présente de manière internalisée au sein de cellules collagène  $\alpha_1$  de type 1<sup>(+)</sup>, attestant que des cellules précédemment épithéliales se sont différenciées en un phénotype mésenchymateux.

La transition d'une sous-population de CAE en un phénotype fibroblastique a également été associée avec l'expression concomitante de la Nestine par la majorité des cellules ayant acquis l'expression du collagène  $\alpha_1$  de type 1. D'ailleurs, la stimulation *in vitro* d'une réponse de cicatrisation des plaies via une lésion mécanique de CAE confluentes a mené, 24 heures plus tard, à la présence de cellules bordant le site de lésion et à l'intérieur de celui-ci. Ainsi, la majorité des cellules présentes au sein du site endommagé ont été caractérisées par la perte du phénotype épithélial et par l'acquisition concomitante du phénotype mésenchymateux, attesté par l'identification de diverses sous-populations cellulaires fibroblastiques Nestine<sup>(+)</sup>, collagène  $\alpha_1$  de type 1<sup>(+)</sup> et collagène  $\alpha_1$  de type 1<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup>. Conséquemment, les expérimentations du troisième article de cette thèse témoignent que le programme d'EMT induit *in vitro* est associé avec une expression accrue de la Nestine par les cellules qui ont acquis le phénotype fibroblastiques, ce qui suggère que le processus d'EMT de type 2 aurait pu contribuer à l'apparition d'une sous-population de fibroblastes activés Nestine<sup>(+)</sup> au sein du tissu pulmonaire de rats ayant développé l'hypertension pulmonaire. Néanmoins, cette découverte novatrice réalisée via des études *in vitro* devra être confirmée *in vivo*. Subséquemment, des études approfondies de lignée cellulaire, via la production de souris exprimant exclusivement la  $\beta$ -galactosidase au sein des lignées de cellules épithéliales pulmonaires (579), permettraient de confirmer nos résultats. Selon mes connaissances actuelles, l'induction de la condition hypobarique chez ces souris provoquerait l'apparition d'une sous-population cellulaire mésenchymateuse LacZ<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup> qui participe à la fibrose réactive pulmonaire, ce qui attesterait incontestablement du rôle de la Nestine dans le programme d'EMT de type 2 pulmonaire.



#### ***5.3.4.4 La transition des cellules endothéliales pulmonaires à un phénotype mésoenchymateux est associée avec l'expression de la Nestine***

Il est reconnu que le remodelage pathologique pulmonaire recrute le programme de transition endothélio-mésenchymateuse, attesté par l'apparition de cellules qui co-expriment à la fois des marqueurs endothéliaux et des marqueurs mésoenchymateux au sein des tissus fibrotiques pulmonaires (137, 342, 604, 606, 607, 611). Toutefois, l'implication de la protéine filamenteuse intermédiaire Nestine lors des processus d'EndMT est pour l'instant méconnue. Afin d'établir le rôle de la Nestine dans l'apparition de fibroblastes activés de diverses origines, nous avons vérifié si le processus d'EndMT est recruté chez le modèle chronique de fibrose réactive pulmonaire et s'il donne naissance à des fibroblastes pulmonaires activés Nestine<sup>(+)</sup>. L'emploi d'une approche d'immunofluorescence nous a d'abord permis de constater que le tissu pulmonaire de rat témoin est caractérisé par une expression du marqueur endothélial CD31 de manière exclusive au sein des cellules endothéliales vasculaires pulmonaires, alors qu'aucune cellule endothéliale ou CMLV ne co-exprime le marqueur mésoenchymateux collagène  $\alpha_1$  de type 1. La *tunica media* du lit vasculaire pulmonaire des rats sains est quant à elle constituée de CML  $\alpha$ -SMA<sup>(+)</sup> qui ne co-expriment pas la Nestine. De plus, chez les rats en condition normoxique, une sous-population de cellules endothéliales de la *tunica intima* vasculaire pulmonaire co-expriment de manière variable la Nestine. La région périvasculaire du tissu pulmonaire de rat témoin présente une minorité de cellules Nestine<sup>(+)</sup>, mais aucune cellule Nestine<sup>(+)</sup>/CD31<sup>(+)</sup>, Nestine<sup>(+)</sup>/ $\alpha$ -SMA<sup>(+)</sup> ou Nestine<sup>(+)</sup>/collagène  $\alpha_1$  de type 1<sup>(+)</sup> n'a été détectée dans la région périvasculaire.

À l'inverse, la condition d'hypoxie chronique est associée avec la robuste apparition de cellules Nestine<sup>(+)</sup> dans la région périvasculaire pulmonaire, dont une importante sous-population présente un phénotype mésoenchymateux via la co-expression du collagène  $\alpha_1$  de type 1<sup>(+)</sup>, alors qu'une pénurie de cellules Nestine<sup>(+)</sup> de la région périvasculaire sont immunoréactives pour l' $\alpha$ -SMA. Une autre sous-population de cellules non-vasculaires Nestine<sup>(+)</sup>, ayant cette fois-ci un phénotype endothélial CD31<sup>(+)</sup>, est également détectée dans la région périvasculaire de nombreux vaisseaux sanguins, ainsi qu'au sein des alvéoles

pulmonaires, ce qui témoigne du déplacement de cellules endothéliales lors de la réponse de fibrose réactive chronique chez les rats hypoxiques. Puisque l'expression protéique de CD31 était similaire chez les rats hypoxiques et les rats en condition normoxique, cela renforce également l'idée que les cellules Nestine<sup>(+)</sup>/CD31<sup>(+)</sup> sont des cellules existantes déplacées, plutôt que des cellules Nestine<sup>(+)</sup> qui co-expriment *de novo* le marqueur endothélial CD31. D'ailleurs, la majorité des cellules CD31<sup>(+)</sup> non-vasculaires déplacées sont caractérisées par une co-expression de la protéine filamenteuse intermédiaire Nestine. Considérant le rôle établi de la Nestine dans la migration cellulaire (526, 532-534, 537, 538), l'expression de la Nestine par ces sous-populations de cellules endothéliales aurait pu contribuer à leur déplacement au niveau du tissu pulmonaire des rats hypoxiques. Toutefois, les techniques expérimentales employées n'ont pas permis d'identifier si les cellules endothéliales déplacées ont exprimé la Nestine avant leur migration, ou encore si c'est plutôt l'acquisition du phénotype mésenchymateux via le processus d'EndMT qui aurait conduit à l'expression de la Nestine par les cellules CD31<sup>(+)</sup> déplacées. En effet, l'observation de cellules présentant à la fois le phénotype mésenchymateux collagène  $\alpha_1$  de type 1<sup>(+)</sup> et endothélial CD31<sup>(+)</sup> dans la région périvasculaire et alvéolaire du tissu pulmonaire de rats soumis à la condition hypobarique, témoigne que le processus de transition endothélio-mésenchymateuse est recruté lors de la réponse de fibrose réactive chronique. Conséquemment, nos données suggèrent que le processus d'EndMT a pu être induit au sein du tissu pulmonaire des rats hypoxiques, contribuant à l'accumulation des cellules endothéliales non-vasculaires CD31<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup> déplacées, ainsi qu'à l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux par ces cellules, menant à l'apparition concomitante de fibroblastes activés Nestine<sup>(+)</sup>/collagène  $\alpha_1$  de type 1<sup>(+)</sup> qui participent à la fibrose réactive pulmonaire chronique. Malgré une démonstration logique et éclairante de l'implication des processus d'EndMT dans la réponse fibrotique pulmonaire, ainsi que de la constatation que la Nestine caractérise l'acquisition d'un phénotype de fibroblaste activé par les sous-populations d'origine endothéliale, nos résultats ne sont toutefois que des preuves indirectes. Ainsi, de coûteuses études de lignée cellulaire pourraient attester, hors de tout doute, des observations innovantes que nous avons réalisées via l'approche d'immunofluorescence. En effet, des souris transgéniques, dont les lignées de cellules endothéliales expriment stablement le LacZ (606, 611), pourraient être introduites

dans la chambre hypoxique afin de provoquer la réponse fibrotique pulmonaire. À mon avis, l'emploi de ce modèle transgénique permettrait d'identifier des cellules mésenchymateuses LacZ<sup>(+)</sup>/collagène  $\alpha_1$  de type 1<sup>(+)</sup>, ainsi que des fibroblastes activés LacZ<sup>(+)</sup>/Nestine<sup>(+)</sup> dans la région périvasculaire et alvéolaire, confirmant alors nos observations réalisées via le troisième article de cette thèse.

### **5.3.5 LES MÉCANISMES POTENTIELS RÉGULANT L'EXPRESSION DE LA NESTINE DANS LES PROCESSUS DE REMODELAGE PULMONAIRE**

#### ***5.3.5.1 Les facteurs pro-fibrotiques stimulent l'expression de la Nestine dans les processus de remodelage pulmonaire***

Il est largement reconnu dans la littérature que les facteurs pro-fibrotiques, tels l'Angiotensine II, le TGF- $\beta_1$  et le TGF- $\beta_3$ , sont fortement impliqués dans les processus fibrotiques en stimulant la production de collagène par les fibroblastes (23, 311, 327, 470, 650). L'isolation de fibroblastes pulmonaires de rats néonataux, suivie de l'exposition de ceux-ci durant 24 heures à des facteurs pro-fibrotiques a induit significativement l'expression de la Nestine chez ces cellules (160). Ces résultats témoignent que l'expression accrue de la Nestine au sein du tissu pulmonaire de rat MI 1 semaine a pu survenir, entre autres, au niveau des fibroblastes pulmonaires dans l'optique de favoriser la réponse fibrotique (160). De plus, nous avons observé que l'Angiotensine II a provoqué l'incorporation de la <sup>3</sup>H-Thymidine et de la <sup>3</sup>H-Leucine par les fibroblastes pulmonaires, témoignant que le facteur pro-fibrotique a contribué à l'acquisition d'un phénotype prolifératif par ces cellules (160). À l'inverse, les stimulations *in vitro* avec le TGF- $\beta_1$  et le TGF- $\beta_3$  ont favorisé l'incorporation de la <sup>3</sup>H-Leucine, tout en inhibant celle de la <sup>3</sup>H-Thymidine (160). Des résultats similaires ont d'ailleurs été publiés par Agocha et ses collègues, qui ont eux aussi observé que le TGF- $\beta_1$  stimule l'incorporation de la <sup>3</sup>H-Leucine et inhibe l'incorporation de la <sup>3</sup>H-Thymidine par les fibroblastes cardiaques humains (651). Toutefois, ils ont également observé que l'hypoxie renversait ce phénomène et contribuait à la croissance cellulaire lorsque combinée avec le TGF- $\beta_1$  (651). Cette étude témoigne qu'une multitude de facteurs sont présents lors du

processus fibrotique et qu'il est conséquemment difficile de les représenter tous à la fois dans des études *in vitro*. Néanmoins, tous les facteurs pro-fibrotiques ont favorisé l'expression de la Nestine par les fibroblastes pulmonaires (160). D'ailleurs, il est avéré que le TGF- $\beta_1$  induit l'expression de la Nestine par les fibroblastes rénaux et que la fibrose tubulointerstitielle rénale est caractérisée par la présence de fibroblastes rénaux Nestine<sup>(+)</sup> (524, 525). Ainsi, les résultats de la seconde publication suggèrent que les facteurs pro-fibrotiques induisent l'expression accrue de la Nestine par les fibroblastes pulmonaires, et considérant le rôle établi de la Nestine dans la prolifération cellulaire (25, 151, 518, 526, 533-536, 538), cela provoque la prolifération de ceux-ci. Puisqu'il est reconnu que les fibroblastes pulmonaires prolifératifs sont fortement impliqués dans les processus de fibrose réactive initiés lors de dommages pulmonaires (23, 311, 327), la protéine filamenteuse intermédiaire a pu favoriser la réponse de fibrose réactive pulmonaire observée chez les rats ayant subi la chirurgie d'infarctus du myocarde (160).

Le troisième article a ensuite renforcé ces résultats, puisque le traitement durant 24 heures de fibroblastes pulmonaires de rats témoins avec des facteurs de croissance impliqués dans le remodelage tissulaire, soit l'EGF et l'Angiotensine II, a induit l'expression de la Nestine par ces cellules. Subséquemment, ces résultats témoignent que l'expression élevée de la Nestine dans le tissu pulmonaire des rats hypoxiques pourrait, elle aussi, être attribuable à une augmentation de l'expression de la protéine filamenteuse intermédiaire au sein des fibroblastes résidents pulmonaires, qui serait initiée par les facteurs de croissances qui participent au remodelage pathologique. Ainsi, le tissu pulmonaire de rats hypoxiques présentait une population modeste de cellules mésenchymateuses Nestine<sup>(+)</sup>/ $\alpha$ -SMA<sup>(+)</sup> intercalées entre les alvéoles, alors que la majorité des cellules Nestine<sup>(+)</sup> ayant un phénotype mésenchymateux co-exprimaient plutôt le collagène  $\alpha_1$  de type 1. D'ailleurs, la stimulation *in vitro* des fibroblastes pulmonaires avec les facteurs de croissances n'a eu aucun impact sur l'expression de l' $\alpha$ -SMA par ces cellules. Collectivement, ces résultats soutiennent encore une fois que la Nestine, plutôt que l' $\alpha$ -SMA, se révèle être un marqueur approprié des fibroblastes pulmonaires activés qui sont recrutés lors des réponses fibrotiques aiguës et chroniques.

### ***5.3.5.2 Les membres de la famille des miR125b ne sont pas des facteurs déterminants dans les processus de remodelage pulmonaire***

La littérature révèle que les miR-125b, de la famille des microARN (miR, *microRNA*), régulent la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales progénitrices en ciblant la région 3'UTR du gène *Nestine* (559). En effet, une régulation à la hausse du transcrit de miR-125b supprime l'expression protéique et d'ARNm de la *Nestine* (559). Conséquemment, cela arrête le cycle cellulaire, stimule le processus de différenciation des cellules souches neurales progénitrices en un phénotype neuronal et inhibe la prolifération cellulaire (559). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que les miR125b régulent l'expression de la *Nestine* dans les processus physiologiques et pathologiques de remodelage pulmonaire (160). Tel qu'attendu, les niveaux d'expression de l'ARNm des membres de la famille des miR-125b, soit le miR-125b, le miR125b-1 et le miR125b-2, ont été augmentés à la suite du développement physiologique pulmonaire, alors que de manière réciproque, les niveaux d'expression du transcrit et de la protéine de la *Nestine* ont été significativement réduits (160). De plus, la réponse aigüe de fibrose réactive pulmonaire chez les rats MI a été associée avec une diminution des niveaux d'expression des membres de la famille des miR125b et une expression concomitante à la hausse d'ARNm et protéique de la *Nestine* (160). Toutefois, une réduction de l'expression de la *Nestine* a été observée au niveau du tissu pulmonaire des rats ayant reçu l'injection de STZ, alors que les transcrits des miR125b ont eux aussi été diminués (160). Conséquemment, ces résultats suggèrent que le développement aigüe de la pathologie DT1 provoque de manière sélective la réduction des niveaux d'expression de l'ARNm de la *Nestine* et des miR125b (160). Cependant, une autre conclusion peut être tirée de la synthèse des différents modèles de remodelage pulmonaires physiologiques et pathologiques (160). En effet, il serait tout aussi probable que la famille des miR125b ne cible pas le gène *Nestine* au niveau des cellules résidentes pulmonaires (160). Nous avons alors vérifié s'il existe une interrelation *in vitro* entre les miR125b et la *Nestine* en isolant des fibroblastes pulmonaires, soit un type cellulaire fortement impliqué dans le remodelage pulmonaire (160, 295). Ainsi, la stimulation de fibroblastes pulmonaires de 1<sup>er</sup> passage avec un contrôle positif, le FBS, ainsi qu'avec des facteurs pro-fibrotiques, soit l'Angiotensine II, le TGF- $\beta_1$  et le TGF- $\beta_3$ , a eu pour impact d'induire l'expression de la *Nestine*, alors qu'aucun effet n'a été observé sur

l'expression des transcrits des membres de la famille des miR-125b (160). Ces observations témoignent donc que les miR125b ne ciblent pas directement le gène *Nestine* des fibroblastes pulmonaires de rats (160). De plus, les résultats de cette étude suggèrent que les miR125b ne sont probablement pas impliqués dans les réponses fibrotiques pulmonaires, puisque la stimulation des fibroblastes pulmonaires avec les facteurs pro-fibrotiques n'a eu aucun effet sur les niveaux de transcrits des miR125b (160). Donc, les niveaux variés des miR125b au sein du tissu pulmonaire des différents modèles animaux sont attribuables à des processus distincts de la réponse fibrotique. Ainsi, la littérature révèle que les miR125b ciblent également d'autres gènes, dont le gène *p53* et le gène *Bcl-2*, qui sont fortement impliqués dans les réponses de prolifération et d'apoptose cellulaire (652, 653).

### ***5.3.5.3 La voie TGF- $\beta_1$ /Smad3 est impliquée dans l'expression de la Nestine lors des processus de fibrose réactive pulmonaire***

Il est amplement reconnu dans la littérature que le TGF- $\beta$  est impliqué de manière centrale dans les programmes d'EMT et d'EndMT (137, 562, 563, 565, 594, 595, 606, 607). Ainsi, le modèle de fibrose réactive pulmonaire chronique a été associé avec une augmentation significative des niveaux de transcrit d'ARNm du TGF- $\beta_1$  et du TGF- $\beta_3$  au sein du tissu pulmonaire. De plus, la transition *in vitro* d'une sous-population de cellules épithéliales en un phénotype mésenchymateux, initiée via le retrait du sérum du milieu de culture des CAE, a quant à elle entraîné la détection du TGF- $\beta_1$  au niveau du milieu de culture. Cette observation suggère que les CAE ont sécrété le TGF- $\beta_1$ , puis le facteur de croissance pro-fibrotique a stimulé de manière autocrine le processus d'EMT de type 2 et la différenciation d'une sous-population de CAE. Afin de mieux comprendre l'implication de la voie du TGF- $\beta_1$  dans le processus d'EMT de type 2 pulmonaire, nous avons ensuite employé *in vitro* un inhibiteur reconnu du programme d'EMT de type 2, soit le BMP-7 (654). Le BMP-7 a des propriétés anti-fibrotiques via l'antagonisme des effets du TGF- $\beta_1$  et du TGF- $\beta_3$ , ce qui permet de renverser *in vitro* le processus d'EMT de cellules épithéliales tubulaires de souris (573, 654, 655). Conséquemment, l'ajout de BMP-7 durant 24 heures dans le milieu de culture des CAE a atténué de manière significative le programme d'EMT, visualisé par une suppression



marquée de l'apparition de cellules mésenchymateuses collagène  $\alpha_1$  de type 1<sup>(+)</sup> et par une préservation concomitante du nombre de cellules épithéliales E-Cadhérine<sup>(+)</sup>. Cette expérimentation *in vitro* a ainsi confirmé l'implication du TGF- $\beta_1$  dans la transition des CAE en un phénotype mésenchymateux. Cependant, l'inhibition massive du développement du phénotype mésenchymateux collagène  $\alpha_1$  de type 1<sup>(+)</sup> via le BMP-7 a été associée avec une atténuation partielle du pourcentage de cellules fibroblastiques Nestine<sup>(+)</sup>.

La littérature révèle que des voies signalétiques dépendantes de Smad3 sont recrutées lors de la production d'ECM induite par le facteur pro-fibrotique TGF- $\beta_1$  (654). En effet, Smad3 est un modulateur transcriptionnel, puisqu'il lie directement la région promotrice des collagènes afin de favoriser leur synthèse (654). L'action inhibitrice de BMP-7 sur la voie de signalisation TGF- $\beta_1$ /Smad3 a alors été associée avec la suppression de l'apparition de cellules mésenchymateuses collagène  $\alpha_1$  de type 1<sup>(+)</sup> et le blocage concomitant de la réponse fibrotique rénale (654, 656). Une étude réalisée par Dobaczewski et ses collaborateurs a révélé que les fibroblastes activés de souris invalidée pour le gène Smad3 conservent leur capacité proliférative lors de la réponse de fibrose réparative cardiaque, et ce, malgré l'absence d'expression de collagène par ces cellules mésenchymateuses (657). Or, le rôle de la Nestine dans la prolifération cellulaire a été largement décrit dans la littérature (25, 151, 518, 526, 532-538). Le troisième article a illustré que l'action inhibitrice de BMP-7 n'a eu qu'un effet partiel *in vitro* à bloquer l'acquisition de la Nestine, alors qu'elle a provoqué une suppression quasiment totale de l'expression du collagène  $\alpha_1$  de type 1 par les CAE. Conséquemment, ces résultats suggèrent que le TGF- $\beta_1$  induit l'expression de la Nestine au niveau des cellules épithéliales *in vitro* lors du processus d'EMT, et ce, principalement via une voie de signalisation indépendante de Smad3. D'ailleurs, une étude *in vitro* a également démontré que le TGF- $\beta_1$  agit via une voie signalétique indépendante de Smad3, via la molécule signalétique cytoplasmique ERK, pour induire le processus d'EMT des cellules épithéliales de la glande mammaire (658-660). La cascade de signalisation Ras/Raf/ERK a été impliquée dans l'expression de la Nestine par des CML prolifératives en culture (535, 556). Conséquemment, le TGF- $\beta_1$  pourrait favoriser le processus d'EMT des CAE *in vitro* via la cascade de

signalisation Ras/Raf/ERK et la voie du Smad3 afin de permettre l'acquisition du phénotype mésoenchymateux Nestine<sup>(+)</sup>.

## **CHAPITRE 6 : CONCLUSION**

Cette thèse a d'abord illustré que les CSNPRCN<sup>(+)</sup> participent à la fibrose réparative cardiaque en se différenciant en un phénotype vasculaire et neuronal. Ainsi, à la suite d'un infarctus du myocarde chez le rat, la réponse neurogénique est associée avec une hyperinnervation sympathique, ainsi qu'avec la synthèse *de novo* de fibres Neurofilament-M<sup>(+)</sup> à partir de cellules Nestine<sup>(+)</sup>. Via une première publication, nous avons établi que lors de la réponse de cicatrisation cardiaque chez le rat, il existe une relation temporelle entre l'expression transitoire de la GAP43 et l'acquisition subséquente du phénotype neuronal par les CSNPRCN<sup>(+)</sup>. Toutefois, le rôle biologique de la différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> dans la fibrose réparative cardiaque, ainsi que l'importance d'une régulation à la hausse de la GAP43 dans ce processus demeurent à être établis. Cette thèse a également démontré que la réponse de fibrose réparative cardiaque est caractérisée par une expression accrue de la Nestine chez les fibroblastes activés qui participent à la cicatrisation myocardique. De plus, la chirurgie d'infarctus du myocarde chez le rat provoque un remodelage ventriculaire à distance de la zone ischémisée, qui est caractérisé par une fibrose réactive myocardique et une importante augmentation de l'expression de la Nestine au niveau du ventricule gauche non infarci.

L'événement ischémique au sein du myocarde entraîne aussi une fibrose réactive précoce du tissu pulmonaire de rongeurs, associée avec une régulation à la hausse de la Nestine et l'apparition de cellules Nestine<sup>(+)</sup>/α-SMA<sup>(-)</sup> dont l'expression dépend du second intron du gène *Nestine* et pour lesquelles un rôle biologique demeure à être identifié. Notre seconde étude a également illustré que des facteurs pro-fibrotiques induisent l'expression de la Nestine et un phénotype prolifératif par les fibroblastes pulmonaires, ce qui contribue à faciliter le développement de la réponse fibrotique pulmonaire. Nos résultats de la troisième étude suggèrent que le développement de l'hypertension pulmonaire et de la fibrose réactive chronique périvasculaire et alvéolaire chez le modèle d'hypoxie hypobarique est réalisé via le recrutement de nombreuses sous-populations de fibroblastes activés qui sont originaires de cellules stromales résidentes, du processus de transition épithélio-mésenchymateuse de type 2 et du processus de transition endothélio-mésenchymateuse. Contrairement au dogme précédemment établi, nous avons démontré que la Nestine plutôt que l'α-SMA caractérise le

phénotype des diverses populations de fibroblastes activés qui participent à la réponse de fibrose réactive pulmonaire.

La pathologie diabétique est caractérisée par de nombreuses complications, dont une dysfonction pulmonaire, ainsi qu'une augmentation significative de la mortalité à la suite d'un infarctus du myocarde et d'une cicatrisation des plaies inadéquate attribuable aux réponses affaiblies d'angiogenèse et de neurogenèse. Ainsi, le DT1, induit via l'injection unique de STZ chez le rat MI, a réduit de manière significative l'expression de la Nestine au sein du tissu cardiaque cicatriciel, ce qui a été associé avec l'abolition de la différenciation des CSNPRCN<sup>(+)</sup> en un phénotype neuronale, ainsi qu'avec une fonction ventriculaire gauche contractile réduite. La condition diabétique a également provoqué une réponse précoce de remodelage pulmonaire non fibrotique, caractérisée par une régulation à la baisse de la protéine filamenteuse intermédiaire au niveau du tissu pulmonaire. Ces résultats suggèrent donc qu'une expression accrue de la Nestine est essentielle à la réponse fibrotique/cicatricielle. D'ailleurs, le remodelage pathologique du ventricule droit des rats ayant subi la condition hypobarique ne présentait pas de fibrose, alors que l'expression ventriculaire droite de la Nestine n'était pas différente chez les rats témoins et les rats hypoxiques. À l'inverse, le remodelage pulmonaire des rats hypoxiques a été associé avec une déposition importante de collagène au niveau des cloisons alvéolaire, ainsi qu'une régulation à la hausse de la Nestine. Cette observation témoigne d'ailleurs que c'est le développement de la réponse fibrotique et de l'hypertension pulmonaire, plutôt que la condition hypoxique hypobarique, qui est responsable de l'induction de l'expression de la Nestine pulmonaire.

En conclusion, nos travaux ont illustré que la Nestine est un marqueur de la fibrose cardiaque et pulmonaire, tant réparative que réactive. Collectivement, ces études témoignent qu'une expression ciblée de la Nestine peut s'avérer une avenue thérapeutique, puisque son expression semble bénéfique lors de la fibrose réparative et délétère lors de la fibrose réactive. Des cellules Nestine<sup>(+)</sup> ont également été détectées au sein du tissu dermique, cérébral, cardiaque et pulmonaire humain. Conséquemment, une meilleure compréhension de la régulation de l'expression de la Nestine chez l'humain permettrait d'atténuer la progression des pathologies fibrotiques et d'améliorer les processus de cicatrisation.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Tortora GJ, Derrickson B. 2007. *Principes d'anatomie et de physiologie*. Canada: Éditions du Renouveau Pédagogique Inc. 1246p. pp.
2. Jugdutt BI. 2003. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation* 108: 1395-403
3. Chen W, Frangogiannis NG. 2013. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochim Biophys Acta* 1833: 945-53
4. Lajiness JD, Conway SJ. 2012. The dynamic role of cardiac fibroblasts in development and disease. *J Cardiovasc Transl Res* 5: 739-48
5. Herve JC, Derangeon M, Theveniau-Ruissy M, Miquerol L, Sarrouilhe D, Gros D. 2008. [Connexins and junctional channels. Roles in the spreading of cardiac electrical excitation and heart development]. *Pathol Biol (Paris)* 56: 334-41
6. Calderone A. 2012. Nestin+ cells and healing the infarcted heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H1-9
7. Maier SK, Westenbroek RE, McCormick KA, Curtis R, Scheuer T, Catterall WA. 2004. Distinct subcellular localization of different sodium channel alpha and beta subunits in single ventricular myocytes from mouse heart. *Circulation* 109: 1421-7
8. Beguin PC, El-Helou V, Assimakopoulos J, Clement R, Gosselin H, Brugada R, Villeneuve L, Rohlicek CV, Del Duca D, Lapointe N, Rouleau JL, Calderone A. 2009. The phenotype and potential origin of nestin+ cardiac myocyte-like cells following infarction. *J Appl Physiol (1985)* 107: 1241-8
9. Calderone A. 2014. Myocardial Hypertrophy and Regeneration. In *Pathobiology of Human Disease*, ed. LM McManus, RN Mitchell, pp. 580-92. San Diego: Elsevier
10. Engel FB, Schebesta M, Duong MT, Lu G, Ren S, Madwed JB, Jiang H, Wang Y, Keating MT. 2005. p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev* 19: 1175-87
11. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P. 2001. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 344: 1750-7
12. Cheng RK, Asai T, Tang H, Dashoush NH, Kara RJ, Costa KD, Naka Y, Wu EX, Wolgemuth DJ, Chaudhry HW. 2007. Cyclin A2 induces cardiac regeneration after myocardial infarction and prevents heart failure. *Circ Res* 100: 1741-8
13. Engel FB, Hsieh PC, Lee RT, Keating MT. 2006. FGF1/p38 MAP kinase inhibitor therapy induces cardiomyocyte mitosis, reduces scarring, and rescues function after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 15546-51
14. Chablais F, Jazwinska A. 2012. The regenerative capacity of the zebrafish heart is dependent on TGFbeta signaling. *Development* 139: 1921-30
15. Poss KD, Wilson LG, Keating MT. 2002. Heart regeneration in zebrafish. *Science* 298: 2188-90
16. Kajstura J, Gurusamy N, Ogorek B, Goichberg P, Clavo-Rondon C, Hosoda T, D'Amario D, Bardelli S, Beltrami AP, Cesselli D, Bussani R, del Monte F, Quaini F, Rota M, Beltrami CA, Buchholz BA, Leri A, Anversa P. 2010. Myocyte turnover in the aging human heart. *Circ Res* 107: 1374-86



17. Kajstura J, Rota M, Cappetta D, Ogorek B, Arranto C, Bai Y, Ferreira-Martins J, Signore S, Sanada F, Matsuda A, Kostyla J, Caballero MV, Fiorini C, D'Alessandro DA, Michler RE, del Monte F, Hosoda T, Perrella MA, Leri A, Buchholz BA, Loscalzo J, Anversa P. 2012. Cardiomyogenesis in the aging and failing human heart. *Circulation* 126: 1869-81
18. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisen J. 2009. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324: 98-102
19. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. 2003. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114: 763-76
20. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. 2002. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 346: 5-15
21. Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R. 2010. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol* 225: 631-7
22. Souders CA, Bowers SL, Baudino TA. 2009. Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res* 105: 1164-76
23. Hinz B. 2012. Mechanical aspects of lung fibrosis: a spotlight on the myofibroblast. *Proc Am Thorac Soc* 9: 137-47
24. Zeisberg EM, Kalluri R. 2010. Origins of cardiac fibroblasts. *Circ Res* 107: 1304-12
25. Beguin PC, Gosselin H, Mamarbachi M, Calderone A. 2012. Nestin expression is lost in ventricular fibroblasts during postnatal development of the rat heart and re-expressed in scar myofibroblasts. *J Cell Physiol* 227: 813-20
26. Snider P, Standley KN, Wang J, Azhar M, Doetschman T, Conway SJ. 2009. Origin of cardiac fibroblasts and the role of periostin. *Circ Res* 105: 934-47
27. Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R. 2006. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther* 5: 1640-6
28. Squires CE, Escobar GP, Payne JF, Leonardi RA, Goshorn DK, Sheats NJ, Mains IM, Mingoia JT, Flack EC, Lindsey ML. 2005. Altered fibroblast function following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 39: 699-707
29. Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. 2002. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12877-82
30. Jelaska A, Strehlow D, Korn JH. 1999. Fibroblast heterogeneity in physiological conditions and fibrotic disease. *Springer Semin Immunopathol* 21: 385-95
31. Norris RA, Borg TK, Butcher JT, Baudino TA, Banerjee I, Markwald RR. 2008. Neonatal and adult cardiovascular pathophysiological remodeling and repair: developmental role of periostin. *Ann N Y Acad Sci* 1123: 30-40
32. Lie-Venema H, van den Akker NM, Bax NA, Winter EM, Maas S, Kekarainen T, Hoeben RC, deRuiter MC, Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC. 2007. Origin, fate, and function of epicardium-derived cells (EPDCs) in normal and abnormal cardiac development. *ScientificWorldJournal* 7: 1777-98

33. Munoz-Chapuli R, Perez-Pomares JM, Macias D, Garcia-Garrido L, Carmona R, Gonzalez-Iriarte M. 2001. The epicardium as a source of mesenchyme for the developing heart. *Ital J Anat Embryol* 106: 187-96
34. Zhou B, von Gise A, Ma Q, Hu YW, Pu WT. 2010. Genetic fate mapping demonstrates contribution of epicardium-derived cells to the annulus fibrosus of the mammalian heart. *Dev Biol* 338: 251-61
35. Olivey HE, Mundell NA, Austin AF, Barnett JV. 2006. Transforming growth factor-beta stimulates epithelial-mesenchymal transformation in the proepicardium. *Dev Dyn* 235: 50-9
36. de Lange FJ, Moorman AF, Anderson RH, Manner J, Soufan AT, de Gier-de Vries C, Schneider MD, Webb S, van den Hoff MJ, Christoffels VM. 2004. Lineage and morphogenetic analysis of the cardiac valves. *Circ Res* 95: 645-54
37. Bowers SL, Banerjee I, Baudino TA. 2010. The extracellular matrix: at the center of it all. *J Mol Cell Cardiol* 48: 474-82
38. Bosman FT, Stamenkovic I. 2003. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* 200: 423-8
39. Tsuruda T, Costello-Boerrigter LC, Burnett JC, Jr. 2004. Matrix metalloproteinases: pathways of induction by bioactive molecules. *Heart Fail Rev* 9: 53-61
40. Kuhn B, del Monte F, Hajjar RJ, Chang YS, Lebeche D, Arab S, Keating MT. 2007. Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. *Nat Med* 13: 962-9
41. Zhao L, Eghbali-Webb M. 2001. Release of pro- and anti-angiogenic factors by human cardiac fibroblasts: effects on DNA synthesis and protection under hypoxia in human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1538: 273-82
42. Kohl P. 2003. Heterogeneous cell coupling in the heart: an electrophysiological role for fibroblasts. *Circ Res* 93: 381-3
43. Miragoli M, Gaudesius G, Rohr S. 2006. Electrotonic modulation of cardiac impulse conduction by myofibroblasts. *Circ Res* 98: 801-10
44. Rohr S. 2004. Role of gap junctions in the propagation of the cardiac action potential. *Cardiovasc Res* 62: 309-22
45. Li GR, Sun HY, Chen JB, Zhou Y, Tse HF, Lau CP. 2009. Characterization of multiple ion channels in cultured human cardiac fibroblasts. *PLoS One* 4: e7307
46. Isenberg G, Kazanski V, Kondratev D, Gallitelli MF, Kiseleva I, Kamkin A. 2003. Differential effects of stretch and compression on membrane currents and [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> in ventricular myocytes. *Prog Biophys Mol Biol* 82: 43-56
47. Kamkin A, Kiseleva I, Isenberg G, Wagner KD, Gunther J, Theres H, Scholz H. 2003. Cardiac fibroblasts and the mechano-electric feedback mechanism in healthy and diseased hearts. *Prog Biophys Mol Biol* 82: 111-20
48. Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Libby P. 2012. *Braunwald's heart disease a textbook of cardiovascular medicine*. China: Elsevier Saunders 1961 pp.
49. Mathers CD, Lopez A, Stein C, Fat DM, Rao C. 2005. *Deaths and disease burden by cause: global burden of disease estimates for 2001 by world bank country groups*
50. Statistique\_Canada. 2014. Principales causes de décès en 2011 chez les deux sexes. <http://www.statcan.gc.ca>.
51. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, Ford E, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho M, Howard V, Kissela B,

- Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott M, Meigs J, Mozaffarian D, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong N, Wylie-Rosett J, Hong Y. 2009. Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 119: 480-6
52. Libby P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868-74
  53. Frangogiannis NG. 2008. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res* 58: 88-111
  54. Hall JE, Guyton AC. 2011. *Guyton and Hall textbook of medical physiology, 12th edition*. Philadelphia: PA: Saunders/Elsevier
  55. Cheitlin MD, McAllister HA, de Castro CM. 1975. Myocardial infarction without atherosclerosis. *JAMA* 231: 951-9
  56. Lacolley P, Babuty D, Boulanger C, Ghaleh B, Loirand G, Pinet F, Samuel J-L. 2007. *Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux*. Paris, France
  57. Sutton MG, Sharpe N. 2000. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 101: 2981-8
  58. Beguin PC, El-Helou V, Gillis MA, Duquette N, Gosselin H, Brugada R, Villeneuve L, Lauzier D, Tanguay JF, Ribuot C, Calderone A. 2011. Nestin (+) stem cells independently contribute to neural remodelling of the ischemic heart. *J Cell Physiol* 226: 1157-65
  59. Chabot A, Meus MA, Hertig V, Duquette N, Calderone A. 2013. The neurogenic response of cardiac resident nestin(+) cells was associated with GAP43 upregulation and abrogated in a setting of type I diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 12: 114
  60. Drapeau J, El-Helou V, Clement R, Bel-Hadj S, Gosselin H, Trudeau LE, Villeneuve L, Calderone A. 2005. Nestin-expressing neural stem cells identified in the scar following myocardial infarction. *J Cell Physiol* 204: 51-62
  61. El-Helou V, Beguin PC, Assimakopoulos J, Clement R, Gosselin H, Brugada R, Aumont A, Biernaskie J, Villeneuve L, Leung TK, Fernandes KJ, Calderone A. 2008. The rat heart contains a neural stem cell population; role in sympathetic sprouting and angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 45: 694-702
  62. El-Helou V, Chabot A, Gosselin H, Villeneuve L, Clavet-Lanthier ME, Tanguay JF, Enikolopov G, Fernandes KJ, Jasmin JF, Calderone A. 2013. Cardiac resident nestin(+) cells participate in reparative vascularisation. *J Cell Physiol* 228: 1844-53
  63. El-Helou V, Dupuis J, Proulx C, Drapeau J, Clement R, Gosselin H, Villeneuve L, Manganas L, Calderone A. 2005. Resident nestin+ neural-like cells and fibers are detected in normal and damaged rat myocardium. *Hypertension* 46: 1219-25
  64. El-Helou V, Gosselin H, Villeneuve L, Calderone A. 2012. The plating of rat scar myofibroblasts on matrigel unmasks a novel phenotype; the self assembly of lumen-like structures. *J Cell Biochem* 113: 2442-50
  65. El-Helou V, Proulx C, Beguin P, Assimakopoulos J, Gosselin H, Clement R, Villeneuve L, Huot-Marchand JE, Deblois D, Lajoie C, Calderone A. 2009. The cardiac neural stem cell phenotype is compromised in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *J Cell Physiol* 220: 440-9

66. El-Helou V, Proulx C, Gosselin H, Clement R, Mimee A, Villeneuve L, Calderone A. 2008. Dexamethasone treatment of post-MI rats attenuates sympathetic innervation of the infarct region. *J Appl Physiol (1985)* 104: 150-6
67. Barandon L, Couffinhal T, Ezan J, Dufourcq P, Costet P, Alzieu P, Leroux L, Moreau C, Dare D, Duplaa C. 2003. Reduction of infarct size and prevention of cardiac rupture in transgenic mice overexpressing FrzA. *Circulation* 108: 2282-9
68. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. 2002. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 53: 31-47
69. Sun Y, Weber KT. 2000. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res* 46: 250-6
70. Wang Y, Ahmad N, Wani MA, Ashraf M. 2004. Hepatocyte growth factor prevents ventricular remodeling and dysfunction in mice via Akt pathway and angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 37: 1041-52
71. Zhang J, Ding L, Zhao Y, Sun W, Chen B, Lin H, Wang X, Zhang L, Xu B, Dai J. 2009. Collagen-targeting vascular endothelial growth factor improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation* 119: 1776-84
72. Hasan W, Jama A, Donohue T, Wernli G, Onyszchuk G, Al-Hafez B, Bilgen M, Smith PG. 2006. Sympathetic hyperinnervation and inflammatory cell NGF synthesis following myocardial infarction in rats. *Brain Res* 1124: 142-54
73. Vracko R, Thorning D, Frederickson RG. 1990. Fate of nerve fibers in necrotic, healing, and healed rat myocardium. *Lab Invest* 63: 490-501
74. Zhang LQ, Laato M. 2001. Innervation of normal and hypertrophic human scars and experimental wounds in the rat. *Ann Chir Gynaecol* 90 Suppl 215: 29-32
75. Zhou S, Chen LS, Miyauchi Y, Miyauchi M, Kar S, Kangavari S, Fishbein MC, Sharifi B, Chen PS. 2004. Mechanisms of cardiac nerve sprouting after myocardial infarction in dogs. *Circ Res* 95: 76-83
76. Jennings RB, Murry CE, Steenbergen C, Jr., Reimer KA. 1990. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation* 82: II2-12
77. Frangogiannis NG. 2012. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res* 110: 159-73
78. Li M, Carpio DF, Zheng Y, Bruzzo P, Singh V, Ouaz F, Medzhitov RM, Beg AA. 2001. An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *J Immunol* 166: 7128-35
79. Arslan F, Smeets MB, O'Neill LA, Keogh B, McGuirk P, Timmers L, Tersteeg C, Hofer IE, Doevendans PA, Pasterkamp G, de Kleijn DP. 2010. Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-toll-like receptor-2 antibody. *Circulation* 121: 80-90
80. Frangogiannis NG, Perrard JL, Mendoza LH, Burns AR, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, Entman ML. 1998. Stem cell factor induction is associated with mast cell accumulation after canine myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 98: 687-98
81. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. 2007. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 204: 3037-47

82. Virag JJ, Murry CE. 2003. Myofibroblast and endothelial cell proliferation during murine myocardial infarct repair. *Am J Pathol* 163: 2433-40
83. Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, Spengler RN, Smith CW, Entman ML. 1998. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 98: 699-710
84. Frangogiannis NG, Youker KA, Rossen RD, Gwechenberger M, Lindsey MH, Mendoza LH, Michael LH, Ballantyne CM, Smith CW, Entman ML. 1998. Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 30: 2567-76
85. Shinde AV, Frangogiannis NG. 2014. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J Mol Cell Cardiol* 70: 74-82
86. Zhang X, Azhar G, Nagano K, Wei JY. 2001. Differential vulnerability to oxidative stress in rat cardiac myocytes versus fibroblasts. *J Am Coll Cardiol* 38: 2055-62
87. Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, Izawa A, Takahashi Y, Masumoto J, Koyama J, Hongo M, Noda T, Nakayama J, Sagara J, Taniguchi S, Ikeda U. 2011. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 123: 594-604
88. Zymek P, Nah DY, Bujak M, Ren G, Koerting A, Leucker T, Huebener P, Taffet G, Entman M, Frangogiannis NG. 2007. Interleukin-10 is not a critical regulator of infarct healing and left ventricular remodeling. *Cardiovasc Res* 74: 313-22
89. Turner NA, Das A, Warburton P, O'Regan DJ, Ball SG, Porter KE. 2009. Interleukin-1alpha stimulates proinflammatory cytokine expression in human cardiac myofibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H1117-27
90. Li J, Schwimbeck PL, Tschöpe C, Leschka S, Husmann L, Rutschow S, Reichenbach F, Noutsias M, Kobalz U, Poller W, Spillmann F, Zeichhardt H, Schultheiss HP, Pauschinger M. 2002. Collagen degradation in a murine myocarditis model: relevance of matrix metalloproteinase in association with inflammatory induction. *Cardiovasc Res* 56: 235-47
91. Shivakumar K, Sollott SJ, Sangeetha M, Sapna S, Ziman B, Wang S, Lakatta EG. 2008. Paracrine effects of hypoxic fibroblast-derived factors on the MPT-ROS threshold and viability of adult rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H2653-8
92. Clancy RM, Zheng P, O'Mahony M, Izmirly P, Zavadil J, Gardner L, Buyon JP. 2007. Role of hypoxia and cAMP in the transdifferentiation of human fetal cardiac fibroblasts: implications for progression to scarring in autoimmune-associated congenital heart block. *Arthritis Rheum* 56: 4120-31
93. Tamamori M, Ito H, Hiroe M, Marumo F, Hata RI. 1997. Stimulation of collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts by exposure to hypoxic culture conditions and suppression of the effect by natriuretic peptides. *Cell Biol Int* 21: 175-80
94. Bulkley BH, Roberts WC. 1974. Steroid therapy during acute myocardial infarction. A cause of delayed healing and of ventricular aneurysm. *Am J Med* 56: 244-50
95. Roberts R, DeMello V, Sobel BE. 1976. Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction. *Circulation* 53: 1204-6
96. Sholter DE, Armstrong PW. 2000. Adverse effects of corticosteroids on the cardiovascular system. *Can J Cardiol* 16: 505-11



97. Faxon DP, Gibbons RJ, Chronos NA, Gurbel PA, Sheehan F. 2002. The effect of blockade of the CD11/CD18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial infarction treated with direct angioplasty: the results of the HALT-MI study. *J Am Coll Cardiol* 40: 1199-204
98. Armstrong PW, Granger CB, Adams PX, Hamm C, Holmes D, Jr., O'Neill WW, Todaro TG, Vahanian A, Van de Werf F. 2007. Pexelizumab for acute ST-elevation myocardial infarction in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA* 297: 43-51
99. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 122: 103-11
100. Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, Daemen MJ. 1995. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol* 147: 325-38
101. Cimini M, Fazel S, Zhuo S, Xaymardan M, Fujii H, Weisel RD, Li RK. 2007. c-kit dysfunction impairs myocardial healing after infarction. *Circulation* 116: I77-82
102. Fazel S, Cimini M, Chen L, Li S, Angoulvant D, Fedak P, Verma S, Weisel RD, Keating A, Li RK. 2006. Cardioprotective c-kit+ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J Clin Invest* 116: 1865-77
103. Dai W, Wold LE, Dow JS, Kloner RA. 2005. Thickening of the infarcted wall by collagen injection improves left ventricular function in rats: a novel approach to preserve cardiac function after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 46: 714-9
104. Ryan LP, Matsuzaki K, Noma M, Jackson BM, Eperjesi TJ, Plappert TJ, St John-Sutton MG, Gorman JH, 3rd, Gorman RC. 2009. Dermal filler injection: a novel approach for limiting infarct expansion. *Ann Thorac Surg* 87: 148-55
105. Frangogiannis NG, Michael LH, Entman ML. 2000. Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb). *Cardiovasc Res* 48: 89-100
106. Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. 1971. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 27: 549-50
107. Majno G, Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR. 1971. Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Science* 173: 548-50
108. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. 1999. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 277: C1-9
109. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 349-63
110. Sun Y. 2009. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovasc Res* 81: 482-90
111. Colombo F, Gosselin H, El-Helou V, Calderone A. 2003. Beta-adrenergic receptor-mediated DNA synthesis in neonatal rat cardiac fibroblasts proceeds via a phosphatidylinositol 3-kinase dependent pathway refractory to the antiproliferative action of cyclic AMP. *J Cell Physiol* 195: 322-30
112. Mayorga M, Bahi N, Ballester M, Comella JX, Sanchis D. 2004. Bcl-2 is a key factor for cardiac fibroblast resistance to programmed cell death. *J Biol Chem* 279: 34882-9
113. Turner NA. 2011. *The cardiac fibroblast*. India: Research Signpost



114. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. 2007. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 170: 1807-16
115. Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L, Gabbiani G. 1998. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J Cell Biol* 142: 873-81
116. Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. 2010. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 48: 504-11
117. Bujak M, Ren G, Kweon HJ, Dobaczewski M, Reddy A, Taffet G, Wang XF, Frangogiannis NG. 2007. Essential role of Smad3 in infarct healing and in the pathogenesis of cardiac remodeling. *Circulation* 116: 2127-38
118. Shi Y, Massague J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685-700
119. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. 2011. TGF-beta signaling in fibrosis. *Growth Factors* 29: 196-202
120. Derynck R, Zhang YE. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425: 577-84
121. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. 2003. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 116: 217-24
122. Rifkin DB, Mazziere R, Munger JS, Noguera I, Sung J. 1999. Proteolytic control of growth factor availability. *APMIS* 107: 80-5
123. Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. 2004. TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci* 35: 83-92
124. Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. 2002. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension* 39: 258-63
125. Okada H, Takemura G, Kosai K, Li Y, Takahashi T, Esaki M, Yuge K, Miyata S, Maruyama R, Mikami A, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. 2005. Postinfarction gene therapy against transforming growth factor-beta signal modulates infarct tissue dynamics and attenuates left ventricular remodeling and heart failure. *Circulation* 111: 2430-7
126. Ikeuchi M, Tsutsui H, Shiomi T, Matsusaka H, Matsushima S, Wen J, Kubota T, Takeshita A. 2004. Inhibition of TGF-beta signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction. *Cardiovasc Res* 64: 526-35
127. Zymek P, Bujak M, Chatila K, Cieslak A, Thakker G, Entman ML, Frangogiannis NG. 2006. The role of platelet-derived growth factor signaling in healing myocardial infarcts. *J Am Coll Cardiol* 48: 2315-23
128. Detillieux KA, Sheikh F, Kardami E, Cattini PA. 2003. Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. *Cardiovasc Res* 57: 8-19
129. Micera A, Vigneti E, Pickholtz D, Reich R, Pappo O, Bonini S, Maquart FX, Aloe L, Levi-Schaffer F. 2001. Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6162-7
130. Dewald O, Ren G, Duerr GD, Zoerlein M, Klemm C, Gersch C, Tincey S, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. 2004. Of mice and dogs: species-specific

- differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol* 164: 665-77
131. Ren G, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. 2002. Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts. *J Histochem Cytochem* 50: 71-9
  132. Zhao W, Lu L, Chen SS, Sun Y. 2004. Temporal and spatial characteristics of apoptosis in the infarcted rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 605-11
  133. Takemura G, Ohno M, Hayakawa Y, Misao J, Kanoh M, Ohno A, Uno Y, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. 1998. Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction. *Circ Res* 82: 1130-8
  134. Yano T, Miura T, Ikeda Y, Matsuda E, Saito K, Miki T, Kobayashi H, Nishino Y, Ohtani S, Shimamoto K. 2005. Intracardiac fibroblasts, but not bone marrow derived cells, are the origin of myofibroblasts in myocardial infarct repair. *Cardiovasc Pathol* 14: 241-6
  135. Darby I, Skalli O, Gabbiani G. 1990. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 63: 21-9
  136. Mollmann H, Nef HM, Kostin S, von Kalle C, Pilz I, Weber M, Schaper J, Hamm CW, Elsasser A. 2006. Bone marrow-derived cells contribute to infarct remodelling. *Cardiovasc Res* 71: 661-71
  137. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R. 2007. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 13: 952-61
  138. Chintalgattu V, Nair DM, Katwa LC. 2003. Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR. *J Mol Cell Cardiol* 35: 277-86
  139. Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT. 1995. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol* 27: 1281-92
  140. Weber KT, Sun Y, Cleutjens JP. 1996. Structural remodeling of the infarcted rat heart. *EXS* 76: 489-99
  141. Weber KT, Sun Y, Katwa LC, Cleutjens JP, Zhou G. 1995. Connective tissue and repair in the heart. Potential regulatory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 752: 286-99
  142. Emanuelli C, Salis MB, Pinna A, Graiani G, Manni L, Madeddu P. 2002. Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs. *Circulation* 106: 2257-62
  143. Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, Ringstedt T, Kraemer R, Hahn R, Wang S, Ibanez CF, Rafii S, Hempstead BL. 2000. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development* 127: 4531-40
  144. Mias C, Coatrieux C, Denis C, Genet G, Seguelas MH, Laplace N, Rouzaud-Laborde C, Calise D, Parini A, Cussac D, Pathak A, Senard JM, Gales C. 2013. Cardiac fibroblasts regulate sympathetic nerve sprouting and neurocardiac synapse stability. *PLoS One* 8: e79068

145. Lindsey ML, Gannon J, Aikawa M, Schoen FJ, Rabkin E, Lopresti-Morrow L, Crawford J, Black S, Libby P, Mitchell PG, Lee RT. 2002. Selective matrix metalloproteinase inhibition reduces left ventricular remodeling but does not inhibit angiogenesis after myocardial infarction. *Circulation* 105: 753-8
146. Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. 2000. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* 342: 626-33
147. Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M. 1996. VEGF, flk-1, andflt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol* 270: H1803-11
148. Kukielka GL, Smith CW, LaRosa GJ, Manning AM, Mendoza LH, Daly TJ, Hughes BJ, Youker KA, Hawkins HK, Michael LH, et al. 1995. Interleukin-8 gene induction in the myocardium after ischemia and reperfusion in vivo. *J Clin Invest* 95: 89-103
149. Hristov M, Erl W, Weber PC. 2003. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1185-9
150. Aihara M, Sugawara K, Torii S, Hosaka M, Kurihara H, Saito N, Takeuchi T. 2004. Angiogenic endothelium-specific nestin expression is enhanced by the first intron of the nestin gene. *Lab Invest* 84: 1581-92
151. Mokry J, Cizkova D, Filip S, Ehrmann J, Osterreicher J, Kolar Z, English D. 2004. Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells Dev* 13: 658-64
152. Tomita Y, Matsumura K, Wakamatsu Y, Matsuzaki Y, Shibuya I, Kawaguchi H, Ieda M, Kanakubo S, Shimazaki T, Ogawa S, Osumi N, Okano H, Fukuda K. 2005. Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J Cell Biol* 170: 1135-46
153. Tamura Y, Matsumura K, Sano M, Tabata H, Kimura K, Ieda M, Arai T, Ohno Y, Kanazawa H, Yuasa S, Kaneda R, Makino S, Nakajima K, Okano H, Fukuda K. 2011. Neural crest-derived stem cells migrate and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 582-9
154. Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabe-Heider F, Biernaskie J, Junek A, Kobayashi NR, Toma JG, Kaplan DR, Labosky PA, Rafuse V, Hui CC, Miller FD. 2004. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol* 6: 1082-93
155. Wong AM, Hodges H, Horsburgh K. 2005. Neural stem cell grafts reduce the extent of neuronal damage in a mouse model of global ischaemia. *Brain Res* 1063: 140-50
156. Ii M, Nishimura H, Sekiguchi H, Kamei N, Yokoyama A, Horii M, Asahara T. 2009. Concurrent vasculogenesis and neurogenesis from adult neural stem cells. *Circ Res* 105: 860-8
157. Mignone JL, Kukekov V, Chiang AS, Steindler D, Enikolopov G. 2004. Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice. *J Comp Neurol* 469: 311-24
158. Lothian C, Prakash N, Lendahl U, Wahlstrom GM. 1999. Identification of both general and region-specific embryonic CNS enhancer elements in the nestin promoter. *Exp Cell Res* 248: 509-19
159. Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, Cunningham M, McKay R, Gavin B, Mann J, Vassileva G, McMahon A. 1994. Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* 12: 11-24

160. Chabot A, Meus MA, Naud P, Hertig V, Dupuis J, Villeneuve L, El Khoury N, Fiset C, Nattel S, Jasmin JF, Calderone A. 2015. Nestin is a marker of lung remodeling secondary to myocardial infarction and type I diabetes in the rat. *J Cell Physiol* 230: 170-9
161. Aki R, Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Hoffman RM. 2010. Nestin-expressing interfollicular blood vessel network contributes to skin transplant survival and wound healing. *J Cell Biochem* 110: 80-6
162. Birbrair A, Wang ZM, Messi ML, Enikolopov GN, Delbono O. 2011. Nestin-GFP transgene reveals neural precursor cells in adult skeletal muscle. *PLoS One* 6: e16816
163. Mignone JL, Roig-Lopez JL, Fedtsova N, Schones DE, Manganas LN, Maletic-Savatic M, Keyes WM, Mills AA, Gleiberman A, Zhang MQ, Enikolopov G. 2007. Neural potential of a stem cell population in the hair follicle. *Cell Cycle* 6: 2161-70
164. Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Hoffman RM. 2008. Multipotent hair follicle stem cells promote repair of spinal cord injury and recovery of walking function. *Cell Cycle* 7: 1865-9
165. Mothe AJ, Zahir T, Santaguida C, Cook D, Tator CH. 2011. Neural stem/progenitor cells from the adult human spinal cord are multipotent and self-renewing and differentiate after transplantation. *PLoS One* 6: e27079
166. Tanaka S, Kamachi Y, Tanouchi A, Hamada H, Jing N, Kondoh H. 2004. Interplay of SOX and POU factors in regulation of the Nestin gene in neural primordial cells. *Mol Cell Biol* 24: 8834-46
167. Cho J, Zhai P, Maejima Y, Sadoshima J. 2011. Myocardial injection with GSK-3beta-overexpressing bone marrow-derived mesenchymal stem cells attenuates cardiac dysfunction after myocardial infarction. *Circ Res* 108: 478-89
168. Fiedler J, Jazbutyte V, Kirchmaier BC, Gupta SK, Lorenzen J, Hartmann D, Galuppo P, Kneitz S, Pena JT, Sohn-Lee C, Loyer X, Soutschek J, Brand T, Tuschl T, Heineke J, Martin U, Schulte-Merker S, Ertl G, Engelhardt S, Bauersachs J, Thum T. 2011. MicroRNA-24 regulates vascularity after myocardial infarction. *Circulation* 124: 720-30
169. Huang ML, Tian H, Wu J, Matsubayashi K, Weisel RD, Li RK. 2006. Myometrial cells induce angiogenesis and salvage damaged myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H2057-66
170. Tang JM, Wang JN, Zhang L, Zheng F, Yang JY, Kong X, Guo LY, Chen L, Huang YZ, Wan Y, Chen SY. 2011. VEGF/SDF-1 promotes cardiac stem cell mobilization and myocardial repair in the infarcted heart. *Cardiovasc Res* 91: 402-11
171. Wu J, Zeng F, Huang XP, Chung JC, Konecny F, Weisel RD, Li RK. 2011. Infarct stabilization and cardiac repair with a VEGF-conjugated, injectable hydrogel. *Biomaterials* 32: 579-86
172. Calderone A, Bel-Hadj S, Drapeau J, El-Helou V, Gosselin H, Clement R, Villeneuve L. 2006. Scar myofibroblasts of the infarcted rat heart express natriuretic peptides. *J Cell Physiol* 207: 165-73
173. Verrier RL, Kwaku KF. 2004. Frayed nerves in myocardial infarction: the importance of rewiring. *Circ Res* 95: 5-6
174. Du XJ. 2001. Sympathoadrenergic mechanisms in functional regulation and development of cardiac hypertrophy and failure: findings from genetically engineered mice. *Cardiovasc Res* 50: 443-53

175. Woodcock EA, Du XJ, Reichelt ME, Graham RM. 2008. Cardiac alpha 1-adrenergic drive in pathological remodelling. *Cardiovasc Res* 77: 452-62
176. Schwaiblmair M, von Scheidt W, Uberfuhr P, Ziegler S, Schwaiger M, Reichart B, Vogelmeier C. 1999. Functional significance of cardiac reinnervation in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 18: 838-45
177. Cao JM, Chen LS, KenKnight BH, Ohara T, Lee MH, Tsai J, Lai WW, Karagueuzian HS, Wolf PL, Fishbein MC, Chen PS. 2000. Nerve sprouting and sudden cardiac death. *Circ Res* 86: 816-21
178. Cao JM, Fishbein MC, Han JB, Lai WW, Lai AC, Wu TJ, Czer L, Wolf PL, Denton TA, Shintaku IP, Chen PS, Chen LS. 2000. Relationship between regional cardiac hyperinnervation and ventricular arrhythmia. *Circulation* 101: 1960-9
179. Communal C, Colucci WS. 2005. The control of cardiomyocyte apoptosis via the beta-adrenergic signaling pathways. *Arch Mal Coeur Vaiss* 98: 236-41
180. Morita H, Suzuki G, Mishima T, Chaudhry PA, Anagnostopoulos PV, Tanhehco EJ, Sharov VG, Goldstein S, Sabbah HN. 2002. Effects of long-term monotherapy with metoprolol CR/XL on the progression of left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with chronic heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther* 16: 443-9
181. Chen PS, Chen LS, Cao JM, Sharifi B, Karagueuzian HS, Fishbein MC. 2001. Sympathetic nerve sprouting, electrical remodeling and the mechanisms of sudden cardiac death. *Cardiovasc Res* 50: 409-16
182. Tsai J, Cao JM, Zhou S, Swissa M, Cates AW, Kenknight BH, Chen LS, Karagueuzian HS, Chen PS. 2002. T wave alternans as a predictor of spontaneous ventricular tachycardia in a canine model of sudden cardiac death. *J Cardiovasc Electrophysiol* 13: 51-5
183. Li Z, Wang M, Zhang Y, Zheng S, Wang X, Hou Y. 2015. The effect of the left stellate ganglion on sympathetic neural remodeling of the left atrium in rats following myocardial infarction. *Pacing Clin Electrophysiol* 38: 107-14
184. Glebova NO, Ginty DD. 2004. Heterogeneous requirement of NGF for sympathetic target innervation in vivo. *J Neurosci* 24: 743-51
185. Korsching S, Thoenen H. 1985. Nerve growth factor supply for sensory neurons: site of origin and competition with the sympathetic nervous system. *Neurosci Lett* 54: 201-5
186. Hiltunen JO, Laurikainen A, Vakeva A, Meri S, Saarna M. 2001. Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor mRNAs are regulated in distinct cell populations of rat heart after ischaemia and reperfusion. *J Pathol* 194: 247-53
187. Hassankhani A, Steinhilper ME, Soonpaa MH, Katz EB, Taylor DA, Andrade-Rozental A, Factor SM, Steinberg JJ, Field LJ, Federoff HJ. 1995. Overexpression of NGF within the heart of transgenic mice causes hyperinnervation, cardiac enlargement, and hyperplasia of ectopic cells. *Dev Biol* 169: 309-21
188. Fahnstock M. 1991. Structure and biosynthesis of nerve growth factor. *Curr Top Microbiol Immunol* 165: 1-26
189. Gunn-Moore FJ, Tavaré JM. 1998. Progress toward understanding the molecular mechanisms of neurotrophic factor signalling. *Cell Signal* 10: 151-7
190. Han BH, Holtzman DM. 2000. BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J Neurosci* 20: 5775-81



191. Wang Y, Suo F, Liu J, Hu H, Xue M, Cheng W, Xuan Y, Yan S. 2013. Myocardial infarction induces sympathetic hyperinnervation via a nuclear factor-kappaB-dependent pathway in rabbit hearts. *Neurosci Lett* 535: 128-33
192. Caporali A, Emanuelli C. 2009. Cardiovascular actions of neurotrophins. *Physiol Rev* 89: 279-308
193. Caporali A, Sala-Newby GB, Meloni M, Graiani G, Pani E, Cristofaro B, Newby AC, Madeddu P, Emanuelli C. 2008. Identification of the prosurvival activity of nerve growth factor on cardiac myocytes. *Cell Death Differ* 15: 299-311
194. Meloni M, Descamps B, Caporali A, Zentilin L, Floris I, Giacca M, Emanuelli C. 2012. Nerve growth factor gene therapy using adeno-associated viral vectors prevents cardiomyopathy in type 1 diabetic mice. *Diabetes* 61: 229-40
195. Hayworth CR, Moody SE, Chodosh LA, Krieg P, Rimer M, Thompson WJ. 2006. Induction of neuregulin signaling in mouse schwann cells in vivo mimics responses to denervation. *J Neurosci* 26: 6873-84
196. Kang H, Tian L, Son YJ, Zuo Y, Procaccino D, Love F, Hayworth C, Trachtenberg J, Mikesch M, Sutton L, Ponomareva O, Mignone J, Enikolopov G, Rimer M, Thompson W. 2007. Regulation of the intermediate filament protein nestin at rodent neuromuscular junctions by innervation and activity. *J Neurosci* 27: 5948-57
197. Grasselli G, Mandolesi G, Strata P, Cesare P. 2011. Impaired sprouting and axonal atrophy in cerebellar climbing fibres following in vivo silencing of the growth-associated protein GAP-43. *PLoS One* 6: e20791
198. Benowitz LI, Routtenberg A. 1997. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 20: 84-91
199. Rekart JL, Meiri K, Routtenberg A. 2005. Hippocampal-dependent memory is impaired in heterozygous GAP-43 knockout mice. *Hippocampus* 15: 1-7
200. Leu B, Koch E, Schmidt JT. 2010. GAP43 phosphorylation is critical for growth and branching of retinotectal arbors in zebrafish. *Dev Neurobiol* 70: 897-911
201. Tedeschi A, Nguyen T, Puttagunta R, Gaub P, Di Giovanni S. 2009. A p53-CBP/p300 transcription module is required for GAP-43 expression, axon outgrowth, and regeneration. *Cell Death Differ* 16: 543-54
202. Aigner L, Arber S, Kapfhammer JP, Laux T, Schneider C, Botteri F, Brenner HR, Caroni P. 1995. Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice. *Cell* 83: 269-78
203. Xu QG, Midha R, Martinez JA, Guo GF, Zochodne DW. 2008. Facilitated sprouting in a peripheral nerve injury. *Neuroscience* 152: 877-87
204. Manabe I, Shindo T, Nagai R. 2002. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 91: 1103-13
205. Weber KT, Pick R, Jalil JE, Janicki JS, Carroll EP. 1989. Patterns of myocardial fibrosis. *J Mol Cell Cardiol* 21 Suppl 5: 121-31
206. Swynghedauw B. 1999. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 79: 215-62
207. Brilla CG, Weber KT. 1992. Reactive and reparative myocardial fibrosis in arterial hypertension in the rat. *Cardiovasc Res* 26: 671-7



208. Modena MG, Aveta P, Menozzi A, Rossi R. 2001. Aldosterone inhibition limits collagen synthesis and progressive left ventricular enlargement after anterior myocardial infarction. *Am Heart J* 141: 41-6
209. Sabbah HN, Sharov VG, Lesch M, Goldstein S. 1995. Progression of heart failure: a role for interstitial fibrosis. *Mol Cell Biochem* 147: 29-34
210. Kumar A, Cannon CP. 2009. Acute coronary syndromes: diagnosis and management, part I. *Mayo Clin Proc* 84: 917-38
211. Thygesen K, Alpert JS, White HD, Jaffe AS, Apple FS, Galvani M, Katus HA, Newby LK, Ravkilde J, Chaitman B, Clemmensen PM, Dellborg M, Hod H, Porela P, Underwood R, Bax JJ, Beller GA, Bonow R, Van der Wall EE, Bassand JP, Wijns W, Ferguson TB, Steg PG, Uretsky BF, Williams DO, Armstrong PW, Antman EM, Fox KA, Hamm CW, Ohman EM, Simoons ML, Poole-Wilson PA, Gurfinkel EP, Lopez-Sendon JL, Pais P, Mendis S, Zhu JR, Wallentin LC, Fernandez-Aviles F, Fox KM, Parkhomenko AN, Priori SG, Tendera M, Voipio-Pulkki LM, Vahanian A, Camm AJ, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellems I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Widimsky P, Zamorano JL, Morais J, Brener S, Harrington R, Morrow D, Lim M, Martinez-Rios MA, Steinhubl S, Levine GN, Gibler WB, Goff D, Tubaro M, Dudek D, Al-Attar N. 2007. Universal definition of myocardial infarction. *Circulation* 116: 2634-53
212. Kumar A, Cannon CP. 2009. Acute coronary syndromes: Diagnosis and management, part II. *Mayo Clin Proc* 84: 1021-36
213. Antman EM. 2002. Decision making with cardiac troponin tests. *N Engl J Med* 346: 2079-82
214. Jaffe AS, Babuin L, Apple FS. 2006. Biomarkers in acute cardiac disease: the present and the future. *J Am Coll Cardiol* 48: 1-11
215. Penttila K, Koukkunen H, Halinen M, Rantanen T, Pyorala K, Punnonen K, Penttila I. 2002. Myoglobin, creatine kinase MB isoforms and creatine kinase MB mass in early diagnosis of myocardial infarction in patients with acute chest pain. *Clin Biochem* 35: 647-53
216. Jaffe AS, Ravkilde J, Roberts R, Naslund U, Apple FS, Galvani M, Katus H. 2000. It's time for a change to a troponin standard. *Circulation* 102: 1216-20
217. Apple FS. 1999. Tissue specificity of cardiac troponin I, cardiac troponin T and creatine kinase-MB. *Clin Chim Acta* 284: 151-9
218. Apple FS, Quist HE, Doyle PJ, Otto AP, Murakami MM. 2003. Plasma 99th percentile reference limits for cardiac troponin and creatine kinase MB mass for use with European Society of Cardiology/American College of Cardiology consensus recommendations. *Clin Chem* 49: 1331-6
219. Keeley EC, Boura JA, Grines CL. 2003. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet* 361: 13-20
220. Van de Werf FJ, Topol EJ, Sobel BE. 2009. The impact of fibrinolytic therapy for ST-segment-elevation acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost* 7: 14-20
221. Antman EM, Anbe DT, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Hand M, Hochman JS, Krumholz HM, Kushner FG, Lamas GA, Mullany CJ, Ornato JP, Pearle DL, Sloan MA, Smith SC, Jr., Alpert JS, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Gibbons RJ, Gregoratos G, Halperin JL, Hiratzka LF, Hunt SA, Jacobs AK. 2004. ACC/AHA

- guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction; A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1999 Guidelines for the Management of patients with acute myocardial infarction). *J Am Coll Cardiol* 44: E1-E211
222. Antman EM, Hand M, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Halasyamani LK, Hochman JS, Krumholz HM, Lamas GA, Mullany CJ, Pearle DL, Sloan MA, Smith SC, Jr., Anbe DT, Kushner FG, Ornato JP, Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Buller CE, Creager MA, Ettinger SM, Halperin JL, Hunt SA, Lytle BW, Nishimura R, Page RL, Riegel B, Tarkington LG, Yancy CW. 2008. 2007 Focused Update of the ACC/AHA 2004 Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration With the Canadian Cardiovascular Society endorsed by the American Academy of Family Physicians: 2007 Writing Group to Review New Evidence and Update the ACC/AHA 2004 Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction, Writing on Behalf of the 2004 Writing Committee. *Circulation* 117: 296-329
  223. Schoen FJ, Mitchell RN. 2010. The heart. In *Robbins & Cotran pathologic basis of disease, 8th ed.*, ed. V Kumar, A Abbas, N Fausto, pp. 529-87. Philadelphia: Saunders Elsevier
  224. Vargas SO, Sampson BA, Schoen FJ. 1999. Pathologic detection of early myocardial infarction: a critical review of the evolution and usefulness of modern techniques. *Mod Pathol* 12: 635-45
  225. Granfeldt A, Lefer DJ, Vinten-Johansen J. 2009. Protective ischaemia in patients: preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res* 83: 234-46
  226. Laskey WK, Yoon S, Calzada N, Ricciardi MJ. 2008. Concordant improvements in coronary flow reserve and ST-segment resolution during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a benefit of postconditioning. *Catheter Cardiovasc Interv* 72: 212-20
  227. Thibault H, Piot C, Staat P, Bontemps L, Sportouch C, Rioufol G, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Aupetit JF, Finet G, Andre-Fouet X, Macia JC, Raczka F, Rossi R, Itti R, Kirkorian G, Derumeaux G, Ovize M. 2008. Long-term benefit of postconditioning. *Circulation* 117: 1037-44
  228. Walsh CT, Schwartz-Bloom RD. 2005. *Levine's pharmacology drug actions and reactions*. Italy: Taylor & Francis. 561 pp.
  229. Regoli D, Plante GE, Gobeil F, Jr. 2012. Impact of kinins in the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther* 135: 94-111
  230. Regoli D, Park WK, Rioux F. 1974. Pharmacology of angiotensin. *Pharmacol Rev* 26: 69-123
  231. Carey RM, Padia SH. 2008. Angiotensin AT2 receptors: control of renal sodium excretion and blood pressure. *Trends Endocrinol Metab* 19: 84-7
  232. Cruden NL, Newby DE. 2005. Clots, kinins and coronaries. *Atherosclerosis* 183: 189-98
  233. Kakoki M, McGarrah RW, Kim HS, Smithies O. 2007. Bradykinin B1 and B2 receptors both have protective roles in renal ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 7576-81

234. Latini R, Maggioni AP, Flather M, Sleight P, Tognoni G. 1995. ACE inhibitor use in patients with myocardial infarction. Summary of evidence from clinical trials. *Circulation* 92: 3132-7
235. Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, Rouleau JL, Kober L, Maggioni AP, Solomon SD, Swedberg K, Van de Werf F, White H, Leimberger JD, Henis M, Edwards S, Zelenkofske S, Sellers MA, Califf RM. 2003. Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med* 349: 1893-906
236. Suzuki G, Morita H, Mishima T, Sharov VG, Todor A, Tanhehco EJ, Rudolph AE, McMahon EG, Goldstein S, Sabbah HN. 2002. Effects of long-term monotherapy with eplerenone, a novel aldosterone blocker, on progression of left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with heart failure. *Circulation* 106: 2967-72
237. Silvestre JS, Heymes C, Oubenaissa A, Robert V, Aupetit-Faisant B, Carayon A, Swynghedauw B, Delcayre C. 1999. Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis. *Circulation* 99: 2694-701
238. Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B. 2000. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation* 102: 2700-6
239. Mill JG, Milanez Mda C, de Resende MM, Gomes Mda G, Leite CM. 2003. Spironolactone prevents cardiac collagen proliferation after myocardial infarction in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30: 739-44
240. Zhang YL, Zhou SX, Lei J, Yuan GY, Wang JF. 2008. Blockades of angiotensin and aldosterone reduce osteopontin expression and interstitial fibrosis infiltration in rats with myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)* 121: 2192-6
241. Takeda M, Tatsumi T, Matsunaga S, Hayashi H, Kimata M, Honsho S, Nishikawa S, Mano A, Shiraishi J, Yamada H, Takahashi T, Matoba S, Kobara M, Matsubara H. 2007. Spironolactone modulates expressions of cardiac mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 and prevents ventricular remodeling in post-infarct rat hearts. *Hypertens Res* 30: 427-37
242. Chai W, Garrelds IM, de Vries R, Danser AH. 2006. Cardioprotective effects of eplerenone in the rat heart: interaction with locally synthesized or blood-derived aldosterone? *Hypertension* 47: 665-70
243. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. 1999. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 341: 709-17
244. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M. 2003. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 348: 1309-21
245. Zannad F, McMurray JJ, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, Vincent J, Pocock SJ, Pitt B. 2011. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med* 364: 11-21

246. Albert NM, Yancy CW, Liang L, Zhao X, Hernandez AF, Peterson ED, Cannon CP, Fonarow GC. 2009. Use of aldosterone antagonists in heart failure. *JAMA* 302: 1658-65
247. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW. 2009. 2009 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Am Coll Cardiol* 53: e1-e90
248. Svendsen A. 2003. Heart failure: an overview of consensus guidelines and nursing implications. *Can J Cardiovasc Nurs* 13: 30-4
249. 1988. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *Lancet* 2: 349-60
250. Chen ZM, Jiang LX, Chen YP, Xie JX, Pan HC, Peto R, Collins R, Liu LS. 2005. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 366: 1607-21
251. Sabatine MS, Cannon CP, Gibson CM, Lopez-Sendon JL, Montalescot G, Theroux P, Claeys MJ, Cools F, Hill KA, Skene AM, McCabe CH, Braunwald E. 2005. Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation. *N Engl J Med* 352: 1179-89
252. Burke DA, Warraich HJ, Pinto DS. 2012. Which antithrombin for whom? Identifying the patient population that benefits most from novel antithrombin agents. *Curr Cardiol Rep* 14: 493-501
253. Parmacek MS, Epstein JA. 2009. Cardiomyocyte renewal. *N Engl J Med* 361: 86-8
254. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. 2001. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410: 701-5
255. Cai CL, Martin JC, Sun Y, Cui L, Wang L, Ouyang K, Yang L, Bu L, Liang X, Zhang X, Stallcup WB, Denton CP, McCulloch A, Chen J, Evans SM. 2008. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature* 454: 104-8
256. Parmacek MS, Epstein JA. 2005. Pursuing cardiac progenitors: regeneration redux. *Cell* 120: 295-8
257. Chou SH, Lin SZ, Kuo WW, Pai P, Lin JY, Lai CH, Kuo CH, Lin KH, Tsai FJ, Huang CY. 2014. Mesenchymal stem cell insights: prospects in cardiovascular therapy. *Cell Transplant* 23: 513-29
258. Muraoka N, Ieda M. 2014. Direct reprogramming of fibroblasts into myocytes to reverse fibrosis. *Annu Rev Physiol* 76: 21-37
259. Srivastava D, Berry EC. 2013. Cardiac reprogramming: from mouse toward man. *Curr Opin Genet Dev* 23: 574-8
260. Jayawardena TM, Egemnazarov B, Finch EA, Zhang L, Payne JA, Pandya K, Zhang Z, Rosenberg P, Mirotsoy M, Dzau VJ. 2012. MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ Res* 110: 1465-73



261. Qian L, Huang Y, Spencer CI, Foley A, Vedantham V, Liu L, Conway SJ, Fu JD, Srivastava D. 2012. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* 485: 593-8
262. Song K, Nam YJ, Luo X, Qi X, Tan W, Huang GN, Acharya A, Smith CL, Tallquist MD, Neilson EG, Hill JA, Bassel-Duby R, Olson EN. 2012. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature* 485: 599-604
263. Nam YJ, Song K, Luo X, Daniel E, Lambeth K, West K, Hill JA, DiMaio JM, Baker LA, Bassel-Duby R, Olson EN. 2013. Reprogramming of human fibroblasts toward a cardiac fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 5588-93
264. Wada R, Muraoka N, Inagawa K, Yamakawa H, Miyamoto K, Sadahiro T, Umei T, Kaneda R, Suzuki T, Kamiya K, Tohyama S, Yuasa S, Kokaji K, Aeba R, Yozu R, Yamagishi H, Kitamura T, Fukuda K, Ieda M. 2013. Induction of human cardiomyocyte-like cells from fibroblasts by defined factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 12667-72
265. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, Czer LS, Marban L, Mendizabal A, Johnston PV, Russell SD, Schuleri KH, Lardo AC, Gerstenblith G, Marban E. 2012. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet* 379: 895-904
266. Dill T, Schachinger V, Rolf A, Mollmann S, Thiele H, Tillmanns H, Assmus B, Dimmeler S, Zeiher AM, Hamm C. 2009. Intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells improves left ventricular function in patients at risk for adverse remodeling after acute ST-segment elevation myocardial infarction: results of the Reinfusion of Enriched Progenitor cells And Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction study (REPAIR-AMI) cardiac magnetic resonance imaging substudy. *Am Heart J* 157: 541-7
267. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de Werf F. 2006. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 367: 113-21
268. Chugh AR, Beache GM, Loughran JH, Mewton N, Elmore JB, Kajstura J, Pappas P, Tatroles A, Stoddard MF, Lima JA, Slaughter MS, Anversa P, Bolli R. 2012. Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCIPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance. *Circulation* 126: S54-64
269. Calderone A. 2008. Identifying the cellular and molecular events associated with the divergent phenotypes of cardiac hypertrophy. In *Advances in biochemistry in Health and Disease: Signal Transduction in Cardiovascular System in Health and Disease*, ed. AK Srivastava, MB Anand-Srivastava. New York: Springer Publishers, p.229-47.
270. Anversa P, Levicky V, Beghi C, McDonald SL, Kikkawa Y. 1983. Morphometry of exercise-induced right ventricular hypertrophy in the rat. *Circ Res* 52: 57-64
271. Anversa P, Ricci R, Olivetti G. 1986. Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy: a review. *J Am Coll Cardiol* 7: 1140-9

272. Jin H, Yang R, Li W, Lu H, Ryan AM, Ogasawara AK, Van Peborgh J, Paoni NF. 2000. Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H2994-3002
273. Moore RL, Musch TI, Yelamarty RV, Scaduto RC, Jr., Semanchick AM, Elensky M, Cheung JY. 1993. Chronic exercise alters contractility and morphology of isolated rat cardiac myocytes. *Am J Physiol* 264: C1180-9
274. Calderone A, Murphy RJ, Lavoie J, Colombo F, Beliveau L. 2001. TGF-beta(1) and prepro-ANP mRNAs are differentially regulated in exercise-induced cardiac hypertrophy. *J Appl Physiol (1985)* 91: 771-6
275. Diffie GM, Seversen EA, Stein TD, Johnson JA. 2003. Microarray expression analysis of effects of exercise training: increase in atrial MLC-1 in rat ventricles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H830-7
276. McMullen JR, Shioi T, Zhang L, Tarnavski O, Sherwood MC, Kang PM, Izumo S. 2003. Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12355-60
277. Gerdes AM, Campbell SE, Hilbelink DR. 1988. Structural remodeling of cardiac myocytes in rats with arteriovenous fistulas. *Lab Invest* 59: 857-61
278. Grossman W, Jones D, McLaurin LP. 1975. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56: 56-64
279. Braunwald E. 1992. *Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine (4th edition)*: W. B. Saunders Company
280. Marino TA, Kent RL, Uboh CE, Fernandez E, Thompson EW, Cooper Gt. 1985. Structural analysis of pressure versus volume overload hypertrophy of cat right ventricle. *Am J Physiol* 249: H371-9
281. Calderone A, Takahashi N, Izzo NJ, Jr., Thaik CM, Colucci WS. 1995. Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation* 92: 2385-90
282. Morkin E. 1970. Postnatal muscle fiber assembly: localization of newly synthesized myofibrillar proteins. *Science* 167: 1499-501
283. Black FM, Packer SE, Parker TG, Michael LH, Roberts R, Schwartz RJ, Schneider MD. 1991. The vascular smooth muscle alpha-actin gene is reactivated during cardiac hypertrophy provoked by load. *J Clin Invest* 88: 1581-8
284. de la Bastie D, Levitsky D, Rappaport L, Mercadier JJ, Marotte F, Wisnewsky C, Brovkovich V, Schwartz K, Lompre AM. 1990. Function of the sarcoplasmic reticulum and expression of its Ca<sup>2+</sup>(+)-ATPase gene in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Circ Res* 66: 554-64
285. Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. 1988. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 339-43
286. Mercadier JJ, Lompre AM, Wisnewsky C, Samuel JL, Bercovici J, Swynghedauw B, Schwartz K. 1981. Myosin isoenzyme changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ Res* 49: 525-32
287. Schiaffino S, Samuel JL, Sassoon D, Lompre AM, Garner I, Marotte F, Buckingham M, Rappaport L, Schwartz K. 1989. Nonsynchronous accumulation of alpha-skeletal



- actin and beta-myosin heavy chain mRNAs during early stages of pressure-overload--induced cardiac hypertrophy demonstrated by in situ hybridization. *Circ Res* 64: 937-48
288. Katz AM. 1990. Cardiomyopathy of overload. A major determinant of prognosis in congestive heart failure. *N Engl J Med* 322: 100-10
  289. Calderone A, Thaik CM, Takahashi N, Chang DL, Colucci WS. 1998. Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J Clin Invest* 101: 812-8
  290. Ellmers LJ, Knowles JW, Kim HS, Smithies O, Maeda N, Cameron VA. 2002. Ventricular expression of natriuretic peptides in Npr1(-/-) mice with cardiac hypertrophy and fibrosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H707-14
  291. Arai M, Matsui H, Periasamy M. 1994. Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 74: 555-64
  292. Hollenhorst MI, Richter K, Fronius M. 2011. Ion transport by pulmonary epithelia. *J Biomed Biotechnol* 2011: 174306
  293. Guillot L, Nathan N, Tabary O, Thouvenin G, Le Rouzic P, Corvol H, Amselem S, Clement A. 2013. Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 2568-73
  294. Whitsett JA, Wert SE, Weaver TE. 2010. Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease. *Annu Rev Med* 61: 105-19
  295. Chabot A, Jiang BH, Shi Y, Tardif JC, Dupuis J. 2011. Role of aldosterone on lung structural remodelling and right ventricular function in congestive heart failure. *BMC Cardiovasc Disord* 11: 72
  296. Jiang BH, Tardif JC, Sauvageau S, Ducharme A, Shi Y, Martin JG, Dupuis J. 2010. Beneficial effects of atorvastatin on lung structural remodeling and function in ischemic heart failure. *J Card Fail* 16: 679-88
  297. Jiang BH, Tardif JC, Shi Y, Dupuis J. 2011. Bosentan does not improve pulmonary hypertension and lung remodeling in heart failure. *Eur Respir J* 37: 578-86
  298. Johnson MD. 2007. Ion transport in alveolar type I cells. *Mol Biosyst* 3: 178-86
  299. Almeida C, Nagarajan D, Tian J, Leal SW, Wheeler K, Munley M, Blackstock W, Zhao W. 2013. The role of alveolar epithelium in radiation-induced lung injury. *PLoS One* 8: e53628
  300. Zhang Z, Chen Z, Song Y, Zhang P, Hu J, Bai C. 2010. Expression of aquaporin 5 increases proliferation and metastasis potential of lung cancer. *J Pathol* 221: 210-20
  301. Verkman AS. 2007. Role of aquaporins in lung liquid physiology. *Respir Physiol Neurobiol* 159: 324-30
  302. Zemans RL, Matthay MA. 2004. Bench-to-bedside review: the role of the alveolar epithelium in the resolution of pulmonary edema in acute lung injury. *Crit Care* 8: 469-77
  303. Ma T, Fukuda N, Song Y, Matthay MA, Verkman AS. 2000. Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice. *J Clin Invest* 105: 93-100
  304. Fehrenbach H. 2001. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res* 2: 33-46
  305. Matthay MA, Robriquet L, Fang X. 2005. Alveolar epithelium: role in lung fluid balance and acute lung injury. *Proc Am Thorac Soc* 2: 206-13

306. Solymosi EA, Kaestle-Gembaradt SM, Vadasz I, Wang L, Neye N, Chupin CJ, Rozowsky S, Ruehl R, Tabuchi A, Schulz H, Kapus A, Morty RE, Kuebler WM. 2013. Chloride transport-driven alveolar fluid secretion is a major contributor to cardiogenic lung edema. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E2308-16
307. Matalon S, Bartoszewski R, Collawn JF. 2015. Role of Epithelial Sodium Channels (ENaC) in the Regulation of Lung Fluid Homeostasis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*: ajplung 00319 2015
308. Pitkanen OM, O'Brodovich HM. 1998. Significance of ion transport during lung development and in respiratory disease of the newborn. *Ann Med* 30: 134-42
309. Kemp PJ, Kim KJ. 2004. Spectrum of ion channels in alveolar epithelial cells: implications for alveolar fluid balance. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L460-4
310. Prefontaine A, Calderone A, Dupuis J. 2008. Role of endothelin receptors on basal and endothelin-1-stimulated lung myofibroblast proliferation. *Can J Physiol Pharmacol* 86: 337-42
311. Jasmin JF, Calderone A, Leung TK, Villeneuve L, Dupuis J. 2003. Lung structural remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: complete reversal with irbesartan. *Cardiovasc Res* 58: 621-31
312. Klingberg F, Hinz B, White ES. 2013. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *J Pathol* 229: 298-309
313. Gabbiani G, Majno G. 1972. Dupuytren's contracture: fibroblast contraction? An ultrastructural study. *Am J Pathol* 66: 131-46
314. Hinz B. 2010. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *J Biomech* 43: 146-55
315. Kaartenaho-Wiik R, Paakko P, Sormunen R. 2009. Ultrastructural features of lung fibroblast differentiation into myofibroblasts. *Ultrastruct Pathol* 33: 6-15
316. Hirschi KK, D'Amore PA. 1996. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* 32: 687-98
317. Zhang K, Rekhter MD, Gordon D, Phan SH. 1994. Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* 145: 114-25
318. Shepro D, Morel NM. 1993. Pericyte physiology. *FASEB J* 7: 1031-8
319. Eyden B. 2003. Electron microscopy in the study of myofibroblastic lesions. *Semin Diagn Pathol* 20: 13-24
320. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmouliere A, Varga J, De Wever O, Mareel M, Gabbiani G. 2012. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol* 180: 1340-55
321. Plantier L, Boczkowski J, Crestani B. 2007. Defect of alveolar regeneration in pulmonary emphysema: role of lung fibroblasts. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2: 463-9
322. Ignatz RA, Massague J. 1986. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261: 4337-45
323. Hoyles RK, Derrett-Smith EC, Khan K, Shiwen X, Howat SL, Wells AU, Abraham DJ, Denton CP. 2011. An essential role for resident fibroblasts in experimental lung

- fibrosis is defined by lineage-specific deletion of high-affinity type II transforming growth factor beta receptor. *Am J Respir Crit Care Med* 183: 249-61
324. Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, Valerius MT, McMahon AP, Duffield JS. 2010. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol* 176: 85-97
  325. Rock JR, Barkauskas CE, Cronic MJ, Xue Y, Harris JR, Liang J, Noble PW, Hogan BL. 2011. Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: E1475-83
  326. Speight P, Nakano H, Kelley TJ, Hinz B, Kapus A. 2013. Differential topical susceptibility to TGFbeta in intact and injured regions of the epithelium: key role in myofibroblast transition. *Mol Biol Cell* 24: 3326-36
  327. Hardie WD, Glasser SW, Hagood JS. 2009. Emerging concepts in the pathogenesis of lung fibrosis. *Am J Pathol* 175: 3-16
  328. Kage H, Borok Z. 2012. EMT and interstitial lung disease: a mysterious relationship. *Curr Opin Pulm Med* 18: 517-23
  329. Sirianni FE, Chu FS, Walker DC. 2003. Human alveolar wall fibroblasts directly link epithelial type 2 cells to capillary endothelium. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 1532-7
  330. Gross TJ, Hunninghake GW. 2001. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 345: 517-25
  331. Huang W, Kingsbury MP, Turner MA, Donnelly JL, Flores NA, Sheridan DJ. 2001. Capillary filtration is reduced in lungs adapted to chronic heart failure: morphological and haemodynamic correlates. *Cardiovasc Res* 49: 207-17
  332. Kingsbury MP, Huang W, Donnelly JL, Jackson E, Needham E, Turner MA, Sheridan DJ. 2003. Structural remodelling of lungs in chronic heart failure. *Basic Res Cardiol* 98: 295-303
  333. Gehlbach BK, Geppert E. 2004. The pulmonary manifestations of left heart failure. *Chest* 125: 669-82
  334. Dupuis J, Guazzi M. 2015. Pathophysiology and clinical relevance of pulmonary remodelling in pulmonary hypertension due to left heart diseases. *Can J Cardiol* 31: 416-29
  335. Lourenco AP, Fontoura D, Henriques-Coelho T, Leite-Moreira AF. 2011. Current pathophysiological concepts and management of pulmonary hypertension. *Int J Cardiol*, 155(3): 350-361
  336. Seferian A, Simonneau G. 2014. [Pulmonary hypertension: definition, diagnostic and new classification]. *Presse Med* 43: 935-44
  337. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R. 2013. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 62: D34-41
  338. Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M, Langleben D, Manes A, Satoh T, Torres F, Wilkins MR, Badesch DB. 2013. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 62: D42-50
  339. Vachiery JL, Adir Y, Barbera JA, Champion H, Coghlan JG, Cottin V, De Marco T, Galie N, Ghio S, Gibbs JS, Martinez F, Semigran M, Simonneau G, Wells A, Seeger

- W. 2013. Pulmonary hypertension due to left heart diseases. *J Am Coll Cardiol* 62: D100-8
340. Mathier MA. 2013. Pulmonary hypertension owing to left heart disease. *Clin Chest Med* 34: 683-94
341. Raghu G, Brown KK. 2004. Interstitial lung disease: clinical evaluation and keys to an accurate diagnosis. *Clin Chest Med* 25: 409-19, v
342. Arciniegas E, Neves CY, Carrillo LM, Zambrano EA, Ramirez R. 2005. Endothelial-mesenchymal transition occurs during embryonic pulmonary artery development. *Endothelium* 12: 193-200
343. McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, Barst RJ, Farber HW, Lindner JR, Mathier MA, McGoon MD, Park MH, Rosenson RS, Rubin LJ, Tapson VF, Varga J. 2009. ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association. *J Am Coll Cardiol* 53: 1573-619
344. Butler J, Chomsky DB, Wilson JR. 1999. Pulmonary hypertension and exercise intolerance in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 34: 1802-6
345. Ghio S, Gavazzi A, Campana C, Inserra C, Klersy C, Sebastiani R, Arbustini E, Recusani F, Tavazzi L. 2001. Independent and additive prognostic value of right ventricular systolic function and pulmonary artery pressure in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 37: 183-8
346. Hoeper MM, Barbera JA, Channick RN, Hassoun PM, Lang IM, Manes A, Martinez FJ, Naeije R, Olschewski H, Pepke-Zaba J, Redfield MM, Robbins IM, Souza R, Torbicki A, McGoon M. 2009. Diagnosis, assessment, and treatment of non-pulmonary arterial hypertension pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54: S85-96
347. Abramson SV, Burke JF, Kelly JJ, Jr., Kitchen JG, 3rd, Dougherty MJ, Yih DF, McGeehin FC, 3rd, Shuck JW, Phiambolis TP. 1992. Pulmonary hypertension predicts mortality and morbidity in patients with dilated cardiomyopathy. *Ann Intern Med* 116: 888-95
348. Kapanci Y, Burgan S, Pietra GG, Conne B, Gabbiani G. 1990. Modulation of actin isoform expression in alveolar myofibroblasts (contractile interstitial cells) during pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 136: 881-9
349. Dimopoulou I, Daganou M, Tsintzas OK, Tzelepis GE. 1998. Effects of severity of long-standing congestive heart failure on pulmonary function. *Respir Med* 92: 1321-5
350. Mettauer B, Lampert E, Charloux A, Zhao QM, Epailly E, Oswald M, Frans A, Piquard F, Lonsdorfer J. 1999. Lung membrane diffusing capacity, heart failure, and heart transplantation. *Am J Cardiol* 83: 62-7
351. Raghu G, Nyberg F, Morgan G. 2004. The epidemiology of interstitial lung disease and its association with lung cancer. *Br J Cancer* 91 Suppl 2: S3-10
352. Sitbon O, Savale L, Jais X, Montani D, Humbert M, Simonneau G. 2014. [Treatment of pulmonary arterial hypertension]. *Presse Med* 43: 981-93
353. Gartner F, Seidel T, Schulz U, Gummert J, Milting H. 2013. Desensitization and internalization of endothelin receptor A: impact of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2)-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 288: 32138-48

354. Califf RM, Adams KF, McKenna WJ, Gheorghide M, Uretsky BF, McNulty SE, Darius H, Schulman K, Zannad F, Handberg-Thurmond E, Harrell FE, Jr., Wheeler W, Soler-Soler J, Swedberg K. 1997. A randomized controlled trial of epoprostenol therapy for severe congestive heart failure: The Flolan International Randomized Survival Trial (FIRST). *Am Heart J* 134: 44-54
355. Mylona P, Cleland JG. 1999. Update of REACH-1 and MERIT-HF clinical trials in heart failure. Cardio.net Editorial Team. *Eur J Heart Fail* 1: 197-200
356. Teerlink JR. 2002. Recent heart failure trials of neurohormonal modulation (OVERTURE and ENABLE): approaching the asymptote of efficacy? *J Card Fail* 8: 124-7
357. Lewis GD, Lachmann J, Camuso J, Lepore JJ, Shin J, Martinovic ME, Systrom DM, Bloch KD, Semigran MJ. 2007. Sildenafil improves exercise hemodynamics and oxygen uptake in patients with systolic heart failure. *Circulation* 115: 59-66
358. Lepore JJ, Maroo A, Bigatello LM, Dec GW, Zapol WM, Bloch KD, Semigran MJ. 2005. Hemodynamic effects of sildenafil in patients with congestive heart failure and pulmonary hypertension: combined administration with inhaled nitric oxide. *Chest* 127: 1647-53
359. Alaeddini J, Uber PA, Park MH, Scott RL, Ventura HO, Mehra MR. 2004. Efficacy and safety of sildenafil in the evaluation of pulmonary hypertension in severe heart failure. *Am J Cardiol* 94: 1475-7
360. Redfield MM, Borlaug BA, Lewis GD, Mohammed SF, Semigran MJ, Lewinter MM, Deswal A, Hernandez AF, Lee KL, Braunwald E. 2012. Phosphodiesterase-5 Inhibition to Improve CLinical Status and EXercise Capacity in Diastolic Heart Failure (RELAX) trial: rationale and design. *Circ Heart Fail* 5: 653-9
361. Redfield MM, Chen HH, Borlaug BA, Semigran MJ, Lee KL, Lewis G, LeWinter MM, Rouleau JL, Bull DA, Mann DL, Deswal A, Stevenson LW, Givertz MM, Ofili EO, O'Connor CM, Felker GM, Goldsmith SR, Bart BA, McNulty SE, Ibarra JC, Lin G, Oh JK, Patel MR, Kim RJ, Tracy RP, Velazquez EJ, Anstrom KJ, Hernandez AF, Mascette AM, Braunwald E. 2013. Effect of phosphodiesterase-5 inhibition on exercise capacity and clinical status in heart failure with preserved ejection fraction: a randomized clinical trial. *JAMA* 309: 1268-77
362. 2011. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 34 Suppl 1: S62-9
363. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, Lin JK, Farzadfar F, Khang YH, Stevens GA, Rao M, Ali MK, Riley LM, Robinson CA, Ezzati M. 2011. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet* 378: 31-40
364. Forbes JM, Cooper ME. 2013. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev* 93: 137-88
365. Jellinger PS. 2007. Metabolic consequences of hyperglycemia and insulin resistance. *Clin Cornerstone* 8 Suppl 7: S30-42
366. Kido Y, Nakae J, Accili D. 2001. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 972-9
367. Mueckler M. 1994. Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* 219: 713-25



368. Charron MJ, Gorovits N, Laidlaw JS, Ranalletta M, Katz EB. 2005. Use of GLUT-4 null mice to study skeletal muscle glucose uptake. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32: 308-13
369. Petersen KF, Shulman GI. 2006. Etiology of insulin resistance. *Am J Med* 119: S10-6
370. Magnan C, Ktorza A. 2005. Production et sécrétion de l'insuline par la cellule b pancréatique. In *EMC-Endocrinologie*, ed. Elsevier, pp. 241-64
371. Marieb EN. 2005. *Anatomie et physiologie humaines*. Canada: ERPI. 1288 pp.
372. Mosbah H, Andreelli F. 2012. Physiologie de la sécrétion d'insuline: Physiology of insulin secretion. In *Médecine des Maladies Métaboliques*, ed. Elsevier, pp. 215-9
373. Drucker DJ. 2006. The biology of incretin hormones. *Cell Metab* 3: 153-65
374. Mima A, Hiraoka-Yamamoto J, Li Q, Kitada M, Li C, Gerald P, Matsumoto M, Mizutani K, Park K, Cahill C, Nishikawa S, Rask-Madsen C, King GL. 2012. Protective effects of GLP-1 on glomerular endothelium and its inhibition by PKC $\beta$  activation in diabetes. *Diabetes* 61: 2967-79
375. Peyser T, Dassau E, Breton M, Skyler JS. 2014. The artificial pancreas: current status and future prospects in the management of diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 1311: 102-23
376. Meirelles Junior RF, Salvalaggio P, Pacheco-Silva A. 2015. Pancreas transplantation: review. *Einstein (Sao Paulo)* 13: 305-9
377. Pfeiffer AF, Klein HH. 2014. The treatment of type 2 diabetes. *Dtsch Arztebl Int* 111: 69-81; quiz 2
378. Koro CE, Bowlin SJ, Bourgeois N, Fedder DO. 2004. Glycemic control from 1988 to 2000 among U.S. adults diagnosed with type 2 diabetes: a preliminary report. *Diabetes Care* 27: 17-20
379. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Lehrke M, Hendler RE, Shulman GI. 2005. Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 54: 603-8
380. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI. 1999. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* 103: 253-9
381. Halimi S. 2013. [Management of type 2 diabetes: new or previous agents, how to choose?]. *Presse Med* 42: 861-70
382. Rena G, Pearson ER, Sakamoto K. 2013. Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? *Diabetologia* 56: 1898-906
383. 1998. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 352: 854-65
384. Krentz AJ. 2006. Comparative safety of newer oral antidiabetic drugs. *Expert Opin Drug Saf* 5: 827-34
385. Hundal RS, Inzucchi SE. 2003. Metformin: new understandings, new uses. *Drugs* 63: 1879-94
386. Palamara KL, Mogul HR, Peterson SJ, Frishman WH. 2006. Obesity: new perspectives and pharmacotherapies. *Cardiol Rev* 14: 238-58
387. Miller BR, Nguyen H, Hu CJ, Lin C, Nguyen QT. 2014. New and emerging drugs and targets for type 2 diabetes: reviewing the evidence. *Am Health Drug Benefits* 7: 452-63



388. Idris I, Donnelly R. 2009. Sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors: an emerging new class of oral antidiabetic drug. *Diabetes Obes Metab* 11: 79-88
389. Cade WT. 2008. Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Phys Ther* 88: 1322-35
390. Gerald P, King GL. 2010. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res* 106: 1319-31
391. Sheetz MJ, King GL. 2002. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA* 288: 2579-88
392. Rahman S, Rahman T, Ismail AA, Rashid AR. 2007. Diabetes-associated macrovasculopathy: pathophysiology and pathogenesis. *Diabetes Obes Metab* 9: 767-80
393. Costa PZ, Soares R. 2013. Neovascularization in diabetes and its complications. Unraveling the angiogenic paradox. *Life Sci* 92: 1037-45
394. Beckman JA, Creager MA, Libby P. 2002. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* 287: 2570-81
395. Wang XH, Chen SF, Jin HM, Hu RM. 2009. Differential analyses of angiogenesis and expression of growth factors in micro- and macrovascular endothelial cells of type 2 diabetic rats. *Life Sci* 84: 240-9
396. 1998. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 352: 837-53
397. 1993. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 329: 977-86
398. Singh R, Kishore L, Kaur N. 2014. Diabetic peripheral neuropathy: current perspective and future directions. *Pharmacol Res* 80: 21-35
399. El Mesallamy HO, Ahmed HH, Bassyouni AA, Ahmed AS. 2012. Clinical significance of inflammatory and fibrogenic cytokines in diabetic nephropathy. *Clin Biochem* 45: 646-50
400. Dyck PJ, Kratz KM, Karnes JL, Litchy WJ, Klein R, Pach JM, Wilson DM, O'Brien PC, Melton LJ, 3rd, Service FJ. 1993. The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology* 43: 817-24
401. Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, Freeman R. 2003. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care* 26: 1553-79
402. Athans W, Stephens H. 2008. Open calcaneal fractures in diabetic patients with neuropathy: a report of three cases and literature review. *Foot Ankle Int* 29: 1049-53
403. Gandhi RA, Marques JL, Selvarajah D, Emery CJ, Tesfaye S. 2010. Painful diabetic neuropathy is associated with greater autonomic dysfunction than painless diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 33: 1585-90
404. Boulton AJ, Kirsner RS, Vileikyte L. 2004. Clinical practice. Neuropathic diabetic foot ulcers. *N Engl J Med* 351: 48-55
405. Cao Z, Cooper ME. 2011. Pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Diabetes Investig* 2: 243-7
406. Majumder S, Advani A. 2015. The epigenetic regulation of podocyte function in diabetes. *J Diabetes Complications* 29, 1337-1344.

407. Abcouwer SF, Gardner TW. 2014. Diabetic retinopathy: loss of neuroretinal adaptation to the diabetic metabolic environment. *Ann N Y Acad Sci* 1311: 174-90
408. Kowluru RA, Chan PS. 2007. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res* 2007: 43603
409. Ebenezer GJ, O'Donnell R, Hauer P, Cimino NP, McArthur JC, Polydefkis M. 2011. Impaired neurovascular repair in subjects with diabetes following experimental intracutaneous axotomy. *Brain* 134: 1853-63
410. Schiekofer S, Galasso G, Sato K, Kraus BJ, Walsh K. 2005. Impaired revascularization in a mouse model of type 2 diabetes is associated with dysregulation of a complex angiogenic-regulatory network. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1603-9
411. Boodhwani M, Sodha NR, Mieno S, Xu SH, Feng J, Ramlawi B, Clements RT, Sellke FW. 2007. Functional, cellular, and molecular characterization of the angiogenic response to chronic myocardial ischemia in diabetes. *Circulation* 116: I31-7
412. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, et al. 1994. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 331: 1480-7
413. Rajala RV, Wiskur B, Tanito M, Callegan M, Rajala A. 2009. Diabetes reduces autophosphorylation of retinal insulin receptor and increases protein-tyrosine phosphatase-1B activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50: 1033-40
414. Reiter CE, Wu X, Sandirasegarane L, Nakamura M, Gilbert KA, Singh RS, Fort PE, Antonetti DA, Gardner TW. 2006. Diabetes reduces basal retinal insulin receptor signaling: reversal with systemic and local insulin. *Diabetes* 55: 1148-56
415. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. 2000. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 49: 1939-45
416. Dekker JM, Girman C, Rhodes T, Nijpels G, Stehouwer CD, Bouter LM, Heine RJ. 2005. Metabolic syndrome and 10-year cardiovascular disease risk in the Hoorn Study. *Circulation* 112: 666-73
417. Bloomgarden ZT. 2003. Cardiovascular disease and diabetes. *Diabetes Care* 26: 230-7
418. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT. 2002. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 288: 2709-16
419. Reusch JE, Draznin BB. 2007. Atherosclerosis in diabetes and insulin resistance. *Diabetes Obes Metab* 9: 455-63
420. Laakso M. 1999. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes* 48: 937-42
421. Wei M, Gaskill SP, Haffner SM, Stern MP. 1998. Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. The San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 21: 1167-72
422. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. 1998. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 339: 229-34

423. Beller GA. 2001. Coronary heart disease in the first 30 years of the 21st century: challenges and opportunities: The 33rd Annual James B. Herrick Lecture of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association. *Circulation* 103: 2428-35
424. Miettinen H, Lehto S, Salomaa V, Mahonen M, Niemela M, Haffner SM, Pyorala K, Tuomilehto J. 1998. Impact of diabetes on mortality after the first myocardial infarction. The FINMONICA Myocardial Infarction Register Study Group. *Diabetes Care* 21: 69-75
425. Nichols GA, Hillier TA, Erbey JR, Brown JB. 2001. Congestive heart failure in type 2 diabetes: prevalence, incidence, and risk factors. *Diabetes Care* 24: 1614-9
426. Shiomi T, Tsutsui H, Ikeuchi M, Matsusaka H, Hayashidani S, Suematsu N, Wen J, Kubota T, Takeshita A. 2003. Streptozotocin-induced hyperglycemia exacerbates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 42: 165-72
427. Boudina S, Abel ED. 2007. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation* 115: 3213-23
428. Bugger H, Abel ED. 2014. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia* 57: 660-71
429. Saunders J, Mathewkutty S, Drazner MH, McGuire DK. 2008. Cardiomyopathy in type 2 diabetes: update on pathophysiological mechanisms. *Herz* 33: 184-90
430. Zhou L, Deng W, Fang P, He D, Zhang W, Liu K, Hu R. 2009. Prevalence, incidence and risk factors of chronic heart failure in the type 2 diabetic population: systematic review. *Curr Diabetes Rev* 5: 171-84
431. Luitse MJ, Biessels GJ, Rutten GE, Kappelle LJ. 2012. Diabetes, hyperglycaemia, and acute ischaemic stroke. *Lancet Neurol* 11: 261-71
432. Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Ingelsson E, Lawlor DA, Selvin E, Stampfer M, Stehouwer CD, Lewington S, Pennells L, Thompson A, Sattar N, White IR, Ray KK, Danesh J. 2010. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet* 375: 2215-22
433. 2003. Peripheral arterial disease in people with diabetes. *Diabetes Care* 26: 3333-41
434. Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati FL, Powe NR, Golden SH. 2004. Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 141: 421-31
435. Kullo IJ, Bailey KR, Kardia SL, Mosley TH, Jr., Boerwinkle E, Turner ST. 2003. Ethnic differences in peripheral arterial disease in the NHLBI Genetic Epidemiology Network of Arteriopathy (GENOA) study. *Vasc Med* 8: 237-42
436. Schainfeld RM. 2001. Management of peripheral arterial disease and intermittent claudication. *J Am Board Fam Pract* 14: 443-50
437. Vogt MT, Cauley JA, Kuller LH, Nevitt MC. 1994. Functional status and mobility among elderly women with lower extremity arterial disease: the Study of Osteoporotic Fractures. *J Am Geriatr Soc* 42: 923-9
438. McDermott MM, Liu K, Greenland P, Guralnik JM, Criqui MH, Chan C, Pearce WH, Schneider JR, Ferrucci L, Celic L, Taylor LM, Vonesh E, Martin GJ, Clark E. 2004. Functional decline in peripheral arterial disease: associations with the ankle brachial index and leg symptoms. *JAMA* 292: 453-61

439. Adler AI, Boyko EJ, Ahroni JH, Smith DG. 1999. Lower-extremity amputation in diabetes. The independent effects of peripheral vascular disease, sensory neuropathy, and foot ulcers. *Diabetes Care* 22: 1029-35
440. Dickinson PJ, Carrington AL, Frost GS, Boulton AJ. 2002. Neurovascular disease, antioxidants and glycation in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 18: 260-72
441. Luo M, Guan X, Luczak ED, Lang D, Kutschke W, Gao Z, Yang J, Glynn P, Sossalla S, Swaminathan PD, Weiss RM, Yang B, Rokita AG, Maier LS, Efimov IR, Hund TJ, Anderson ME. 2013. Diabetes increases mortality after myocardial infarction by oxidizing CaMKII. *J Clin Invest* 123: 1262-74
442. Paulson DJ. 1997. The diabetic heart is more sensitive to ischemic injury. *Cardiovasc Res* 34: 104-12
443. Joffe, II, Travers KE, Perreault-Micale CL, Hampton T, Katz SE, Morgan JP, Douglas PS. 1999. Abnormal cardiac function in the streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetic rat: noninvasive assessment with doppler echocardiography and contribution of the nitric oxide pathway. *J Am Coll Cardiol* 34: 2111-9
444. Trost SU, Belke DD, Bluhm WF, Meyer M, Swanson E, Dillmann WH. 2002. Overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase improves myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 51: 1166-71
445. Ieda M, Kanazawa H, Ieda Y, Kimura K, Matsumura K, Tomita Y, Yagi T, Onizuka T, Shimoji K, Ogawa S, Makino S, Sano M, Fukuda K. 2006. Nerve growth factor is critical for cardiac sensory innervation and rescues neuropathy in diabetic hearts. *Circulation* 114: 2351-63
446. Kennedy JM, Zochodne DW. 2005. Impaired peripheral nerve regeneration in diabetes mellitus. *J Peripher Nerv Syst* 10: 144-57
447. Muangman P, Muffley LA, Anthony JP, Spenny ML, Underwood RA, Olerud JE, Gibran NS. 2004. Nerve growth factor accelerates wound healing in diabetic mice. *Wound Repair Regen* 12: 44-52
448. Polydefkis M, Hauer P, Sheth S, Sirdofsky M, Griffin JW, McArthur JC. 2004. The time course of epidermal nerve fibre regeneration: studies in normal controls and in people with diabetes, with and without neuropathy. *Brain* 127: 1606-15
449. Rivard A, Silver M, Chen D, Kearney M, Magner M, Annex B, Peters K, Isner JM. 1999. Rescue of diabetes-related impairment of angiogenesis by intramuscular gene therapy with adeno-VEGF. *Am J Pathol* 154: 355-63
450. Yarom R, Zirkin H, Stammers G, Rose AG. 1992. Human coronary microvessels in diabetes and ischaemia. Morphometric study of autopsy material. *J Pathol* 166: 265-70
451. Yasuda H, Dyck PJ. 1987. Abnormalities of endoneurial microvessels and sural nerve pathology in diabetic neuropathy. *Neurology* 37: 20-8
452. Sodha NR, Clements RT, Boodhwani M, Xu SH, Laham RJ, Bianchi C, Sellke FW. 2009. Endostatin and angiostatin are increased in diabetic patients with coronary artery disease and associated with impaired coronary collateral formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H428-34
453. Waltenberger J. 2009. VEGF resistance as a molecular basis to explain the angiogenesis paradox in diabetes mellitus. *Biochem Soc Trans* 37: 1167-70
454. Malik RA, Veves A, Walker D, Siddique I, Lye RH, Schady W, Boulton AJ. 2001. Sural nerve fibre pathology in diabetic patients with mild neuropathy: relationship to

- pain, quantitative sensory testing and peripheral nerve electrophysiology. *Acta Neuropathol* 101: 367-74
455. Polydefkis M, Hauer P, Griffin JW, McArthur JC. 2001. Skin biopsy as a tool to assess distal small fiber innervation in diabetic neuropathy. *Diabetes Technol Ther* 3: 23-8
  456. Kennedy JM, Zochodne DW. 2000. The regenerative deficit of peripheral nerves in experimental diabetes: its extent, timing and possible mechanisms. *Brain* 123 ( Pt 10): 2118-29
  457. Schnack C, Festa A, Schwarzmaier-D'Assie A, Haber P, Schernthaner G. 1996. Pulmonary dysfunction in type 1 diabetes in relation to metabolic long-term control and to incipient diabetic nephropathy. *Nephron* 74: 395-400
  458. van den Borst B, Gosker HR, Zeegers MP, Schols AM. 2010. Pulmonary function in diabetes: a metaanalysis. *Chest* 138: 393-406
  459. van Gent R, Brackel HJ, de Vroede M, van der Ent CK. 2002. Lung function abnormalities in children with type I diabetes. *Respir Med* 96: 976-8
  460. Vracko R, Thorning D, Huang TW. 1979. Basal lamina of alveolar epithelium and capillaries: quantitative changes with aging and in diabetes mellitus. *Am Rev Respir Dis* 120: 973-83
  461. Yang J, Xue Q, Miao L, Cai L. 2011. Pulmonary fibrosis: a possible diabetic complication. *Diabetes Metab Res Rev* 27: 311-7
  462. Kuitert LM. 2008. The lung in diabetes--yet another target organ? *Chron Respir Dis* 5: 67-8
  463. Rosenstock J, Bergenstal R, DeFronzo RA, Hirsch IB, Klonoff D, Boss AH, Kramer D, Petrucci R, Yu W, Levy B. 2008. Efficacy and safety of Technosphere inhaled insulin compared with Technosphere powder placebo in insulin-naive type 2 diabetes suboptimally controlled with oral agents. *Diabetes Care* 31: 2177-82
  464. Rosenstock J, Cefalu WT, Hollander PA, Belanger A, Eliaschewitz FG, Gross JL, Klioze SS, St Aubin LB, Foyt H, Ogawa M, Duggan WT. 2008. Two-year pulmonary safety and efficacy of inhaled human insulin (Exubera) in adult patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 31: 1723-8
  465. Kaparianos A, Argyropoulou E, Sampsonas F, Karkoulas K, Tsiamita M, Spiropoulos K. 2008. Pulmonary complications in diabetes mellitus. *Chron Respir Dis* 5: 101-8
  466. Ehrlich SF, Quesenberry CP, Jr., Van Den Eeden SK, Shan J, Ferrara A. 2010. Patients diagnosed with diabetes are at increased risk for asthma, chronic obstructive pulmonary disease, pulmonary fibrosis, and pneumonia but not lung cancer. *Diabetes Care* 33: 55-60
  467. Yang J, Tan Y, Zhao F, Ma Z, Wang Y, Zheng S, Epstein PN, Yu J, Yin X, Zheng Y, Li X, Miao L, Cai L. 2011. Angiotensin II plays a critical role in diabetic pulmonary fibrosis most likely via activation of NADPH oxidase-mediated nitrosative damage. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301: E132-44
  468. Sandler M. 1990. Is the lung a 'target organ' in diabetes mellitus? *Arch Intern Med* 150: 1385-8
  469. Vogt BW, Schleicher ED, Wieland OH. 1982. epsilon-Amino-lysine-bound glucose in human tissues obtained at autopsy. Increase in diabetes mellitus. *Diabetes* 31: 1123-7
  470. Nguyen QT, Colombo F, Clement R, Gosselin H, Rouleau JL, Calderone A. 2003. AT1 receptor antagonist therapy preferentially ameliorated right ventricular function



- and phenotype during the early phase of remodeling post-MI. *Br J Pharmacol* 138: 1485-94
471. Lefebvre F, Prefontaine A, Calderone A, Caron A, Jasmin JF, Villeneuve L, Dupuis J. 2006. Modification of the pulmonary renin-angiotensin system and lung structural remodelling in congestive heart failure. *Clin Sci (Lond)* 111: 217-24
472. Yamazaki KG, Gonzalez E, Zambon AC. 2012. Crosstalk between the renin-angiotensin system and the advance glycation end product axis in the heart: role of the cardiac fibroblast. *J Cardiovasc Transl Res* 5: 805-13
473. Mellodew K, Suhr R, Uwanogho DA, Reuter I, Lendahl U, Hodges H, Price J. 2004. Nestin expression is lost in a neural stem cell line through a mechanism involving the proteasome and Notch signalling. *Brain Res Dev Brain Res* 151: 13-23
474. Zhou J, Livak MF, Bernier M, Muller DC, Carlson OD, Elahi D, Maudsley S, Egan JM. 2007. Ubiquitination is involved in glucose-mediated downregulation of GIP receptors in islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E538-47
475. Qi D, Pulinilkunnil T, An D, Ghosh S, Abrahami A, Pospisilik JA, Brownsey R, Wambolt R, Allard M, Rodrigues B. 2004. Single-dose dexamethasone induces whole-body insulin resistance and alters both cardiac fatty acid and carbohydrate metabolism. *Diabetes* 53: 1790-7
476. Thompson MD, Gallagher WJ, Iazzo PA, Lanier WL. 2000. The effect of chronic dexamethasone-induced hyperglycemia and its acute treatment with insulin on brain glucose and glycogen concentrations in rats. *Anesthesiology* 93: 1279-84
477. Omary MB. 2009. "IF-pathies": a broad spectrum of intermediate filament-associated diseases. *J Clin Invest* 119: 1756-62
478. Dey P, Togra J, Mitra S. 2014. Intermediate filament: structure, function, and applications in cytology. *Diagn Cytopathol* 42: 628-35
479. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, Amon A. 2012. *Molecular Cell Biology 7th edition*. New York, NY. 1154 pp.
480. Fuchs E, Weber K. 1994. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* 63: 345-82
481. Snider NT, Omary MB. 2014. Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 163-77
482. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular Biology of the cell 4th edition*. New York, NY: Garland Science. 1616 pp.
483. Steinert PM, Chou YH, Prahlad V, Parry DA, Marekov LN, Wu KC, Jang SI, Goldman RD. 1999. A high molecular weight intermediate filament-associated protein in BHK-21 cells is nestin, a type VI intermediate filament protein. Limited co-assembly in vitro to form heteropolymers with type III vimentin and type IV alpha-internexin. *J Biol Chem* 274: 9881-90
484. Steinert PM, Liem RK. 1990. Intermediate filament dynamics. *Cell* 60: 521-3
485. Cooper GM, Hausman RE. 2009. *The Cell: A Molecular Approach 5th edition*. Sunderland, Mass: Sinauer Associates. 820 pp.
486. Tang DD. 2008. Intermediate filaments in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 294: C869-78
487. Dahlstrand J, Zimmerman LB, McKay RD, Lendahl U. 1992. Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *J Cell Sci* 103 ( Pt 2): 589-97



488. Steinert PM, Roop DR. 1988. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu Rev Biochem* 57: 593-625
489. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60: 585-95
490. Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM. 2004. Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* 61: 2510-22
491. Marvin MJ, Dahlstrand J, Lendahl U, McKay RD. 1998. A rod end deletion in the intermediate filament protein nestin alters its subcellular localization in neuroepithelial cells of transgenic mice. *J Cell Sci* 111 ( Pt 14): 1951-61
492. Herrmann H, Strelkov SV, Burkhard P, Aebi U. 2009. Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *J Clin Invest* 119: 1772-83
493. Lowery J, Kuczumski ER, Herrmann H, Goldman RD. 2015. Intermediate Filaments Play a Pivotal Role in Regulating Cell Architecture and Function. *J Biol Chem*, 290(28): 17145-17153
494. Sahlgren CM, Mikhailov A, Hellman J, Chou YH, Lendahl U, Goldman RD, Eriksson JE. 2001. Mitotic reorganization of the intermediate filament protein nestin involves phosphorylation by cdc2 kinase. *J Biol Chem* 276: 16456-63
495. Hockfield S, McKay RD. 1985. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* 5: 3310-28
496. Yang J, Cheng L, Yan Y, Bian W, Tomooka Y, Shiurba R, Jing N. 2001. Mouse nestin cDNA cloning and protein expression in the cytoskeleton of transfected cells. *Biochim Biophys Acta* 1520: 251-4
497. Michalczyk K, Ziman M. 2005. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol* 20: 665-71
498. Gresle MM, Butzkueven H, Shaw G. 2011. Neurofilament proteins as body fluid biomarkers of neurodegeneration in multiple sclerosis. *Mult Scler Int* 2011: 315406
499. Chou YH, Khuon S, Herrmann H, Goldman RD. 2003. Nestin promotes the phosphorylation-dependent disassembly of vimentin intermediate filaments during mitosis. *Mol Biol Cell* 14: 1468-78
500. Herrmann H, Aebi U. 2000. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol* 12: 79-90
501. Jones JC, Goldman AE, Yang HY, Goldman RD. 1985. The organizational fate of intermediate filament networks in two epithelial cell types during mitosis. *J Cell Biol* 100: 93-102
502. Sahlgren CM, Mikhailov A, Vaittinen S, Pallari HM, Kalimo H, Pant HC, Eriksson JE. 2003. Cdk5 regulates the organization of Nestin and its association with p35. *Mol Cell Biol* 23: 5090-106
503. Amoh Y, Li L, Yang M, Moossa AR, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM. 2004. Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair-follicle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13291-5
504. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD. 2001. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3: 778-84

505. Carlsson L, Li Z, Paulin D, Thornell LE. 1999. Nestin is expressed during development and in myotendinous and neuromuscular junctions in wild type and desmin knock-out mice. *Exp Cell Res* 251: 213-23
506. Sejersen T, Lendahl U. 1993. Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. *J Cell Sci* 106 ( Pt 4): 1291-300
507. Zhong H, Jin Z, Chen Y, Zhang T, Bian W, Cui X, Jing N. 2008. First intron of nestin gene regulates its expression during C2C12 myoblast differentiation. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40: 526-32
508. Kachinsky AM, Dominov JA, Miller JB. 1995. Intermediate filaments in cardiac myogenesis: nestin in the developing mouse heart. *J Histochem Cytochem* 43: 843-7
509. Frojzman K, Pelliniemi LJ, Lendahl U, Virtanen I, Eriksson JE. 1997. The intermediate filament protein nestin occurs transiently in differentiating testis of rat and mouse. *Differentiation* 61: 243-9
510. Li L, Mignone J, Yang M, Matic M, Penman S, Enikolopov G, Hoffman RM. 2003. Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 9958-61
511. Oikawa H, Hayashi K, Maesawa C, Masuda T, Sobue K. 2010. Expression profiles of nestin in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Exp Cell Res* 316: 940-50
512. Terling C, Rass A, Mitsiadis TA, Fried K, Lendahl U, Wroblewski J. 1995. Expression of the intermediate filament nestin during rodent tooth development. *Int J Dev Biol* 39: 947-56
513. Lendahl U. 1997. Transgenic analysis of central nervous system development and regeneration. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 110: 116-8
514. Lin RC, Matesic DF, Marvin M, McKay RD, Brustle O. 1995. Re-expression of the intermediate filament nestin in reactive astrocytes. *Neurobiol Dis* 2: 79-85
515. Menet V, Gimenez y Ribotta M, Chauvet N, Drian MJ, Lannoy J, Colucci-Guyon E, Privat A. 2001. Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. *J Neurosci* 21: 6147-58
516. Vaittinen S, Lukka R, Sahlgren C, Rantanen J, Hurme T, Lendahl U, Eriksson JE, Kalimo H. 1999. Specific and innervation-regulated expression of the intermediate filament protein nestin at neuromuscular and myotendinous junctions in skeletal muscle. *Am J Pathol* 154: 591-600
517. Johansson CB, Lothian C, Molin M, Okano H, Lendahl U. 2002. Nestin enhancer requirements for expression in normal and injured adult CNS. *J Neurosci Res* 69: 784-94
518. Daniel C, Albrecht H, Ludke A, Hugo C. 2008. Nestin expression in repopulating mesangial cells promotes their proliferation. *Lab Invest* 88: 387-97
519. Krum JM, Rosenstein JM. 1999. Transient coexpression of nestin, GFAP, and vascular endothelial growth factor in mature reactive astroglia following neural grafting or brain wounds. *Exp Neurol* 160: 348-60
520. Namiki J, Tator CH. 1999. Cell proliferation and nestin expression in the ependyma of the adult rat spinal cord after injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 489-98
521. Pekny M, Johansson CB, Eliasson C, Stakeberg J, Wallen A, Perlmann T, Lendahl U, Betsholtz C, Berthold CH, Frisen J. 1999. Abnormal reaction to central nervous system

- injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *J Cell Biol* 145: 503-14
522. Niki T, Pekny M, Hellemans K, Bleser PD, Berg KV, Vaeyens F, Quartier E, Schuit F, Geerts A. 1999. Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 29: 520-7
523. Tennakoon AH, Izawa T, Wijesundera KK, Golbar HM, Tanaka M, Ichikawa C, Kuwamura M, Yamate J. 2013. Characterization of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-expressing hepatic stellate cells and myofibroblasts in thioacetamide (TAA)-induced rat liver injury. *Exp Toxicol Pathol* 65: 1159-71
524. Sakairi T, Hiromura K, Yamashita S, Takeuchi S, Tomioka M, Ideura H, Maeshima A, Kaneko Y, Kuroiwa T, Nangaku M, Takeuchi T, Nojima Y. 2007. Nestin expression in the kidney with an obstructed ureter. *Kidney Int* 72: 307-18
525. Tomioka M, Hiromura K, Sakairi T, Takeuchi S, Maeshima A, Kaneko Y, Kuroiwa T, Takeuchi T, Nojima Y. 2010. Nestin is a novel marker for renal tubulointerstitial injury in immunoglobulin A nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 15: 568-74
526. Ishiwata T, Matsuda Y, Naito Z. 2011. Nestin in gastrointestinal and other cancers: effects on cells and tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol* 17: 409-18
527. Galli R, Gritti A, Bonfanti L, Vescovi AL. 2003. Neural stem cells: an overview. *Circ Res* 92: 598-608
528. Bellafiore M, Sivverini G, Cappello F, David S, Palma A, Farina F, Zummo G. 2006. Research of cardiomyocyte precursors in adult rat heart. *Tissue Cell* 38: 345-51
529. Scobioala S, Klocke R, Kuhlmann M, Tian W, Hasib L, Milting H, Koenig S, Stelljes M, El-Banayosy A, Tenderich G, Michel G, Breithardt G, Nikol S. 2008. Up-regulation of nestin in the infarcted myocardium potentially indicates differentiation of resident cardiac stem cells into various lineages including cardiomyocytes. *FASEB J* 22: 1021-31
530. Zaglia T, Dedja A, Candiotti C, Cozzi E, Schiaffino S, Ausoni S. 2009. Cardiac interstitial cells express GATA4 and control dedifferentiation and cell cycle re-entry of adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 46: 653-62
531. Callegari A, Bollini S, Iop L, Chiavegato A, Torregrossa G, Pozzobon M, Gerosa G, De Coppi P, Elvassore N, Sartore S. 2007. Neovascularization induced by porous collagen scaffold implanted on intact and cryoinjured rat hearts. *Biomaterials* 28: 5449-61
532. Hagio M, Matsuda Y, Suzuki T, Ishiwata T. 2013. Nestin regulates epithelial-mesenchymal transition marker expression in pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines. *Mol Clin Oncol* 1: 83-7
533. Zhao Z, Lu P, Zhang H, Xu H, Gao N, Li M, Liu C. 2014. Nestin positively regulates the Wnt/ss-catenin pathway and the proliferation, survival, and invasiveness of breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res* 16: 408
534. Su HT, Weng CC, Hsiao PJ, Chen LH, Kuo TL, Chen YW, Kuo KK, Cheng KH. 2013. Stem cell marker nestin is critical for TGF-beta1-mediated tumor progression in pancreatic cancer. *Mol Cancer Res* 11: 768-79
535. Huang YL, Shi GY, Lee H, Jiang MJ, Huang BM, Wu HL, Yang HY. 2009. Thrombin induces nestin expression via the transactivation of EGFR signalings in rat vascular smooth muscle cells. *Cell Signal* 21: 954-68

536. Xue XJ, Yuan XB. 2010. Nestin is essential for mitogen-stimulated proliferation of neural progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 45: 26-36
537. Matsuda Y, Yoshimura H, Ueda J, Naito Z, Korc M, Ishiwata T. 2014. Nestin delineates pancreatic cancer stem cells in metastatic foci of NOD/Shi-scld IL2Rgamma(null) (NOG) mice. *Am J Pathol* 184: 674-85
538. Narita K, Matsuda Y, Seike M, Naito Z, Gemma A, Ishiwata T. 2014. Nestin regulates proliferation, migration, invasion and stemness of lung adenocarcinoma. *Int J Oncol* 44: 1118-30
539. Cizkova D, Soukup T, Mokry J. 2009. Nestin expression reflects formation, revascularization and reinnervation of new myofibers in regenerating rat hind limb skeletal muscles. *Cells Tissues Organs* 189: 338-47
540. Shin HY, Kim JH, Phi JH, Park CK, Kim JE, Paek SH, Wang KC, Kim DG. 2008. Endogenous neurogenesis and neovascularization in the neocortex of the rat after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 86: 356-67
541. Mokry J, Ehrmann J, Karbanova J, Cizkova D, Soukup T, Suchanek J, Filip S, Kolar Z. 2008. Expression of intermediate filament nestin in blood vessels of neural and non-neural tissues. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 51: 173-9
542. Krupkova O, Jr., Loja T, Redova M, Neradil J, Zitterbart K, Sterba J, Veselska R. 2011. Analysis of nuclear nestin localization in cell lines derived from neurogenic tumors. *Tumour Biol* 32: 631-9
543. Piras F, Perra MT, Murtas D, Minerba L, Floris C, Maxia C, Demurtas P, Ugalde J, Ribatti D, Sirigu P. 2010. The stem cell marker nestin predicts poor prognosis in human melanoma. *Oncol Rep* 23: 17-24
544. Thomas SK, Messam CA, Spengler BA, Biedler JL, Ross RA. 2004. Nestin is a potential mediator of malignancy in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 279: 27994-9
545. Veselska R, Kuglik P, Cejpek P, Svachova H, Neradil J, Loja T, Relichova J. 2006. Nestin expression in the cell lines derived from glioblastoma multiforme. *BMC Cancer* 6: 32
546. Ehrmann J, Kolar Z, Mokry J. 2005. Nestin as a diagnostic and prognostic marker: immunohistochemical analysis of its expression in different tumours. *J Clin Pathol* 58: 222-3
547. Kaldis P, Richardson HE. 2012. When cell cycle meets development. *Development* 139: 225-30
548. Ohshima T, Gilmore EC, Longenecker G, Jacobowitz DM, Brady RO, Herrup K, Kulkarni AB. 1999. Migration defects of cdk5(-/-) neurons in the developing cerebellum is cell autonomous. *J Neurosci* 19: 6017-26
549. Ohshima T, Ward JM, Huh CG, Longenecker G, Veeranna, Pant HC, Brady RO, Martin LJ, Kulkarni AB. 1996. Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11173-8
550. Pallari HM, Lindqvist J, Torvaldson E, Ferraris SE, He T, Sahlgren C, Eriksson JE. 2011. Nestin as a regulator of Cdk5 in differentiating myoblasts. *Mol Biol Cell* 22: 1539-49

551. Lazaro JB, Kitzmann M, Poul MA, Vandromme M, Lamb NJ, Fernandez A. 1997. Cyclin dependent kinase 5, cdk5, is a positive regulator of myogenesis in mouse C2 cells. *J Cell Sci* 110 ( Pt 10): 1251-60
552. Philpott A, Porro EB, Kirschner MW, Tsai LH. 1997. The role of cyclin-dependent kinase 5 and a novel regulatory subunit in regulating muscle differentiation and patterning. *Genes Dev* 11: 1409-21
553. de Thonel A, Ferraris SE, Pallari HM, Imanishi SY, Kochin V, Hosokawa T, Hisanaga S, Sahlgren C, Eriksson JE. 2010. Protein kinase Czeta regulates Cdk5/p25 signaling during myogenesis. *Mol Biol Cell* 21: 1423-34
554. Sahlgren CM, Pallari HM, He T, Chou YH, Goldman RD, Eriksson JE. 2006. A nestin scaffold links Cdk5/p35 signaling to oxidant-induced cell death. *EMBO J* 25: 4808-19
555. Kamei H, Saito T, Ozawa M, Fujita Y, Asada A, Bibb JA, Saido TC, Sorimachi H, Hisanaga S. 2007. Suppression of calpain-dependent cleavage of the CDK5 activator p35 to p25 by site-specific phosphorylation. *J Biol Chem* 282: 1687-94
556. Huang YL, Shi GY, Jiang MJ, Lee H, Chou YW, Wu HL, Yang HY. 2008. Epidermal growth factor up-regulates the expression of nestin through the Ras-Raf-ERK signaling axis in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 361-6
557. Martorell L, Martinez-Gonzalez J, Rodriguez C, Gentile M, Calvayrac O, Badimon L. 2008. Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. *Thromb Haemost* 99: 305-15
558. Rauch BH, Millette E, Kenagy RD, Daum G, Clowes AW. 2004. Thrombin- and factor Xa-induced DNA synthesis is mediated by transactivation of fibroblast growth factor receptor-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 94: 340-5
559. Cui Y, Xiao Z, Han J, Sun J, Ding W, Zhao Y, Chen B, Li X, Dai J. 2012. MiR-125b orchestrates cell proliferation, differentiation and migration in neural stem/progenitor cells by targeting Nestin. *BMC Neurosci* 13: 116
560. Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-97
561. Sun YM, Lin KY, Chen YQ. 2013. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. *J Hematol Oncol* 6: 6
562. Kalluri R, Weinberg RA. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119: 1420-8
563. Kalluri R, Neilson EG. 2003. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112: 1776-84
564. Taylor MA, Parvani JG, Schiemann WP. 2010. The pathophysiology of epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor-beta in normal and malignant mammary epithelial cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15: 169-90
565. Pain M, Bermudez O, Lacoste P, Royer PJ, Botturi K, Tissot A, Brouard S, Eickelberg O, Magnan A. 2014. Tissue remodelling in chronic bronchial diseases: from the epithelial to mesenchymal phenotype. *Eur Respir Rev* 23: 118-30
566. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. 2002. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 110: 341-50
567. Hay ED. 1995. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 154: 8-20
568. Vicovac L, Aplin JD. 1996. Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation. *Acta Anat (Basel)* 156: 202-16



569. Duband JL, Thiery JP. 1982. Appearance and distribution of fibronectin during chick embryo gastrulation and neurulation. *Dev Biol* 94: 337-50
570. Thiery JP. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2: 442-54
571. Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, Yang CQ, Kalluri R, Muller GA, Neilson EG. 2002. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int* 61: 1714-28
572. Okada H, Danoff TM, Kalluri R, Neilson EG. 1997. Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol* 273: F563-74
573. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R. 2003. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 9: 964-8
574. Lee YH, Albig AR, Regner M, Schiemann BJ, Schiemann WP. 2008. Fibulin-5 initiates epithelial-mesenchymal transition (EMT) and enhances EMT induced by TGF-beta in mammary epithelial cells via a MMP-dependent mechanism. *Carcinogenesis* 29: 2243-51
575. Zeisberg M, Bonner G, Maeshima Y, Colorado P, Muller GA, Strutz F, Kalluri R. 2001. Renal fibrosis: collagen composition and assembly regulates epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Am J Pathol* 159: 1313-21
576. Okada H, Strutz F, Danoff TM, Kalluri R, Neilson EG. 1996. Possible mechanisms of renal fibrosis. *Contrib Nephrol* 118: 147-54
577. Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R. 2007. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 282: 23337-47
578. Rastaldi MP, Ferrario F, Giardino L, Dell'Antonio G, Grillo C, Grillo P, Strutz F, Muller GA, Colasanti G, D'Amico G. 2002. Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney Int* 62: 137-46
579. Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, Chapman HA. 2006. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 13180-5
580. Willis BC, duBois RM, Borok Z. 2006. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proc Am Thorac Soc* 3: 377-82
581. Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, Polosukhin VV, Jones BR, Boomersshine CS, Ortiz C, Sherrill TP, McMahon FB, Gleaves LA, Blackwell TS, Lawson WE. 2011. TGFbeta signaling in lung epithelium regulates bleomycin-induced alveolar injury and fibroblast recruitment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300: L887-97
582. Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, Polosukhin VV, Jones BR, McMahon FB, Gleaves LA, Blackwell TS, Lawson WE. 2010. Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 299: L442-52
583. Kim KK, Wei Y, Szekeres C, Kugler MC, Wolters PJ, Hill ML, Frank JA, Brumwell AN, Wheeler SE, Kreidberg JA, Chapman HA. 2009. Epithelial cell alpha3beta1 integrin links beta-catenin and Smad signaling to promote myofibroblast formation and pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 119: 213-24



584. Marmai C, Sutherland RE, Kim KK, Dolganov GM, Fang X, Kim SS, Jiang S, Golden JA, Hoopes CW, Matthay MA, Chapman HA, Wolters PJ. 2011. Alveolar epithelial cells express mesenchymal proteins in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 301: L71-8
585. Tanjore H, Xu XC, Polosukhin VV, Degryse AL, Li B, Han W, Sherrill TP, Plieth D, Neilson EG, Blackwell TS, Lawson WE. 2009. Contribution of epithelial-derived fibroblasts to bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 180: 657-65
586. Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM, Borok Z. 2005. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 166: 1321-32
587. Yang J, Wheeler SE, Velikoff M, Kleaveland KR, LaFemina MJ, Frank JA, Chapman HA, Christensen PJ, Kim KK. 2013. Activated alveolar epithelial cells initiate fibrosis through secretion of mesenchymal proteins. *Am J Pathol* 183: 1559-70
588. DeMaio L, Buckley ST, Krishnaveni MS, Flodby P, Dubourd M, Banfalvi A, Xing Y, Ehrhardt C, Minoo P, Zhou B, Crandall ED, Borok Z. 2012. Ligand-independent transforming growth factor-beta type I receptor signalling mediates type I collagen-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Pathol* 226: 633-44
589. Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. 2008. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 19: 2282-7
590. Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG. 1995. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* 130: 393-405
591. Chu AS, Diaz R, Hui JJ, Yanger K, Zong Y, Alpini G, Stanger BZ, Wells RG. 2011. Lineage tracing demonstrates no evidence of cholangiocyte epithelial-to-mesenchymal transition in murine models of hepatic fibrosis. *Hepatology* 53: 1685-95
592. Scholten D, Osterreicher CH, Scholten A, Iwaisako K, Gu G, Brenner DA, Kisseleva T. 2010. Genetic labeling does not detect epithelial-to-mesenchymal transition of cholangiocytes in liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 139: 987-98
593. Taura K, Miura K, Iwaisako K, Osterreicher CH, Kodama Y, Penz-Osterreicher M, Brenner DA. 2010. Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. *Hepatology* 51: 1027-36
594. Chapman HA. 2011. Epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis. *Annu Rev Physiol* 73: 413-35
595. Zhou G, Dada LA, Wu M, Kelly A, Trejo H, Zhou Q, Varga J, Sznajder JI. 2009. Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ROS and hypoxia-inducible factor 1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297: L1120-30
596. Kasai H, Allen JT, Mason RM, Kamimura T, Zhang Z. 2005. TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res* 6: 56
597. Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70
598. Yang J, Weinberg RA. 2008. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 14: 818-29

599. Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. 2005. Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *J Biol Chem* 280: 8094-100
600. Brychtova S, Fiuraskova M, Hlobilkova A, Brychta T, Hirnak J. 2007. Nestin expression in cutaneous melanomas and melanocytic nevi. *J Cutan Pathol* 34: 370-5
601. Kleeberger W, Bova GS, Nielsen ME, Herawi M, Chuang AY, Epstein JI, Berman DM. 2007. Roles for the stem cell associated intermediate filament Nestin in prostate cancer migration and metastasis. *Cancer Res* 67: 9199-206
602. Yamada H, Takano T, Ito Y, Matsuzuka F, Miya A, Kobayashi K, Yoshida H, Watanabe M, Iwatani Y, Miyauchi A. 2009. Expression of nestin mRNA is a differentiation marker in thyroid tumors. *Cancer Lett* 280: 61-4
603. You S, Avidan O, Tariq A, Ahluwalia I, Stark PC, Kublin CL, Zoukhri D. 2012. Role of epithelial-mesenchymal transition in repair of the lacrimal gland after experimentally induced injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53: 126-35
604. Lin F, Wang N, Zhang TC. 2012. The role of endothelial-mesenchymal transition in development and pathological process. *IUBMB Life* 64: 717-23
605. Li J, Bertram JF. 2010. Review: Endothelial-myofibroblast transition, a new player in diabetic renal fibrosis. *Nephrology (Carlton)* 15: 507-12
606. Piera-Velazquez S, Li Z, Jimenez SA. 2011. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *Am J Pathol* 179: 1074-80
607. Singh KK, Lovren F, Pan Y, Quan A, Ramadan A, Matkar PN, Ehsan M, Sandhu P, Mantella LE, Gupta N, Teoh H, Parotto M, Tabuchi A, Kuebler WM, Al-Omran M, Finkel T, Verma S. 2014. The essential autophagy gene ATG7 modulates organ fibrosis via regulation of endothelial-to-mesenchymal transition. *J Biol Chem* 290: 2547-2559.
608. Bijkerk R, de Bruin RG, van Solingen C, Duijs JM, Kobayashi K, van der Veer EP, ten Dijke P, Rabelink TJ, Goumans MJ, van Zonneveld AJ. 2012. MicroRNA-155 functions as a negative regulator of RhoA signaling in TGF-beta-induced endothelial to mesenchymal transition. *Microrna* 1: 2-10
609. Kinsella MG, Fitzharris TP. 1980. Origin of cushion tissue in the developing chick heart: cinematographic recordings of in situ formation. *Science* 207: 1359-60
610. Eisenberg LM, Markwald RR. 1995. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ Res* 77: 1-6
611. Hashimoto N, Phan SH, Imaizumi K, Matsuo M, Nakashima H, Kawabe T, Shimokata K, Hasegawa Y. 2010. Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43: 161-72
612. Kizu A, Medici D, Kalluri R. 2009. Endothelial-mesenchymal transition as a novel mechanism for generating myofibroblasts during diabetic nephropathy. *Am J Pathol* 175: 1371-3
613. Rieder F, Kessler SP, West GA, Bhilocha S, de la Motte C, Sadler TM, Gopalan B, Stylianou E, Fiocchi C. 2011. Inflammation-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a novel mechanism of intestinal fibrosis. *Am J Pathol* 179: 2660-73

614. Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R. 2007. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res* 67: 10123-8
615. Aisagbonhi O, Rai M, Ryzhov S, Atria N, Feoktistov I, Hatzopoulos AK. 2011. Experimental myocardial infarction triggers canonical Wnt signaling and endothelial-to-mesenchymal transition. *Dis Model Mech* 4: 469-83
616. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. 2005. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 97: 512-23
617. Strittmatter SM, Fankhauser C, Huang PL, Mashimo H, Fishman MC. 1995. Neuronal pathfinding is abnormal in mice lacking the neuronal growth cone protein GAP-43. *Cell* 80: 445-52
618. Lenzen S. 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51: 216-26
619. Karunanayake EH, Hearse DJ, Mellows G. 1974. The synthesis of [<sup>14</sup>C] streptozotocin and its distribution and excretion in the rat. *Biochem J* 142: 673-83
620. Jurysta C, Nicaise C, Giroix MH, Cetik S, Malaisse WJ, Sener A. 2013. Comparison of GLUT1, GLUT2, GLUT4 and SGLT1 mRNA expression in the salivary glands and six other organs of control, streptozotocin-induced and Goto-Kakizaki diabetic rats. *Cell Physiol Biochem* 31: 37-43
621. Aerni-Flessner L, Abi-Jaoude M, Koenig A, Payne M, Hruz PW. 2012. GLUT4, GLUT1, and GLUT8 are the dominant GLUT transcripts expressed in the murine left ventricle. *Cardiovasc Diabetol* 11: 63
622. Maurer MH, Geomor HK, Burgers HF, Schelshorn DW, Kuschinsky W. 2006. Adult neural stem cells express glucose transporters GLUT1 and GLUT3 and regulate GLUT3 expression. *FEBS Lett* 580: 4430-4
623. Longo N, Bell GI, Shuster RC, Griffin LD, Langley SD, Elsas LJ. 1990. Human fibroblasts express the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4). *Trans Assoc Am Physicians* 103: 202-13
624. Adolphe AB, Glasofer ED, Troetel WM, Weiss AJ, Manthei RW. 1977. Preliminary pharmacokinetics of streptozotocin, an antineoplastic antibiotic. *J Clin Pharmacol* 17: 379-88
625. Schein PS, Loftus S. 1968. Streptozotocin: depression of mouse liver pyridine nucleotides. *Cancer Res* 28: 1501-6
626. Tardif K, Hertig V, Dumais C, Villeneuve L, Perrault L, Tanguay JF, Calderone A. 2014. Nestin downregulation in rat vascular smooth muscle cells represents an early marker of vascular disease in experimental type I diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 13: 119
627. Jiang BH, Nguyen QT, Tardif JC, Shi Y, Dupuis J. 2010. Single measurement of troponin T for early prediction of infarct size, congestive heart failure, and pulmonary hypertension in an animal model of myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol* 20: e85-89
628. Yu H, Fang D, Kumar SM, Li L, Nguyen TK, Acs G, Herlyn M, Xu X. 2006. Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *Am J Pathol* 168: 1879-88
629. Kukekov VG, Laywell ED, Suslov O, Davies K, Scheffler B, Thomas LB, O'Brien TF, Kusakabe M, Steindler DA. 1999. Multipotent stem/progenitor cells with similar

- properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol* 156: 333-44
630. Amoh Y, Hamada Y, Aki R, Kawahara K, Hoffman RM, Katsuoka K. 2010. Direct transplantation of uncultured hair-follicle pluripotent stem (hfPS) cells promotes the recovery of peripheral nerve injury. *J Cell Biochem* 110: 272-7
631. Biernaskie J, Sparling JS, Liu J, Shannon CP, Plemel JR, Xie Y, Miller FD, Tetzlaff W. 2007. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. *J Neurosci* 27: 9545-59
632. Shimada IS, LeComte MD, Granger JC, Quinlan NJ, Spees JL. 2012. Self-renewal and differentiation of reactive astrocyte-derived neural stem/progenitor cells isolated from the cortical peri-infarct area after stroke. *J Neurosci* 32: 7926-40
633. Nguyen QT, Colombo F, Rouleau JL, Dupuis J, Calderone A. 2000. LU135252, an endothelin(A) receptor antagonist did not prevent pulmonary vascular remodelling or lung fibrosis in a rat model of myocardial infarction. *Br J Pharmacol* 130: 1525-30
634. Esni F, Stoffers DA, Takeuchi T, Leach SD. 2004. Origin of exocrine pancreatic cells from nestin-positive precursors in developing mouse pancreas. *Mech Dev* 121: 15-25
635. Gilbert RE, Krum H, Wilkinson-Berka J, Kelly DJ. 2003. The renin-angiotensin system and the long-term complications of diabetes: pathophysiological and therapeutic considerations. *Diabet Med* 20: 607-21
636. Russell ND, Cooper ME. 2015. 50 years forward: mechanisms of hyperglycaemia-driven diabetic complications. *Diabetologia* 58: 1708-14
637. Benigni A, Cassis P, Remuzzi G. 2010. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Mol Med* 2: 247-57
638. Abe K, Toba M, Alzoubi A, Ito M, Fagan KA, Cool CD, Voelkel NF, McMurtry IF, Oka M. 2010. Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 121: 2747-54
639. Elmedal B, de Dam MY, Mulvany MJ, Simonsen U. 2004. The superoxide dismutase mimetic, tempol, blunts right ventricular hypertrophy in chronic hypoxic rats. *Br J Pharmacol* 141: 105-13
640. Morel OE, Buvry A, Le Corvoisier P, Tual L, Favret F, Leon-Velarde F, Crozatier B, Richalet JP. 2003. Effects of nifedipine-induced pulmonary vasodilatation on cardiac receptors and protein kinase C isoforms in the chronically hypoxic rat. *Pflugers Arch* 446: 356-64
641. Pauvert O, Bonnet S, Rousseau E, Marthan R, Savineau JP. 2004. Sildenafil alters calcium signaling and vascular tone in pulmonary arteries from chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L577-83
642. Tuchscherer HA, Vanderpool RR, Chesler NC. 2007. Pulmonary vascular remodeling in isolated mouse lungs: effects on pulsatile pressure-flow relationships. *J Biomech* 40: 993-1001
643. Adroque JV, Sharma S, Ngumbela K, Essop MF, Taegtmeier H. 2005. Acclimatization to chronic hypobaric hypoxia is associated with a differential transcriptional profile between the right and left ventricle. *Mol Cell Biochem* 278: 71-8
644. Sharma S, Taegtmeier H, Adroque J, Razeghi P, Sen S, Ngumbela K, Essop MF. 2004. Dynamic changes of gene expression in hypoxia-induced right ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H1185-92

645. Adachi S, Ito H, Ohta Y, Tanaka M, Ishiyama S, Nagata M, Toyozaki T, Hirata Y, Marumo F, Hiroe M. 1995. Distribution of mRNAs for natriuretic peptides in RV hypertrophy after pulmonary arterial banding. *Am J Physiol* 268: H162-9
646. Reddy DS, Singh M, Ganguly NK. 1996. Effects of long-term hydralazine treatment on myocardial structure and expression of myosin isogenes in cardiac pressure overload in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 18: 261-71
647. Tomasek JJ, Haaksma CJ, Schwartz RJ, Howard EW. 2013. Whole animal knockout of smooth muscle alpha-actin does not alter excisional wound healing or the fibroblast-to-myofibroblast transition. *Wound Repair Regen* 21: 166-76
648. Takeji M, Moriyama T, Oseto S, Kawada N, Hori M, Imai E, Miwa T. 2006. Smooth muscle alpha-actin deficiency in myofibroblasts leads to enhanced renal tissue fibrosis. *J Biol Chem* 281: 40193-200
649. She J, Bi J, Tong L, Song Y, Bai C. 2013. New insights of aquaporin 5 in the pathogenesis of high altitude pulmonary edema. *Diagn Pathol* 8: 193
650. Abbate M, Zoja C, Rottoli D, Corna D, Tomasoni S, Remuzzi G. 2002. Proximal tubular cells promote fibrogenesis by TGF-beta1-mediated induction of peritubular myofibroblasts. *Kidney Int* 61: 2066-77
651. Agocha A, Lee HW, Eghbali-Webb M. 1997. Hypoxia regulates basal and induced DNA synthesis and collagen type I production in human cardiac fibroblasts: effects of transforming growth factor-beta1, thyroid hormone, angiotensin II and basic fibroblast growth factor. *J Mol Cell Cardiol* 29: 2233-44
652. Le MT, Teh C, Shyh-Chang N, Xie H, Zhou B, Korzh V, Lodish HF, Lim B. 2009. MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev* 23: 862-76
653. Zhao A, Zeng Q, Xie X, Zhou J, Yue W, Li Y, Pei X. 2012. MicroRNA-125b induces cancer cell apoptosis through suppression of Bcl-2 expression. *J Genet Genomics* 39: 29-35
654. Meng XM, Chung AC, Lan HY. 2013. Role of the TGF-beta/BMP-7/Smad pathways in renal diseases. *Clin Sci (Lond)* 124: 243-54
655. De Crescenzo G, Hinck CS, Shu Z, Zuniga J, Yang J, Tang Y, Baardsnes J, Mendoza V, Sun L, Lopez-Casillas F, O'Connor-McCourt M, Hinck AP. 2006. Three key residues underlie the differential affinity of the TGFbeta isoforms for the TGFbeta type II receptor. *J Mol Biol* 355: 47-62
656. Sato M, Muragaki Y, Saika S, Roberts AB, Ooshima A. 2003. Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J Clin Invest* 112: 1486-94
657. Dobaczewski M, Bujak M, Li N, Gonzalez-Quesada C, Mendoza LH, Wang XF, Frangogiannis NG. 2010. Smad3 signaling critically regulates fibroblast phenotype and function in healing myocardial infarction. *Circ Res* 107: 418-28
658. Willis BC, Borok Z. 2007. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L525-34
659. Xie L, Law BK, Chytil AM, Brown KA, Aakre ME, Moses HL. 2004. Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro. *Neoplasia* 6: 603-10
660. Xie L, Law BK, Aakre ME, Edgerton M, Shyr Y, Bhowmick NA, Moses HL. 2003. Transforming growth factor beta-regulated gene expression in a mouse mammary gland epithelial cell line. *Breast Cancer Res* 5: R187-98